(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105218393 B
(45)授权公告日 2017.10.24

(21)申请号 201510468506.X

(22)申请日 2010.08.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105218393 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(30)优先权数据
61/237549 2009.08.27 US

(62)分案原申请数据
201080043818.1 2010.08.27

(73)专利权人 全技术公司
地址 美国肯塔基州

(72)发明人 亚历克桑德斯.伊安尼克里斯
斯蒂凡.奎特阔斯基
麻奴吉.宝佳帕.库杜鲍捷
克莱顿.马特尼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 翟建伟 石克虎

(51)Int.Cl.
C07C 235/52(2006.01)
C07C 231/12(2006.01)

(56)对比文件
WO 02059184 A2,2002.08.01,
WO 03101580 A1,2003.12.11,
CN 101308066 A,2008.11.19,
何庆华 等.分子印迹技术在真菌毒素检测中的应用.《食品科学》.2009,第30卷(第11期),第273-275页.
El-Sayed, Ragab A. 等.Synthesis of some new 5-chloro- and 3,5-dichlorosalicylamino acid, ester, amide, hydrazide and tripeptide derivatives with expected biological activities.《Proceedings of the Indian National Science Academy, Part A: Physical Sciences》.1997,第63卷(第3期),第260页图解和第262页表1.
Justus Jodlbauer 等.Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction.《Journal of Chromatography A》.2002,第945卷(第1-2期),第45-63页.

审查员 王化邦

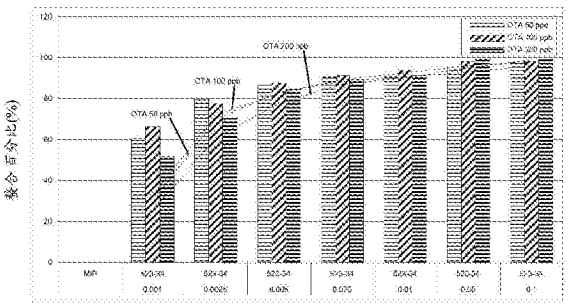
权利要求书1页 说明书49页 附图9页

(54)发明名称

合成真菌毒素吸附剂以及制备和使用所述合成真菌毒素吸附剂的方法

(57)摘要

本发明一般涉及合成真菌毒素吸附剂以及制备和使用所述合成真菌毒素吸附剂的方法,且涉及分子印迹聚合物(MIP)。特别地,本发明涉及能相对大量制备的可再用、生态友好的MIP,制备所述MIP的方法以及使用所述MIP的方法(例如,螯合和/或吸附靶化合物(例如,真菌毒素))。本发明的组合物和方法用于多种应用,其包括饮食治疗、预防剂、食品和饮料加工和制造以及研究、质量控制和溯源应用。



CN 105218393 B

1.用于合成N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸的方法,其包括:

a) 将3,5-二氯水杨酸转化为2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸;

b) 将2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸转化为2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯;

c) 使2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯与L-苯丙氨酸乙酯反应以形成N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯;以及

d) 将N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯转化为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。

2.如权利要求1所述的方法,其中d)中所述的转化包括水解N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯中的酯官能团。

合成真菌毒素吸附剂以及制备和使用所述合成真菌毒素吸附剂的方法

[0001] 本申请是申请日为2010年08月27日的中国专利申请201080043818.1“合成真菌毒素吸附剂以及制备和使用所述合成真菌毒素吸附剂的方法”的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请要求2009年8月27日提交的第61/237,549号美国临时申请的优先权,其整体内容通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明一般涉及分子印迹聚合物(MIP)。特别地,本发明涉及可再用、生态友好的MIP,制备所述MIP的方法以及使用所述MIP的方法(例如,螯合和/或吸附靶标(例如,真菌毒素))。本发明的组合物和方法用于多种应用,其包括饮食、治疗、预防剂、食品和饮料加工和制造以及研究和质量控制应用。

背景技术

[0005] 真菌毒素是由多种真菌分泌的次生代谢物,通常在收割之前、期间和之后在谷粒以及饲料中产生。饲料和谷物与真菌孢子自然接触。植物的真菌污染和毒素的生物合成取决于收割前植物的健康状况、气象条件、收割技术、在保存稳定之前的延迟和热液条件以及饲料加工。依赖于真菌,真菌生长由包括游离水量(a_w)、温度、氧气的存在、底物性质和pH条件在内的多种物理化学参数控制。真菌毒素在收割前以及收割后的储存中增殖。

[0006] 一些真菌仅在特定水平的水分、温度或氧气下产生毒素。真菌毒素影响的严重程度显著不同。一些真菌毒素为致命的,一些导致可识别的 疾病或健康问题,一些使免疫系统变弱而不产生对所述真菌毒素特异的症状,一些充当过敏原或刺激物而一些对动物或人不具有已知影响。在二战期间,俄国士兵在食用由镰刀菌(Fusarium)污染的发霉谷物后遭受严重的皮肤坏死、出血和骨质破坏。然而,直到二十世纪六十年代,当大于100,000只的英国火鸡由致命的肝病(火鸡X病)杀灭时,科学界才认识到与真菌毒素有关的负面影响(参见,例如,TrenholmH.L.,Charmley L.L.和Prelusky D.B.,1996.Mycotoxin binding agents:An update on what we know(真菌毒素结合剂:获知的最新报道).In:Biotechnology in the Feed Industry(Lyons T.P和Jacques K.A编辑)Nottingham University Press,Loughborough,Leics,UK,pp.327-349)。根据最近的联合国粮食和农业组织(FAO)报道,约25%的世界谷物供应受真菌毒素污染。真菌毒素污染对食品和饲料生产者,特别是谷物和家禽生产者具有负面经济影响。

[0007] 由于植物产品(例如,饲料、谷物、植物蛋白、加工的谷物副产品、粗饲料和糖蜜产品)的真菌感染而使真菌毒素能在食物链中出现,并能由人类直接食用或通过污染的谷物、牲畜或其它动物饲料而引入。真菌毒素在消化过程中显著耐分解,因此它们以可食用产品(例如,肉、鱼、蛋和乳制品)的形式或以吸收的母体毒素的代谢物形式而残留在食物链中。诸如蒸煮和冷冻的温度处理不是减少真菌毒素流行的适当方法。因此,亟需用于减少有害

影响和/或消除饲料和/或食物链中真菌毒素出现的组合物和/或方法。

发明内容

[0008] 本发明涉及分子印迹聚合物(MIP)。特别地,本发明涉及可再用、生态友好的MIP,制备所述MIP的方法以及使用所述MIP的方法(例如,螯合和/或吸附靶标(例如,真菌毒素))。本发明的组合物和方法用于多种应用,其包括饮食、治疗、预防剂、食品和饮料加工和制造以及研究和质量控制应用。

