



# Preparation and Application of Molecular Imprinting Solid-Phase Microextraction Coating Based on Cytokinins

Lu Qiaomei<sup>1,2,\*</sup>, Fan Liangbiao<sup>3</sup>, Zhang Lan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Testing Center of Fuzhou University, Fuzhou, China

<sup>2</sup>Ministry of Education Key Laboratory of Analytical Science and Food Safety and Biology, Fuzhou University, Fuzhou, China

<sup>3</sup>Chemical and Materials College, Quanzhou Normal University, Quanzhou, China

## Email address:

luqm@fzu.edu.cn (Lu Qiaomei)

\*Corresponding author

## To cite this article:

Lu Qiaomei, Fan Liangbiao, Zhang Lan. Preparation and Application of Molecular Imprinting Solid-Phase Microextraction Coating Based on Cytokinins. *Asia-Pacific Journal of Chemistry*. Vol. 1, No. 1, 2019, pp. 13-18.

Received: May 28, 2019; Accepted: June 13, 2019; Published: July 9, 2019

**Abstract:** As a class of common plant hormones, cytokinins (CTKs) can greatly promote cell division and have wide application in agricultural production. Therefore, it is necessary to monitor the residue of CTKs in food or environment. Molecular Imprinting polymer (MIP) with kinetin-6-furfurylaminopurine (6-KT) as the template molecule was prepared using multiple polymerizations. The MIP was used as the fiber coating of solid-phase microextraction (SPME), and then molecular imprinting solid-phase microextraction (MISPME) assay was developed. A series of MISPME extraction conditions were optimized in detail. The extraction was performed at 60°C for 30 min with n-hexane as the extraction solvent and stirring speed of 400 rpm, with 15  $\mu$ L ethanol as the desorption solvent and desorption for 10 min. For vegetable and environmental water samples, two kinds of CTKs were analyzed by high performance liquid chromatography with UV detector. The enrichment factors of kinetin-6-furfurylaminopurine (6-KT) and N<sup>6</sup>-benzyladenine (6-BA) were 154 and 163, with whose detection limits of 0.3 ng/mL and 0.5 ng/mL, respectively. The proposed method was sensitive and reproducible, and it was suitable to the pretreatment and selective enrichment of plant hormones.

**Keywords:** Molecular Imprinting Technique, Solid-Phase Microextraction, Cytokinin, High Performance Liquid Chromatography

## 基于细胞分裂素的分子印迹固相微萃取涂层的制备及应用

卢巧梅<sup>1,2,\*</sup>, 范良彪<sup>3</sup>, 张兰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福州大学测试中心, 福州, 中国

<sup>2</sup>福州大学食品安全与生物分析教育部重点实验室, 福州, 中国

<sup>3</sup>泉州师范学院化工与材料学院, 泉州, 中国

## 邮箱

luqm@fzu.edu.cn (卢巧梅)

**摘要:** 细胞分裂素 (CTKs) 是能有效促进细胞分裂的一类常见植物激素, 广泛应用于农业生产。因此, 有必要监测食品或环境中的CTKs类激素残留。以6-糠氨基嘌呤 (6-KT) 为模板分子, 采用多次共聚法制备分子印记聚合物 (MIP)。将该聚合物作为纤维式固相微萃取 (SPME) 方法的涂层, 发展了分子印记固相微萃取方法 (MISPME)。详细优化了MISPME萃取过程的一系列条件, 最终选择萃取溶剂为正己烷、搅拌速率为400rpm、60°C萃取30min, 再用15 $\mu$ L乙醇解吸10min后进样分析。结合高效液相色谱-紫外检测器分析蔬菜样品和环境水样中2种CTKs。6-糠氨基嘌呤 (6-KT)、

6-卞氨基嘌呤(6-BA)的富集因子分别为154、163,检测限分别为0.3ng/mL、0.5ng/mL。方法灵敏、重现性好,适用于植物激素的前处理和选择性富集。