[0009] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含使用真菌毒素模板合成的分子印迹聚合物的组合物。本发明不限于用于产生分子印迹聚合物的真菌毒素模板。实际上,可使用多种真菌毒素模板,其包括但不限于 乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇(acetoxyscirpenediol),乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇,乙酰基雪腐镰刀菌烯醇,乙酰基新茄病镰刀菌烯醇,乙酰基T-2毒素,黄曲霉毒素,黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2,黄曲霉震颤毒素,细交链孢酸,格链孢酚,焦曲二醇,焦曲酰胺(austamide),焦曲斯汀(austocystin),燕麦镰孢菌素+1,白僵菌素+2,bentenolide,brevianamide,丁烯酸内酯,丽赤壳菌素,毛壳球菌素,毛壳素,毛壳菌素,橘霉素,黄绿青霉素,可皆霉素,细胞松弛素,环匹阿尼酸,脱乙酰丽赤壳菌素,脱乙酰新茄病镰刀菌烯醇,脱氧雪腐镰刀菌烯醇二醋酸酯,脱氧雪腐镰刀菌烯醇一醋酸酯,二乙酰氧基藨草镰刀烯醇,腐败菌素B,翘孢菌素,恩镰孢菌素,麦角生物碱毒素和诸如麦碱、麦角柯宁碱、麦角柯碱、麦角环肽、麦角新碱、麦角宁碱、麦角生碱、麦角胺、麦角缬氨酸、麦角醇、麦角酸的内生菌以及相关的差向异构体,产果镰孢菌素+1,烟曲霉素,伏马菌素,伏马菌素A1、A2、B1和B2及B3,镰刀菌烯酮-X,镰孢红素酮,镰孢菌酸,镰菌素,胶霉毒素,HT-2毒素,透明菌素,甘薯宁,岛青霉毒素,酪青霉毒素(isofumigaclavine)A和B,侧生赤霉素+1,线叶金鸡菊甙,番茄菌肽+1,畸形素,麦芽米曲霉素,串珠镰刀菌素,单乙酰氧基藨草镰刀烯醇,麦考酚酸,新茄病镰刀菌烯醇,雪腐镰刀菌烯醇,NT-1毒素,NT-2毒素,赭曲霉素,卵孢霉素,草酸,雀裨麦角生物碱A和B,棒曲霉素,青霉酸,青霉震颤素,拟茎点霉毒素,PR-毒素,杆孢菌素E,异烟棒曲霉素A和B,红色青霉毒素,瑰天精,黄梅精(rubrosulphin),细皱青霉素,sambucynin+1,葡萄穗霉毒素,F、G、H雪腐镰刀菌醇,西洛菌素,流涎素,甚孢菌素,丙曲霉素,苦马豆素,T-1毒素,T-2毒素,细交链孢菌酮酸,三乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇,单端孢霉烯族毒素,木霉素,单端孢菌素,trichoverrins,trichoverrols,色氨酸震颤素,粘液霉素,疣孢青霉原,轮枝孢菌素,紫红紫素,紫黄素,绿垂毒素,渥曼青霉素,黄青霉素,yavanicin+1,玉米赤霉烯醇,玉米赤霉酮,玉米烯酮α、β,玉米赤霉酮α、β,赤霉醇以及它们的亚科和/或衍生物和/或轭合物。在一些优选实施方案中,真菌毒素模板为OTA。在其它优选实施方案中,真菌毒素模板为甚孢菌素或麦角生物碱。在一些实施方案中,赭曲霉素模板为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨 酸。在一些实施方案中,甚孢菌素模板为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。然而,本发明不限于这些赭曲霉素或甚孢菌素模板。实际上,可使用多种不同的模板,包括N-叔丁氧基羰基-2,3-二甲氧基苯胺、2,3-二甲氧基苯胺、3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙酯、6,7-二甲氧基靛红或6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了制备分子印迹聚合物的方法,其包括:提供真菌毒素模板以及一种或多种单体和一种或多种交联剂;以及在存在真菌毒素模板时允许一种

或多种单体和一种或多种交联剂聚合的条件下，使真菌毒素模板与一种或多种单体和一种或多种交联剂接触。在一些实施方案中，真菌毒素模板为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，真菌毒素模板为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。本发明不限于所使用的真菌毒素模板。实际上，多种合成的分子能用作真菌毒素模板，其中所述合成的分子模拟天然真菌毒素的结构、形状和/或其它化学性质中的一种或多种。类似地，本发明不限于所使用的单体类型。例如，多种单体对本领域一般技术人员而言是已知的，并且包括但不限于2-乙烯基吡啶、2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸。类似地，本发明不限于所使用的交联剂类型。例如，多种交联剂对本领域一般技术人员而言是已知的，并且包括但不限于乙二醇二甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中，尽管可以使用较低(例如，50摄氏度、45摄氏度、40摄氏度、35摄氏度、30摄氏度或更低)和较高(例如，115摄氏度、120摄氏度、125摄氏度、130摄氏度或更高)的温度，但在55摄氏度至110摄氏度的温度下通过在有机溶剂中形成自由基而引发聚合。在一些实施方案中，通过偶氮异丁腈(AIBN)的热引发分解而形成自由基。本发明不受所使用的有机溶剂类型限制。在一些实施方案中，有机溶剂为甲苯、环己烷、乙腈、聚乙烯醇(PVA)/水溶液以及甲苯、环己烷、乙腈和PVA/水溶液的两种或多种的混合物。在一些实施方案中，温度为55摄氏度至75摄氏度。在一些实施方案中，在聚合一种或多种单体和一种或多种交联剂之后，从分子印迹聚合物中去除真菌毒素模板。在一些实施方案中，将由溶液进行的一次或多次洗涤用于从分子印迹聚合物中去除真菌毒素模板。本发明不受洗涤所使用的溶液类型的限制。在一些实施方案中，溶液为有机溶剂、缓冲液、水或其组合。本发明不受所使用的有机溶剂类型的限制。在一些实施方案中，有机溶剂为乙醇、甲醇、乙腈、甲苯和/或其混合物。在一些实施方案中，缓冲液为通过使氢氧化钠、柠檬酸、琥珀酸和醋酸反应而制备的缓冲液。在一些实施方案中，水为去离子水。在一些实施方案中，在一次或多次洗涤之后，干燥分子印迹聚合物。在一些实施方案中，将分子印迹聚合物暴露于20摄氏度至90摄氏度(例如，60摄氏度至80摄氏度、75摄氏度至80摄氏度)以用于干燥分子印迹聚合物，尽管可使用更低或更高的温度。

[0011] 在一些实施方案中，本发明提供了从材料中螯合真菌毒素的方法，其包括提供包含真菌毒素的材料；以及在真菌毒素模板存在下通过聚合一种或多种单体和一种或多种交联剂而生成分子印迹聚合物；以及在允许分子印迹聚合物结合真菌毒素的条件下使分子印迹聚合物与包含真菌毒素的材料接触。本发明不受从材料中螯合的真菌毒素(例如，靶向分离)类型限制。实际上，多种真菌毒素可被螯合，其包括但不限于乙酰氧基蔗草镰刀菌烯二醇、乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、乙酰基雪腐镰刀菌烯醇、乙酰基新茄病镰刀菌烯醇，乙酰基T-2毒素，黄曲霉毒素，黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2，黄曲霉震颤毒素，细交链孢酸，格链孢酚，焦曲二醇，焦曲酰胺，焦曲斯汀，燕麦镰孢菌素+1，白僵菌素+2，bentenolide，brevianamide，丁烯酸内酯，丽赤壳菌素，毛壳球菌素，毛壳素，毛壳菌素，橘霉素，黄绿青霉素，可皆霉素，细胞松弛素，环匹阿尼酸，脱乙酰丽赤壳菌素，脱乙酰新茄病镰刀菌烯醇，脱氧雪腐镰刀菌烯醇二醋酸酯，脱氧雪腐镰刀菌烯醇一醋酸酯，二乙酰氧基蔗草镰刀烯醇，腐败菌素B，翘孢菌素，恩镰孢菌素，麦角生物碱毒素和诸如麦碱、麦角柯宁碱、麦角柯碱、麦角环肽、麦角新碱、麦角宁碱、麦角生碱、麦角胺、麦角缬氨酸、麦角醇、麦角酸的内生菌以及相关的差向异构体，产果镰孢菌素+1，烟曲霉素，伏马菌素，伏马菌素A1、A2、B1和B2及B3，镰刀菌烯酮-X，镰孢红素酮，镰孢菌酸，镰菌素，胶霉毒素，HT-2毒素，透明菌素，甘薯宁，岛青霉

毒素，酪青霉毒素A和B，侧生赤霉素+1，线叶金鸡菊甙，番茄菌肽+1，畸形素，麦芽米曲霉素，串珠镰刀菌素，单乙酰氧基蔗草镰刀烯醇，麦考酚酸，新茄病镰刀菌烯醇，雪腐镰刀菌 烯醇，NT-1毒素，NT-2毒素，赭曲霉素，卵孢霉素，草酸，雀裨麦角生物碱A和B，棒曲霉素，青霉酸，青霉震颤素，拟茎点霉毒素，PR-毒素，杆孢菌素E，异烟棒曲霉素A和B，红色青霉毒素，瑰天精，黄梅精，细皱青霉素，sambucynin+1，葡萄穗霉毒素F、G、H，雪腐镰刀菌醇，西洛菌素，流涎素，葚孢菌素，丙曲霉素，苦马豆素，T-1毒素，T-2毒素，细交链孢菌酮酸，三乙酰氧基蔗草镰刀菌烯二醇，单端孢霉烯族毒素，木霉素，单端孢菌素，trichoverrins，trichoverrols，色氨酸震颤素，粘液霉素，疣孢青霉原，轮枝孢菌素，紫红紫素，紫黄素，绿垂毒素，渥曼青霉素，黄青霉素，yavanicin+1，玉米赤霉烯醇，玉米赤霉酮，玉米烯酮α、β，玉米赤霉酮α、β，赤霉醇以及它们的亚科和/或衍生物。在一些优选实施方案中，从材料中分离的真菌毒素为赭曲霉素A。在一些优选实施方案中，真菌毒素为葚孢菌素。在一些实施方案中，包含真菌毒素的材料为饮料、食品、动物饲料、药物组合物、营养品组合物、化妆品组合物、维持生命必需的物质或其它材料。在一些实施方案中，维持生命必需的物质为用于水产业的培养基和包含氧气的气体样品。在一些实施方案中，不从包含真菌毒素的材料中分离与真菌毒素结合的分子印迹聚合物。在一些实施方案中，从材料中螯合真菌毒素的方法还包括从包含真菌毒素的材料中分离与真菌毒素结合的分子印迹聚合物。在一些实施方案中，分离包括从包含真菌毒素的材料中萃取、浓缩和分隔与真菌毒素结合的分子印迹聚合物。在一些实施方案中，分离发生在色谱或分离柱或筒中。在一些实施方案中，在分离之后，通过洗涤从分子印迹聚合物中去除与分子印迹聚合物结合的真菌毒素。在一些实施方案中，在从分子印迹聚合物中去除后，定性和定量分析真菌毒素。在一些实施方案中，定量和定性分析用于溯源(例如，通过记载已记录的标识来辨认和/或相互关联项目的年表、位置和/或应用(例如，所发现真菌毒素的位置、类型和量))。在一些实施方案中，将已经去除真菌毒素的分子印迹聚合物再使用以从包含真菌毒素的材料中螯合真菌毒素。在一些实施方案中，分子印迹聚合物吸附比其重量大1至10倍(例如，大1至5倍，大1至2倍)的水。在一些实施方案中，使两种或多种不同的分子印迹聚合物与包含真菌毒素的材料接触以从材料中螯合两种或多种特定的真菌毒 素。

[0012] 本发明还提供了用于合成N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸的方法，其包括将3-5二氯水杨酸转化为2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸；将2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸转化为2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯；使2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯与L-苯丙氨酸乙酯反应以形成N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸；以及将N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸转化为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，转化包括水解N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸中的酯官能。