**关键词:** 分子印迹技术, 固相微萃取, 细胞分裂素, 高效液相色谱

## 1. 引言

细胞分裂素(CTKs)是一类重要的植物激素,能调控植物生长发育、增强抗逆性[1,2]。6-糠氨基嘌呤(亦称激动素,6-KT)、6-卞氨基嘌呤(6-BA)作为2种常用的外源性CTKs,具有延缓离体组织衰老、诱导愈伤组织分化、提高植物金属离子胁迫等效果,在实际农业上应用广泛[3]。然而,植物激素的过度使用也存在一定风险。若长期食用含有植物激素残留的果蔬或水体,会对人类健康造成威胁。我国《GB 2763-2012食品中农药最大残留限量标准》中规定6-BA的限量为0.2 mg/kg[4]。因此,发展一种高效的植物激素残留测定方法显得尤为重要。

分子印迹聚合物(MIP)是一类具有空间结构识别能力的选择性材料[5],凭借其制备简单、特异性吸附等优势在样品前处理、色谱柱填料、生物传感器等领域的研究非常热门[6-8]。将MIP与固相微萃取(SPME)方法相结合,形成的分子印迹固相微萃取(MISPME)技术是一种新型样品预处理方法。其中,萃取纤维头式MISPME于2001年首次报道[9]。鉴于CTKs结构中具有氨基活性位点,能与酸性功能单体发生作用,为制备MIP提供了可能。

以激动素(6-KT)为模板分子制备6-KT-MIP,作为固相萃取柱填料[10],或者制成分子印迹整体柱[11],用于富集含嘌呤环的4种结构类似CTKs曾有报道。然而,采用MISPME方法选择性富集CTKs类植物激素的工作仍很少[12]。实验采用MISPME-HPLC方法成功实现了果蔬或环境样品中CTKs类植物激素的检测,为植物激素的前处理和选择性富集提供一个新思路,也有利于食品安全监控和分析。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器及试剂

高效液相色谱仪1100型(Agilent, USA); SPME-HPLC接口(北京康林有限公司); DF-101S搅拌器(巩义市科瑞仪器有限公司); Milli-Q超纯水系统(Millipore, USA); 石英纤维材料(锐沣色谱器件有限责任公司)。

6-KT、6-BA、吲哚乙酸(IAA)购自百灵威化学技术有限公司。准确称取6-KT、6-BA和IAA标准品(纯度>98%),配制成浓度均为1 mg/mL储备液于4℃贮存。6-BA和6-KT用0.1 mol/L HCl溶解,IAA用甲醇溶解。

偶氮二异丁腈(AIBN)购自东莞市沁威化工有限公司; 三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)、 $\gamma$ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷( $\gamma$ -MAPs)购自句容大华化工有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)购自上海和创化学有限公司; 甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)、甲基丙

烯酸(MAA)、4-乙烯吡啶(4-VP)购自Alfa Aesar公司; 甲醇、乙腈、乙醇为色谱纯,购自德国Merck公司。所有实验用水均为Milli-Q超纯水。

### 2.2. 液相色谱条件

ZORBAX SB-C<sub>8</sub>色谱柱(250mm×4.6mm, 5 $\mu$ m, Agilent); 流动相选择60%甲醇-40%水; 流速为1.0mL/min; 最大紫外吸收波长为270nm。

### 2.3. MISPME涂层及NISPME涂层制备

MISPME涂层制备主要参考文献[13]。准确称量17mg模板分子6-KT,加入150 $\mu$ L功能单体MAA,溶于3.6mL乙醇中,充分摇匀,室温放置12h,再加入450 $\mu$ L交联剂TRIM和34mg引发剂AIBN,得到预聚合溶液,超声5min,通氮10min。将上述预聚合溶液倒入2.0mL衍生小瓶,将硅烷化的纤维插入瓶中,60℃烘箱中反应8h。按相同步骤和聚合方法,多次共聚涂渍MISPME涂层,制备一批不同厚度的涂层。涂层制备完成后,用乙醇-乙酸(90:10, v/v, %)多次洗脱,除尽涂层中的模板分子。