[0013] 本发明还提供了用于合成5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红的方法，其包括将2,3-二甲氧基苯甲酸转化为2,3-二甲氧基-N-叔丁氧基羰基苯胺；将2,3-二甲氧基-N-叔丁氧基羰基苯胺转化为2,3-二甲氧基苯胺；使2,3-二甲氧基苯胺与酮基丙二酸二乙酯反应以形成6,7-二甲氧基-3-羟基-3-(2-吲哚酮)-羧酸乙酯；将6,7-二甲氧基-3-羟基-3-(2-吲哚酮)-羧酸乙酯转化为6,7-二甲氧基靛红；将6,7-二甲氧基靛红转化为6,7-二甲氧基-1-甲基靛红；以及将6,7-二甲氧基-1-甲基靛红转化为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0014] 本发明还提供了合成对真菌毒素有特异性的分子印迹聚合物的方法，其包括生成能够促进MIP与真菌毒素结合的模板化合物；在包含非极性、非质子溶剂的溶剂体系中，在包含MIP单体和交联剂的反应中结合模板化合物；以及通过选自将反应物容器暴露于高温或将反应物容器暴露于UV照射的行为来促进聚合。在一些实施方案中，真菌毒素包含赭曲霉素A，然而，本发明不受这样的限制。实际上，根据本文的描述，能合成多种对真菌毒素有特异性的分子印迹聚合物，包括但不限于对下述有特异性的MIP：乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇，乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇，乙酰基雪腐镰刀菌烯醇，乙酰基新茄病镰刀菌烯醇，乙酰基T-2毒素，黄曲霉毒素，黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2，黄曲霉震颤毒素，细交链孢酸，格链孢酚，焦曲二醇，焦曲酰胺，焦曲斯汀，燕麦镰孢菌素+1，白僵菌素+2，bentenolide，brevianamide，丁烯酸内酯，丽赤壳菌素，毛壳球菌素，毛壳素，毛壳菌素，橘霉素，黄绿青霉素，可皆霉素，细胞松弛素，环匹阿尼酸，脱乙酰丽赤壳菌素，脱乙酰新茄病镰刀菌烯 醇，脱氧雪腐镰刀菌烯醇二醋酸酯，脱氧雪腐镰刀菌烯醇一醋酸酯，二乙酰氧基藨草镰刀烯醇，腐败菌素B，翘孢菌素，恩镰孢菌素，麦角生物碱毒素和诸如麦碱、麦角柯宁碱、麦角柯碱、麦角环肽、麦角新碱、麦角宁碱、麦角生碱、麦角胺、麦角缬氨酸、麦角醇、麦角酸的内生菌和相关的差向异构体，产果镰孢菌素+1、烟曲霉素、伏马菌素、伏马菌素A1、A2、B1和B2及B3，镰刀菌烯酮-X，镰孢红素酮，镰孢菌酸，镰菌素，胶霉毒素，HT-2毒素，透明菌素，甘薯宁，岛青霉毒素，酪青霉毒素A和B，侧生赤霉素+1，线叶金鸡菊甙，番茄菌肽+1，畸形素，麦芽米曲霉素，串珠镰刀菌素，单乙酰氧基藨草镰刀烯醇，麦考酚酸，新茄病镰刀菌烯醇，雪腐镰刀菌烯醇，NT-1毒素，NT-2毒素，赭曲霉素，卵孢霉素，草酸，雀裨麦角生物碱A和B，棒曲霉素，青霉酸，青霉震颤素，拟茎点霉毒素，PR-毒素，杆孢菌素E，异烟棒曲霉素A和B，红色青霉毒素，瑰天精，黄梅精，细皱青霉素，sambucynin+1，葡萄穗霉毒素F、G、H，雪腐镰刀菌醇，西洛菌素，流涎素，葚孢菌素，丙曲霉素，苦马豆素，T-1毒素，T-2毒素，细交链孢菌酮酸，三乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇，单端孢霉烯族毒素，木霉素，单端孢菌素，trichoverrins，trichoverrols，色氨酸震颤素，粘液霉素，疣孢青霉原，轮枝孢菌素，紫红紫素，紫黄素，绿垂毒素，渥曼青霉素，黄青霉素，yavanicin+1，玉米赤霉烯醇，玉米赤霉酮，玉米烯酮α、β，玉米赤霉酮α、β，赤霉醇以及它们的亚科和/或衍生物。在一些实施方案中，模板包含N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，模板包含5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。本发明不限于任何特殊的单体或交联剂。实际上，可使用包括本文描述的那些的多种单体和交联剂。在一些实施方案中，方法还包含洗涤所述分子印迹聚合物以去除模板。在一些实施方案中，洗涤包括使用溶液(例如，稀释的碱溶液、稀释的酸溶液或水)洗涤1次、2次、3次、4次或更多次以去除模板。

附图说明

[0015] 图1示出赭曲霉素A和N-(3,5-二氯-2-羟基苯甲酰基)-L-苯丙氨酸(OTA模板)。

[0016] 图2示出N-(3,5-二氯-2-羟基苯甲酰基)-L-苯丙氨酸(OTA模板)合成途径。

[0017] 图3示出在几种比例的夹杂下OTA的MIP-OTA螯合功效。

[0018] 图4示出在×15,000的放大率和3.0keV下在日立S-4300扫描电子显微镜上观察到的MIP-OTA。

[0019] 图5示出对3种不同浓度的OTA的5种不同水平的夹杂的MIP(在甲苯-环己烷混合物

中所合成的)螯合亲合力。

[0020] 图6示出由苯乙烯和2-乙烯基吡啶作为功能单体制成并随热引发或低温以及UV引发而聚合的MIP对OTA的螯合活性。报道了在柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)洗涤后和在100％甲醇洗涤后初始吸附和剩余吸附的数值。

[0021] 图7示出由苯乙烯和2-乙烯基吡啶为功能单体制成并随低温和UV引发而聚合的MIP对多酚和3-吲哚醋酸的螯合活性。报道了初始吸附值。

[0022] 图8示出涂覆有MIP-OTA的玻璃纤维网的照片,以及其在50mL离心管使用以在酒中用于OTA螯合。

[0023] 图9示出使用四种不同的聚合条件,涂覆在玻璃纤维网上并使用包含加入浓度为50ppb、100ppb、200ppb的OTA的白酒而测试的三种水平的MIP-OTA的螯合试验结果。

[0024] 图10出使用三种三元聚合条件,涂覆在玻璃纤维网上并在加入浓度为50ppb、100ppb、200ppb的OTA的白酒中进行测试的三种水平的NIP的螯合试验结果。

[0025] 图11示出使用荧光检测器记录的OTA标准溶液的色谱图和用于最优化真菌毒素保留时间的梯度选择。

[0026] 图12示出甚孢菌素和甚孢菌素模板(5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红)的分子结构。

[0027] 图13示出甚孢菌素模板合成途径。

[0028] 图14示出在几种比例的夹杂下,通过MIP-甚孢菌素和NIP对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的螯合功效。

[0029] 图15示出MIP和NIP的胶霉毒素的螯合活性以及在使用增加水平的甲醇进行六次连续洗涤之后的相互作用的稳定性/特异性,所述MIP和NIP使用热引发或低温/UV引发的聚合而合成。

[0030] 图16示出MIP和NIP的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的螯合活性以及在使用增加水平的甲醇进行六次连续洗涤之后的相互作用的稳定性/特异性,所述MIP和NIP使用热引发或低温/UV引发的聚合而合成。

具体实施方式

[0031] 定义

[0032] 如本文所用,术语“分子印迹聚合物”或“MIP”是指选择性结合特定化合物的合成聚合物。在优选实施方案中,在还称为模板化合物的靶化合物存在下合成分子印迹聚合物,生成对特定靶化合物(例如,真菌毒素)具有高度亲合力的MIP。通常,使用模拟天然靶标(例如,天然真菌毒素)的结构、形状和/或其它化学性质的模板(例如,合成构造的分子/配体/模板(例如,合成的真菌毒素模板))和诸如单体和/或交联剂的其它组分来构造聚合物。例如,将模板化合物混入预聚混合物并使其与单体形成缔合物。然后,使混合物适当地与模板化合物聚合。一旦形成聚合物,就将模板化合物去除,留下对模板(或与模板类似的其它组合物(例如,天然真菌毒素))具有亲合力的互补腔。将这样的区域(例如,腔或其它区域)调整以结合待靶标化合物,产生对这类化合物的高亲合力。

[0033] 值得注意的是,当特定的靶标化合物用于形成分子印迹聚合物时,聚合物可能对不同于但类似于靶标化合物的一类化合物具有高亲合力。例如,分子印迹聚合物可结合大

量在形状、电荷密度、几何形状或其它物理或化学性质方面与模板化合物(例如,合成的真菌毒素模板)类似的化合物。

[0034] 如本文所用,术语“聚合物”是指由通常通过形成网络的共价化学键连接的重复结构单元而形成的分子(大分子)。

[0035] 如本文所用,术语“模板化合物”或“靶化合物”是指通过随后聚合的配体(例如,单体)而复合的化合物,其形成分子印迹聚合物。模板化合物包括有机化合物(例如,真菌毒素、多肽和蛋白质)以及无机化合物(例如,矿物和重金属)。如本文所用,术语“真菌毒素模板”是指模拟天然真菌毒素(例如,赭曲霉毒素、甚孢菌素等)的结构、形状和/或其它化学特性的合成构造的分子。本发明不受所使用的真菌毒素模板类型限制。实际上,可使用多种真菌毒素,包括但不限于黄曲霉毒素:黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2、M1、P1、Q1,丙曲霉素和亚科、黄曲霉毒醇;单端孢霉烯族毒素:脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二乙酰氧基藨草镰刀烯醇、单乙酰氧基藨草镰刀烯醇、藨草镰刀菌烯醇、T-2毒素、HT-2毒素、T-2四醇、镰刀菌烯酮X、镰菌素C、镰孢菌酸、镰孢红素酮、黄色镰刀菌素、层出镰孢菌素、新茄病镰刀菌烯醇、雪腐镰刀菌烯醇以及代谢物和亚科;伏马菌素:伏马菌素A1、A2、B1、B2、B3和亚科;赭曲霉素:赭曲霉素A、B、α、β和代谢物;玉米烯酮、玉米赤霉烯醇α、β、玉米赤霉酮、赤霉醇α、β、赤霉醇和代谢物;棒曲霉素、胶霉毒素、麦考酚酸、串珠镰刀菌素、环匹阿尼酸、橘霉素、白僵菌素、黄绿青霉素、细胞松弛素H;青霉酸、PR-毒素、异烟棒曲霉素A、B、红色青霉毒素和亚科;麦角生物碱:麦角胺、棒麦角生物碱;酪青霉毒素A、B;雀裨麦角生物碱A、B、黄曲霉震颤毒素、青霉震颤素和亚科;拟茎点霉毒素:拟茎点霉毒素A和亚科;粘液霉素A、疣孢青霉原和亚科;甚孢菌素和亚科;流涎素、苦马豆素、细交链孢菌酮酸、格链孢酚、渥曼青霉素及本文描述的其它真菌毒素。

[0036] 如本文所用,术语“单体”是指可能变为与其它单体化学结合以形成聚合物的分子。

[0037] 如本文所用,术语“交联”和“交联剂”是指含有两个、三个或四个能与两个或多个单体连接以形成聚合物网络的双键的分子。

[0038] 如本文所用,术语“结构单元”是指聚合物链的构建单元(building block),并与重复单元相关。

[0039] 如本文所用,术语“阴离子的”或“阴离子”是指具有负电荷的离子。

[0040] 如本文所用,术语“阳离子的”或“阳离子”是指具有正电荷的离子。该术语能指含有正电荷的聚合物,例如分子印迹聚合物。

[0041] 如本文所用,本文使用的术语“酸”是指能供给质子和/或接受电子的任何化合物。如本文所用,术语“碱”是指能接受质子和/或供给电子或氢氧根离子的任何化合物。如本文所用,术语“盐”是指可衍生自无机或有机酸和碱的化合物。

[0042] 如本文所用,术语“渗出”是指在MIP若干洗涤阶段之后,仍与MIP 缔合并持续从MIP中解离以及干扰其吸附活性的模板剩余部分。

[0043] 如本文所用,术语“致孔的/致孔剂”是指用于改变聚合物上的腔(例如,MIP的腔)尺寸的物质、分子、缓冲液、溶剂(例如,甲苯、二甲苯、乙苯),而聚合物与致孔剂比直接与最终结构的孔隙率的量有关。

[0044] 如本文所用,术语“孔隙率”是指能保持气体或液体或允许其通过的材料中孔隙空

间(例如,MIP腔)的量度。

[0045] 如本文所用,术语“聚合”是指使单体分子在化学反应中一起反应以形成三维网络或聚合物链的过程。

[0046] 如本文所用,术语“沉淀”是指在化学反应过程期间在溶液中固体的形成。当反应发生时,将形成的固体称为沉淀物,并将残留在固体上的液体称为上层清液。

[0047] 如本文所用,术语“离心”是指使用由旋转转子(其使物体围绕固定轴旋转)产生的离心力、即施加垂直于轴的力来通过尺寸或密度而分离分子的过程。在将离心加速度用于将较大和较小密度的物质均匀分配为不同密度层时,使用沉降原理运行离心机。

[0048] 如本文所用,术语“浓度”是指每一确定空间的物质量。通常,根据质量每体积单位来表示浓度。为了稀释溶液,必须加入更多的溶剂或减少溶质的量(例如,通过选择性分离、蒸发、喷雾干燥、冷冻干燥)。相比之下,为了浓缩溶液,必须减少溶剂的量。

[0049] 如本文所用,术语“层”是指通常在材料层次中排列有序的水平沉淀物,其形成在通过与材料密度性质有关的离心或沉降分离之后而获得的覆盖(overlaying)部分或片段。

[0050] 如本文所用,术语“纯化的”或“纯化”是指从样品中去除异质组分。当用于化学背景下时,“纯化的”或“纯化”是指从异质、不期望或污染的物质中物理分离目标化学物质。纯化有机分子的常用方法包括但不限于下列:亲和纯化、机械过滤、离心、蒸发、杂质萃取、在其它组分不溶的溶剂中溶解、结晶、吸附、蒸馏、分馏、升华、熔化、精炼、电解和透析。

[0051] 如本文所用,术语“干燥”是指减少或消除物质中的液体的任何种类的方法。

[0052] 如本文所用,术语“喷雾干燥”是指干燥包含液体的物质的方法,其 使用热空气以蒸发液体从而减少或消除物质中的液体。换言之,通过喷雾或雾化进入一股热干燥空气中而干燥物质。

[0053] 如本文所用,术语“干燥自由流动的粉末”是指自由流动的干燥粉末。

[0054] 如本文所用,术语“研磨”是指通过压缩、剪切或摩擦而减小粒径。

[0055] 如本文所用,术语“洗涤”是指去除或清洗(例如,使用任何类型的溶质(例如,蒸馏水、缓冲液或溶剂或混合物))杂质或制剂的可溶性不期望组分(例如,可将MIP洗涤以从样品中去除模板组分)。

[0056] 如本文所用,术语“分析物”是指原子、分子、物质或化学成分。通常,分析物本身不可检测,而分析物的方面或性质(物理、化学、生物学等)能使用诸如高效液相色谱(简写为HPLC)的分析步骤进行测定。例如,通常不检测本身的“椅式构象”(分析物组分)而检测椅式构象的高度、宽度等。类似地,通常不检测真菌毒素而检测真菌毒素的一种或多种性质(例如,与其稳定性、浓度或生物学活性相关的真菌毒素荧光性)。