制备NISPME涂层作为参照,除不加模板分子6-KT外,其他步骤同MISPME涂层。

### 2.4. SPME萃取过程

在萃取血清瓶中加入20mL含有6-KT和6-BA组分的正己烷溶液,将涂有MISPME涂层的纤维插入萃取瓶中,在400rpm、60℃萃取30min,在SPME接口用15 $\mu$ L乙醇、解吸10min后直接HPLC分析。

### 2.5. 样品处理

白萝卜样品(购于当地超市):准确称取2g新鲜白萝卜,搅碎,加入12mL80%甲醇提取液4℃下浸提12h,过滤,残渣用6mL上述提取液再次浸提1h,合并两次滤液转移至100mL圆底烧瓶,45℃旋蒸近干,加入20mL正己烷提取,用于后续分析。

环境水样(采自福州大学湖水):准确量取10 mL过滤的环境水样于100mL圆底烧瓶,45℃旋蒸近干,加入20 mL正己烷提取,用于后续分析。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. MIP涂层制备过程

#### 3.1.1. MIP聚合反应

MIP制备过程中,功能单体与模板分子通过非共价作用形成复合物,因此需根据模板分子的结构特征选择合适的功能单体。分别考察以HEMA、MAA和4-VP等3种功能

单体制得的MISPME涂层的萃取性能。结果(表1)表明,MAA具有羧基,能与6-KT嘌呤环和侧链上的氨基相互作用,形成更多结合位点,从而更好地萃取6-KT和6-BA。因此,试验以MAA作为功能单体。当6-KT与MAA摩尔比为1:10时,MIP中识别位点较多、萃取容量较大。

考察功能单体MAA与交联剂TRIM两者用量对涂层萃取能力的影响。当TRIM用量较少时,聚合物交联度较低,涂层易脱落。当TRIM用量过多时,过度交联也会降低聚合物的萃取效率。最终设定两者摩尔比为1:1时,能够保证自制涂层具有较好的萃取效果。

表1 不同功能单体和涂渍次数对MISPME涂层萃取效果的影响。

功能单体	峰面积 (LU*s)		涂渍次数	涂层厚度 (μm)	峰面积 (LU*s)	
	6-KT	6-BA			6-KT	6-BA
4-VP	60	88	n=1	0.64	130	179
HEMA	67	75	n=3	4.24	410	489
MAA	242	290	n=5	11.90	491	592

<sup>a</sup> SPME条件: 萃取溶剂正己烷, 萃取时间30 min, 萃取温度60°C, 转速400 rpm; 6-KT、6-BA均为0.1 μg/mL

## 3.2. MISPME涂层性能

### 3.2.1. 形貌分析

选取最佳聚合条件下制备的MISPME纤维涂层, 进行喷金处理后, 用环境扫描电镜观察其形貌特征。从图1显

### 3.1.2. 涂渍次数

采用多次共聚法, 在同一根纤维上反复涂渍, 评估涂层厚度对萃取性能的影响。表1可以看出, MISPME涂层的厚度随涂渍次数的增加而逐渐增大。经过5次涂渍, 涂层厚度可达11.90μm, 对6-KT和6-BA的萃取量达到最大。涂渍次数超过5次后, 过厚的涂层使表面均匀性下降, 也不利于在解析池中操作。