[0057] 如本文所用,术语“样品”用于包括来自任何来源的样本(例如,合成的、生物学和环境样品)的广义。合成的样品包括人工制备的任何材料(例如,MIP)。可从动物(包括人类)获得生物学样品,并且其包含液体、固体、组织和气体。生物学样品包括血液产物,例如血浆、血清等。环境样品包括诸如表面物质、土壤、水、水晶和工业样品的环境材料。

[0058] 如本文所用,术语“高效液相色谱”和术语“HPLC”是指分离化合物的液体色谱的一种形式。将化合物溶解在溶液中。通过将样品混合物注射在柱上,溶剂或溶剂混合物通过所述柱流动以从柱中洗脱混合物的组分来分离化合物。HPLC仪器包括流动相储存器、泵、注射器、分离柱和检测器。通过定量检测折射指数、在设置波长处的UV-VIS吸收、在使用合适波

长激发后的荧光性或电化学响应的变化来记录柱流出物中分析物的存在。

[0059] 如本文所用，术语“信号”通常用于指示反应已经发生(例如，抗体与抗原的结合)的任何可检测方法。能定性以及定量评价信号。“信号”类型的实例包括但不限于辐射信号、荧光信号或比色产物/试剂信号。

[0060] 如本文所用，术语“扫描电子显微镜”和术语“SEM”是指一种类型的电子显微镜，其使用光栅扫描模式的高能电子束扫描样品表面使其成像。电子与组成样品的原子相互作用，产生包含与样品表面分布状况、组成和诸如导电性的其它性质有关的信息的信号。

[0061] 如本文所用，术语“固定剂”是指能够将一种物质与另一种物质固定以“固定”、稳定或以其它方式保持物质处于其目前形式从而防止物质降解或发生其它形式的变化的化学物。通常，将固定剂用于扫描电子显微镜(SEM)以制备样品。

[0062] 如本文所用，术语“体内”是指在活生物体内进行的研究和/或实验，其发生在生物有机体内。

[0063] 如本文所用，术语“体外”是指活生物体外的人工环境并且是指通常在有机体内发生但使其在人工环境中发生的生物过程或反应。体外环境的实例包括试管和细胞培养基。

[0064] 如本文所用，术语“原位”是指处于反应混合物的状态。

[0065] 如本文所用，术语“体外”是指在最小改变天然状态的有机体外部的人工环境中，在活组织中或活组织上进行的研究和/或实验和/或应用。

[0066] 如本文所用，术语“吸收”是指材料“摄取”或“吸取”另一物质所经过的过程。例如，“吸收”可能是指通过扩散或渗透来将物质吸收或消化进入细胞或穿过组织和器官的过程(例如，通过消化系统吸收营养物或吸收药物进入血流中)。

[0067] 如本文所用，术语“吸附(adsorb)”和“吸附(adsorbtion)”是指当材料通过组合物(螯合剂和/或吸附剂)而螯合或累积(例如，在所述组合物的表面上)时发生的过程，或者是指组合物(例如，MIP)与样品中的靶分子(例如，真菌毒素)结合的过程(例如，用于从样品中去除靶分子)。

[0068] 如本文所用，术语“吸附作用”是指吸附和吸收二者。

[0069] 如本文所用，术语“螯合(sequester)”和/或术语“螯合(sequestration)”是指两种或多种彼此接触(例如，从而形成络合物)的实体的物理缔合(例如，通过键合(例如，氢键合、离子键合、共价键合或其它类型的键合)。缔合的示例性形式包括但不限于氢键合、配位和离子对形成。螯合相互作用可包括依赖各个实体的立体化学和几何形状的大量化学相互作用(例如，化学键)(例如，进一步定义螯合的特异性)。当螯合两种或多种实体时，它们不但可通过化学键而螯合，还可通过电荷、偶极-偶极或其它类 型的相互作用而缔合。

[0070] 如本文所用，术语“螯合剂(sequestration agent)”和/或“螯合剂(sequestering agent)”是指能够与第二实体形成络合物的实体。

[0071] 如本文所用，术语“络合物”是指通过两种或多种单独的实体间的缔合而形成的实体(例如，其中实体为相同或不同(例如，相同或不同的化学类别)的两种或多种实体间的缔合)。缔合可以通过共价键或非共价键(例如，通过范德华、静电、电荷相互作用、疏水相互作用、偶极相互作用、和/或氢键结合力(例如，聚氨酯连接、酰胺连接、酯连接及其组合))。

[0072] 如本文所用，术语“有效量”是指足以实现有益或期望结果的组合物(例如，MIP)的量。有效量能被给予和/或与在一种或多种给药、应用或剂量中的另一材料混合，并且不旨

在限于特定剂型或给药途径。

[0073] 如本文所用，术语“动物”是指动物界的那些。这包括但不限于家畜、农场动物、家禽、宠物动物、海洋和淡水动物及野生动物。

[0074] 如本文所用，术语“饲料”是指由个体(例如，人和/或动物个体(例如，其向个体饮食贡献能量和/或营养物))消耗的材料。饲料的实例包括但不限于乳制品、果汁、谷物、水果、蔬菜、肉、全混合日粮(TMR)、饲料、颗粒饲料、浓缩物、预混合料、副产物、谷物、酒糟、糖浆、纤维、粗饲料、草、干草、麦粒、叶片、膳食、可溶物和营养补给物。

[0075] 如本文所用，“消化系统”是指其中消化能够发生或发生的系统(包括胃肠系统)。

[0076] 如本文所用，术语“消化(digest)”或“消化(digestion)”是指食物、饲料或其它有机化合物转化为可吸收形式；是指通过热和水分或化学作用软化、分解或分解(breakdown)。

[0077] 如本文所用，术语“生物利用度”是指对有机体有效或实现全身循环的分子或组分的部分。当静脉注射给予分子或组分时，其生物利用度为100％。然而，当通过其它途径(诸如口服)给予分子或组分时，其生物利用度降低(由于不完全吸收和首过代谢)。

[0078] 如本文所用，术语“给药”和术语“给予”是指给予包括药物、前药或其它试剂的物质的行为，或给予个体(例如，个体或体内、体外、或体外细胞、组织和器官)治疗处理的行为。给药的示例性途径能为通过眼睛(眼给 药)、嘴(口服给药)、皮肤(局部给药或经皮给药)、鼻子(鼻腔给药)、肺(吸入给药)、口腔黏膜(颊给药)、耳、直肠、阴道、通过注射(例如，静脉注射、皮下注射、瘤内注射、腹腔内注射等)等。

[0079] 如本文所用，术语“共同给药”和术语“共同给予”是指对个体和/或材料(例如，饲料)给予至少两种试剂或治疗。两种或多种试剂或治疗的共同给药能同时发生，或能在第二试剂/治疗之前给予第一试剂/治疗。

[0080] 如本文所用，术语“治疗”是指改善和/或逆转疾病的迹象或症状(例如，霉菌中毒)。术语“治疗”是指疗法治疗和预防剂或预防性检测。例如，可能从使用本发明的组合物和方法的治疗中受益的个体包括已经患有疾病和/或病症(例如，霉菌中毒)以及其中疾病和/或病症被预防(例如，使用本发明的预防剂治疗)的那些。