示, 涂层表面含有很多不规则的颗粒。进一步放大图可看出, 涂层具有疏松多孔和高度交联的结构, 适合萃取具有特定结构的目标物。

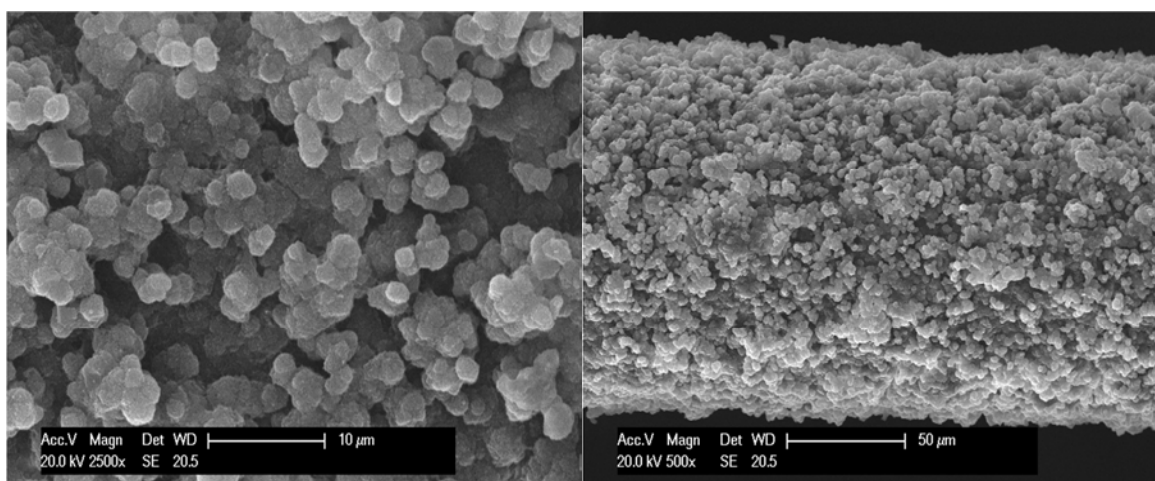


图1 6-KT-MISPME涂层的环境扫描电镜图(左: 放大2500倍; 右: 放大500)。

### 3.2.2. 耐溶剂性

SPME方法与HPLC在线联用时, 需要利用溶剂在解析池中将待测物从涂层中解析。因此, 需要考察涂层的耐溶剂能力。用乙醇、乙醇-乙酸(90:10, v/v)、甲醇、乙腈、丙酮、正己烷等有机溶剂浸泡MISPME涂层24h, 涂层仍然呈现良好的形貌特征。萃取30次后, 其萃取性能也未下降。表明该涂层耐溶剂性能良好, 并具有较长的使用寿命。

### 3.2.3. 涂层富集能力和选择性

在最佳萃取条件下, 将制得的MISPME及NISPME涂层直接萃取0.1μg/mL 6-KT和6-BA溶液, 与直接进样10μg/mL待测物的色谱图进行对比。从图2中可以看出, 相

同进样体积下, 经MISPME涂层萃取的2种物质的峰高显著增大, 6-KT和6-BA的富集因子分别为154、163。

选择吡啶乙酸(IAA)为对照物, 进一步考察涂层的萃取选择性[13]。研究发现, MISPME涂层对6-KT、6-BA和IAA的萃取量分别为700 pmol、730pmol和131pmol; NISPME涂层的萃取量仅为241 pmol、262pmol、142pmol(图3)。上述两种萃取量相除, 得到MISPME涂层对3种物质的选择性因子分别为2.90、2.78、0.92, 表明MISPME涂层对模板分子6-KT及其类似物6-BA具有较高的选择性, 而对结构差异大的IAA吸附量总体很少。

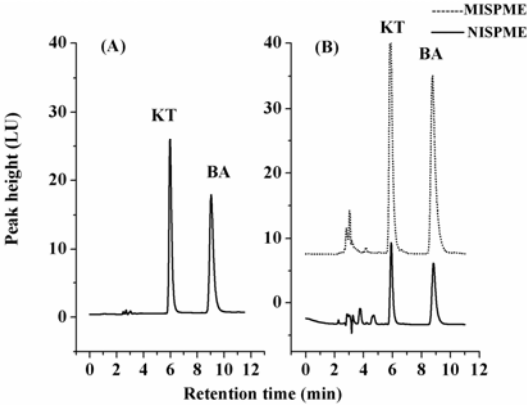


图2 萃取前后两种待测物的色谱对比图 (A) 直接进样10µg/mL6-KT和6-BA; (B) MISPME及NISPME涂层萃取0.1µg/mL6-KT和6-BA(最佳萃取条件: 萃取溶剂正己烷, 萃取时间30 min, 萃取温度60℃, 转速 400rpm, 解吸溶剂乙醇, 解吸时间10 min, 解吸体积15 µL)。

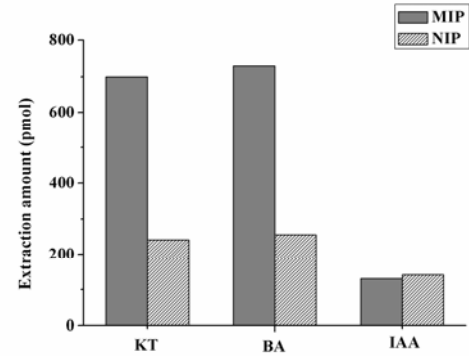


图3 6-KT-MISPME、NISPME涂层对3种物质 (0.1 µg/mL) 的萃取效果。

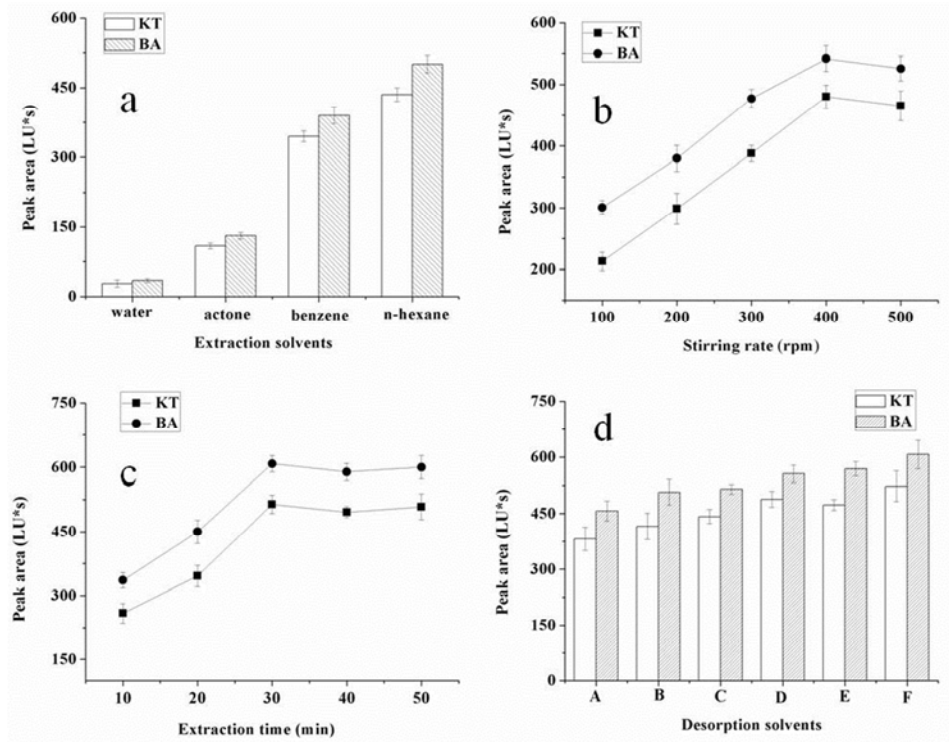


图4 各种萃取条件对涂层萃取性能的影响 (a萃取溶剂, b转速, c萃取时间, d解析溶剂; 6-KT、6-BA浓度均为0.1 µg/mL)。

3.3. SPME条件的优化

3.3.1. 萃取条件

研究了不同极性的4种溶剂 (极性顺序: 水>丙酮>苯>正己烷) 对MISPME涂层萃取效果的影响。结果表明 (图4a), 在正己烷溶液中, MISPME涂层对6-BA和6-KT有最好的响应; 增大溶剂的极性, 涂层萃取能力则随之下降。这是因为极性溶剂可能破坏分析物与MISPME涂层之间形成的氢键。

在SPME过程中, 搅拌可使涂层对分析物的萃取快速达到平衡。设置搅拌速度在100-500 rpm范围, 最后选择转速400rpm时, 既能保证MISPME涂层有较快的萃取效率, 又能使纤维萃取头经久耐用 (图4b)。萃取温度直接影响待测物在溶液中的扩散速度。温度升高, 待测物的萃取峰随之增大。由于萃取剂正己烷沸点在65℃左右, 考虑操作安全性, 最后选择萃取温度为60℃。优化涂层在10-60 min范围内的萃取性能 (图4c)。发现30 min后, 萃取基本达到平衡, 萃取量变化不大。