[0081] 如本文所用，术语“真菌毒素”是指由各种真菌种制备的有毒和/或致癌化合物。

[0082] 如本文所用，术语“霉菌中毒”是指真菌毒素通过人或动物体的阻挡屏障的疾病状态。能将霉菌中毒视为感染或疾病并可能对受其折磨的那些具有有毒影响。

[0083] 如本文所用，术语“疾病”、“感染”和“病理学疾病状态或反应”是指与正常状态的存活个体(例如，人和/或动物)或任何其器官或组织的损伤(中断或改变正常功能性能)有关的状态、迹象和/或症状，并可对环境因素(例如包括霉菌中毒的营养不良、工业危害或气候)、特定的传染试剂(例如蠕虫、变形虫、细菌、病毒、朊病毒等)进行反应或对有机体的固有缺陷(例如各种基因异常现象)进行反应或对这些的组合及其它因素进行反应。

[0084] 如本文所用，术语“处于疾病的危险”是指倾向于经历特殊疾病的个体。该倾向可为遗传性的(例如，经历诸如可遗传病症的疾病的特殊遗传倾向)或由其它因素(例如，年龄、体重、环境条件、暴露于有害化合物(例如，环境中存在的化合物，等))产生。

[0085] 如本文所用，术语“患有疾病”是指经历特殊疾病的个体(例如，动物或人个体)并且不限于任何特殊的迹象或症状或疾病。

[0086] 如本文所用，术语“有毒的”是指与在接触或给药毒素/有毒物之前的相同细胞或组织相比，对个体、细胞或组织的任何不利、有毒、有害或 其它负面影响。

[0087] 如本文所用，术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载体的组合(例如，包含MIP的组合物)，所述载体使组合物尤其适于体外、体内或间接体内诊断或治疗用途。

[0088] 如本文所用，术语“药物可接受的”和术语“药理学可接受的”是指与已知有利反应相比基本上不产生更多的已知不利反应的组合物。

[0089] 如本文所用，术语“溯源”是指检测结果或标准值的性质，由此其能通过完整的比较链而与通常为国内或国际标准的规定参考相关联，所有均具有规定的不确定性。其为化学检测的一般计量学概念的实际应用并还提供了术语、概念和策略以确保分析化学检测是可比较的。其以可检测的方式检测唯一可识别的实体。在其它事物之中，通过记录可记录的标识，追溯检测可用于关联项目的年表、位置和/或应用。

[0090] 发明详述

[0091] 各种真菌群产生对动物健康具有有毒影响的真菌毒素。在有利于其形成流行的条件时，主要通过曲霉菌(Aspergillus)、镰刀菌(Fusarium)和青霉菌(Penicillium)的真菌属产生这些毒素。世界上没有区域逃脱真菌毒素及其对动物和人健康的负面影响。真菌毒素污染对谷物供应和动物生产率的负面影响是巨大的，并且对人健康的危险始终存在。温暖气候倾向于感染黄曲霉毒素和伏马菌素，而具有较高湿度的寒冷地区遭受赭曲霉素、甚孢菌素、玉米烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素和二乙酰氧基藨草镰刀烯醇。

[0092] 真菌毒素为通过霉和真菌污染的谷物以及饲料、水果、饲料和食物产品以及环境(例如，通过气雾剂获得的霉菌中毒的土壤、水和空气等)产生的次生代谢物。真菌毒素对人和动物健康具有危险的作用。由于真菌毒素在整个食物链存在，因此真菌毒素受到限制过度污染的饲料/食物材料的条例影响以及受到基于不同组毒素的毒理学性质的环境影响(参见例如，Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol,zearalenone,ochratoxin A,T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding(2006年8月17日对旨在用于动物饲 料的产品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米烯酮、赭曲霉素A、T-2和HT-2以及伏马菌素的委员会建议)，欧盟官方公报(2006/576/EC))。在该方面，全球不同的安全机构建立了污染水平的极限值和对其测试的控制步骤。这些条例在国家和/或大洲间还未达成一致并还倾向于所考虑的地理区域的政治和经济状态。在可利用的情况下，条例以与由模板状况上的真菌毒素结晶形式而产生的急性中毒情况相关的大量报道为基础。作为真菌毒素进化的一种理解，慢性暴露水平的影响、暴露的持续时间和不同真菌毒素自然污染的饲料/食物材料的共同出现以及能施加协同毒性作用的环境可能对动物和人的健康状态及其对各种其它感染的敏感性以及因此的免疫状态发挥重要作用。从这个角度而言，需要考虑的解决方案为处理进入食物链并在环境中存在的非调节水平的有毒化合物。因此，在本发明的一些实施方案中，用于制备去除真菌毒素用的高亲合力、合成吸附剂的经济、大规模方法(例如，所述真菌毒素包括但不限于大类或小类真菌毒素分子的整个族，其包括黄曲霉毒素：黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2、M1、P1、Q1、丙曲霉素和亚科、黄曲霉毒醇；单端孢霉烯族毒素：脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二乙酰氧基藨草镰刀烯醇、单乙酰氧基藨草镰刀烯醇、藨草镰刀菌烯醇、T-2毒素、HT-2毒素、T-2四醇、镰刀菌烯酮X、镰菌素C、镰孢菌酸、镰孢红素酮、黄色镰刀菌素、层出镰孢菌素、新

茄病镰刀菌烯醇、雪腐镰刀菌烯醇以及代谢物和亚科;伏马菌素:伏马菌素A1、A2、B1、B2、B3和亚科;赭曲霉素:赭曲霉素A、B、α、β和代谢物;玉米烯酮、玉米赤霉烯醇α、β、玉米赤霉酮、赤霉醇α、β、赤霉醇和代谢物;棒曲霉素、胶霉毒素、麦考酚酸、串珠镰刀菌素、环匹阿尼酸、橘霉素、白僵菌素、黄绿青霉素、细胞松弛素H;青霉酸、PR-毒素、异烟棒曲霉素A、B、红色青霉毒素和亚科;麦角生物碱:麦角胺、棒麦角生物碱;酪青霉毒素A、B;雀裨麦角生物碱A、B、黄曲霉震颤毒素、青霉震颤素和亚科;拟茎点霉毒素:拟茎点霉毒素A和亚科;粘液霉素A、疣孢青霉原和亚科;甚孢菌素和亚科;流涎素、苦马豆素、细交链孢菌酮酸、格链孢酚和渥曼青霉素)。