3.3.2. 解吸条件

分别考察了水 (A)、水-乙酸 (B, 90:10, v/v)、甲醇 (C)、甲醇-乙酸 (D, 90:10, v/v)、乙醇 (E)、乙醇-乙酸 (F, 90:10, v/v) 等溶剂体系对目标物解吸效果的影响。由图4d可得, 以上溶剂对待测物都有较好的解吸效果, 以乙醇 (E)、乙醇-乙酸 (F, 90:10, v/v) 的解析效果最佳。但少量乙酸的存在会使HPLC谱图基线变差。经优化解析体积和时间, 最终选择15µL乙醇解吸10 min, 就能实现涂层中目标物的快速、完全解吸。

### 3.4. 分析方法建立

采用外标法,分别绘制了不同浓度标准品溶液直接进样和MISPME涂层萃取不同浓度溶液的工作曲线。结果表明(表2),两种方法均具有良好的线性关系,相关系数

大于0.9903。直接进样时,最低检测限为0.3 $\mu\text{g/mL}$ ,而MISPME的方法检测限为0.3 $\text{ng/mL}$ (6-KT)、0.5 $\text{ng/mL}$ (6-BA),表明MISPME方法更加灵敏。

表2 直接进样与经SPME萃取后的分析方法参数。

分析物	直接进样			经过SPME		
	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数	检测限 ( $\mu\text{g/mL}$ )	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数	检测限 ( $\mu\text{g/mL}$ )
6-KT	0.8-10	0.9984	0.3	0.005-0.1	0.9903	$3\times 10^{-4}$
6-BA	0.8-10	0.9985	0.3	0.005-0.1	0.9918	$5\times 10^{-4}$

### 3.5. 实际样品分析

按实验步骤2.5处理白萝卜样品和环境水样。选择浓度分别为0.01、0.05、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 的6-KT和6-BA加入两种样品基质中,经SPME萃取后用HPLC分析。结果(表3)

显示,该方法平均回收率在88.6-109.3%之间。同时,环境水样杂峰较少,白萝卜样品基质稍显复杂,但总体不干扰测定(图5)。因此,所建立的MISPME法能消除基质干扰,适用于测定实际样品中的细胞分裂素。

表3 实际样品加标回收率及精密度(n=3)。

分析物	白萝卜加标回收率(RSD%)			水样加标回收率(RSD%)		
	0.01 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.05 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.08 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.01 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.05 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.08 ( $\mu\text{g/mL}$ )
6-KT	103.3 (12.1)	91.9 (4.2)	105.9 (6.1)	109.3 (9.8)	96.4 (7.8)	94.7 (4.1)
6-BA	88.6 (13.4)	90.2 (2.7)	101.6 (4.4)	93.8 (12.2)	89.4 (5.6)	92.0 (4.5)

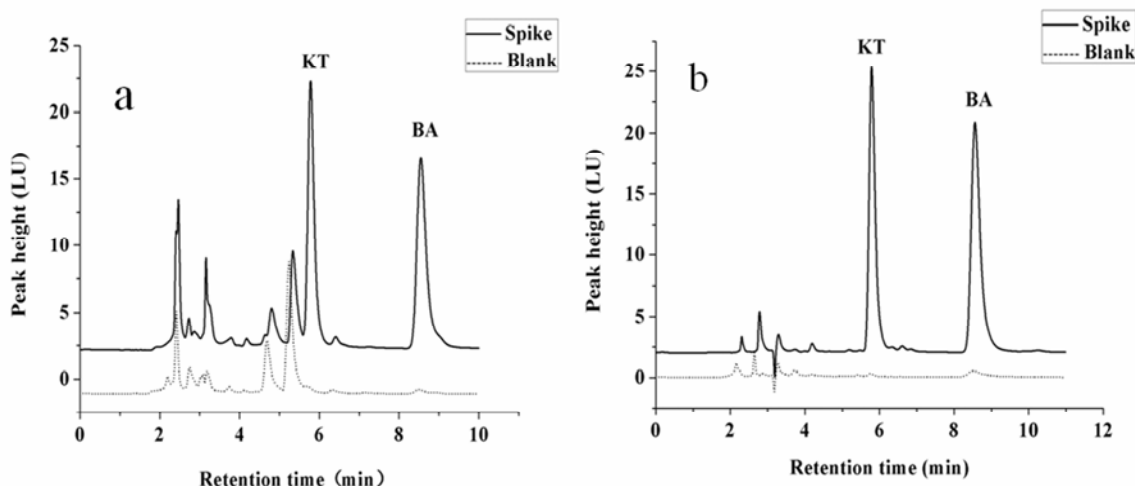


图5 实际样品(a:白萝卜, b:水)分析 加标6-KT和6-BA为0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 4. 结论

采用多次共聚法,自制6-KT-MISPME涂层对2种细胞分裂素类植物激素的最低检测限为0.3 $\text{ng/mL}$ ,选择性因子分别为2.90和2.78,富集因子高达2个数量级。方法的灵敏度和选择性都有较大提高,并成功应用于植物样品和环境水样分析。

## 致谢

本论文研究工作得到国家自然科学基金资助项目(21705026、21575028)、福建省自然科学基金资助项目(2016J01051)的支持。

## 参考文献

- [1] Koprna Radoslav, De Diego Nuria, Dundálková Lucie, Spíchal Lukáš. Use of cytokinins as agrochemicals [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2016, 24(3): 484-492.
- [2] 樊彪, 赵江哲. 细胞分裂素研究进展及其在作物生产中的应用[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(8): 1411-1414.
- [3] 吴艳歌, 毕波, 柴明良. 细胞分裂素对沟叶结缕草愈伤组织生长及其抗氧化系统的影响[J]. 核农学报, 2016, 30(7): 1288-1295.

- [4] 中华人民共和国国家卫生部, 农业部. 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量: GB 2763-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [5] Bel Bruno Joseph J. Molecularly imprinted polymers [J]. Chemical reviews, 2019, 119: 94-119.
- [6] 柯珍, 朱华, 钟世安, 邹登峰. 分子印迹技术及其应用研究进展 [J]. 化学研究与应用, 2018, 30(6): 865-874.
- [7] Guizhen Li, Kyung Ho Row. Recent applications of molecularly imprinted polymers (MIPs) on micro-extraction techniques [J]. Separation and Purification Reviews, 2018, 47(1): 1-18.
- [8] Shuyao Huang, Jianqiao Xu, Jiating Zheng, Fang Zhu, Lijun Xie, Gangfeng Ouyang. Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers in sample preparation [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(17): 3991-4014.
- [9] Koster E H M, Crescenzi C, Den H W, et al. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(13): 3140-3145.
- [10] Fuyou Du, Guihua Ruan, Shenghua Liang, Fuwei Xie, Huwei Liu. Monolithic molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of trace cytokinins in plant samples with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 404: 489-501.
- [11] 孙林, 杜甫佑, 阮贵华, 黄绎嘉. 分子印迹整体柱富集-高效液相色谱法测定植物中的痕量细胞分裂素 [J]. 色谱, 2013, 31(4): 392-396.
- [12] 张兰, 卢巧梅, 范良彪, 陈国南. 一种6-糠氨基腺嘌呤分子印迹聚合物及其应用 [P]. 中国: ZL201210190656.5, 2013-12-11.
- [13] Xiangli Sun, Jia He, Guorui Cai, Anqing Lin, Wenjie Zheng, Xuan Liu, Langxing Chen, Xiwen He, Yukui Zhang. Room temperature ionic liquid-mediated molecularly imprinted polymer monolith for the selective recognition of quinolones in pork samples [J]. Journal of Separation Science, 2010, 33: 3786-3793.