[0093] 赭曲霉素A(简写为OTA)为主要通过在其它霉菌物种之中的赭曲霉(Aspergillus ochraceus)和青霉菌(Penicillium verrucosum)制备的真菌毒素 代谢物,所述霉菌能生长于不适当储存的食物产品(参见例如,Pfohl-Leszkowicz A.和Manderville R.A.,2007.Molecular Nutrition and Food Research(分子营养学和食物研究),51:61-99)、污染的谷物、咖啡豆(参见例如,O'BrienE.和DietrichD.R.2005.Critical Reviews in Toxicology(毒理学重要综述),35:33-60)、葡萄酒(参见例如,Blesa J.,Soriano J.M.,Moltó J.C.,Mañes J.,2006.Critical Review in Food Science and Nutrition(食物科学和营养学的重要综述),46:473-478),并可能被转移并污染人所消耗的液体和固体(例如,葡萄汁、酒、啤酒、咖啡、可可提取物以及食品和饲料,其使用了污染的谷物和肉及来自消耗污染的谷物或以其它方式暴露于真菌毒素的动物的其它副产物(例如,牛奶、蛋等)),能对人有害的OTA是致癌(组2B;参见例如,Clark H.A.和Snedeker S.M,2006.Journal of Toxicology and Environmental Health,Part B:Critical Reviews(毒理学和环境健康期刊,部分B:重要评述),9:265-96)、对肾脏有害的化合物并能导致免疫抑制(参见例如,Al-Anati L.和Petzinger E.,2006.Journal of Veterinary Pharmocology and Therapeutics(兽医药理学和治疗期刊),29:79-90;Pfohl-Leszkowicz和Manderville,2007,如前所引用;O'Brien和Dietrich,2005,如前所引用)。OTA能诱导猪的肾功能变化,包括改变尿排出,并增加葡萄糖排泄物进入尿,其已经表征为猪的肾病。使用含有OTA的谷物饲养的鸡、火鸡和鸭子具有较差的饲料转化并减少蛋生产率。在人类中,将OTA病理学临床描述为巴尔干地方性肾病(参见例如,Vrabcheva T.,Petkova-Bocharova T.,Grosso F.,Nikolov I.,Chernozemsky I.N.,Castegnaro M.和Dragacci S.,2004.Journal of Agricultural and Food Chemistry(农业和食品化学期刊),52:2404-2410)。动物研究表明由于其与苯丙氨酸相似,因此在其在胃肠道水平下吸收之后,OTA能进入肝肠循环并结合血液中的白蛋白部分,因此在动物组织中存留延长的时间(参见例如,Creppy E.E.,kaneA.,Dirheimer G.,Lafarge-Frayssinet C.,Mousset S.和Frayssinet C.,1985.Toxicology Letters(毒理学快报),28:29-35)。

[0094] 另一类真菌毒素,即包括胶霉毒素、透明菌素、西洛菌素、毛壳菌素、毛壳素、轮枝孢菌素、线叶金鸡菊甙、翘孢菌素和甚孢菌素的表聚 硫代哌嗪二酮特别受关注。通常对动物生产率具有较高经济影响的后者在世界的特定区域中发现,最初在新西兰田园农业中发现(参见例如,Hohenboken W.D.,Morris C.A.,Munday R.,De Nicolo G.,Amyes N.C.,Towers N.R.和Phua S.H.,2004.New Zealand journal of Agricultural Research(农业研究新西兰期刊),47:119-127),但还在葡萄牙的亚速尔群岛中报道过。甚孢菌素是由寄生

于某些牧场的纸皮司霉(Pithomyces chartarum)合成的疏水分子。毒性由二硫化物桥的存在而诱导,其能通过与巯基的反应使蛋白质失活并产生活性氧气物质(过氧化物基团、过氧化氢、羟基基团)。该病理学更被称为面部湿疹、由胆管上皮细胞的破坏而产生的肝原光敏作用,其导致叶红素(叶绿素代谢物)在循环的血液中累积并从阳光中吸收能量,并特别影响羊、牛、马和鹿。临床症状包括牛奶产量降低、体重减轻、光敏化以及死亡(参见例如,Munday R.,1982.Chemico-Biological Interactions(化学生物学相互作用),41:361-374)。除暴露于饲料、食物、牧场和液体中的真菌毒素之外,动物和人与真菌毒素接触并能以其它方式受真菌毒素影响。例如,动物能在其草垫中与真菌毒素接触,鱼能在其水环境中与真菌毒素接触,且其它有机材料能受真菌毒素影响。

[0095] 真菌毒素污染是不可避免的,并且为降低真菌毒素的负面影响,历史上将以吸附性能闻名的诸如粘土、膨润土和硅铝酸盐或活性炭的无机物质用于农业(例如,与动物饲料和/或密封形式或过滤器设备形式的成分混合)。粘土用于大量螯合液体中(例如,动物和/或人的胃肠道中)的某些真菌毒素并最小化其有毒影响(参见例如,Ramos A.J.和Hernandez E.,1997.Animal Feed Science and Technology(动物饲料科学和技术),65:197-206;Grant P.G.和Phillips T.D.,1998.Journal of Agricultural and Food Chemistry(农业和食物化学期刊),46:599-605)。然而,粘土阻碍诸如维生素、矿物和氨基酸在内的对动物和人重要的多种有益营养物的吸收,从而减少饮食的营养物密度。此外,粘土是惰性物质,其必须大量使用(例如,喂养动物)以具有有益影响(例如,减少真菌毒素污染)。然而,当粘土从动物中排泄出时,以大量喂养动物的粘土能对环境具有负面影响。也能使用对特定的真菌毒素缺乏特异性的其它广谱真菌毒素吸附剂,包 括在第6,045,834号美国专利中描述的发明。

[0096] 通常,分子印迹聚合物(简写为MIP)是在分子存在下形成的聚合物,即随后萃取的模板,因此留下互补腔。这些聚合物对原始分子表现出特定的化学亲合力并能用于制造感应器、催化或用于分离方法。最早的印迹材料为硅酸钠类。在1949年,这些材料的第一次实验用途是用于分离染料(参见例如,Andersson H.S.和Nicholls I.A.,2001.In:Molecularly Imprinted Polymers:Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry(分子印迹聚合物:抗体的人造模拟及其在分析化学中的应用),(Sellergen B.编辑),Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry(分析化学中的技术和仪器),Vol.23 Elsevier,Amsterdam,Netherlands,pp.1-19)。

[0097] 本发明一般涉及分子印迹聚合物(MIP)。特别地,本发明涉及可再用、生态友好的MIP,制备所述MIP的方法以及使用所述MIP的方法(例如,螯合和/或吸附靶化合物(例如,真菌毒素)),以及以不同方式应用所述用途的方法(例如,为溯源目的的检测真菌毒素的存在以及从污染源中去除真菌毒素)。本发明的组合物和方法用于多种应用,其包括饮食,治疗,预防剂、食品和饮料加工和制造、液体过滤以及研究和质量控制应用。

[0098] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了影响MIP对靶标化合物(例如,真菌毒素)的高吸附能力和选择性的模板化合物(例如,在其上合成MIP)。模板化合物可从MIP合成后的MIP中去除(例如,由此“激活”MIP并使其与靶化合物(例如,真菌毒素)结合并吸附该靶化合物(例如,真菌毒素))。因此,本发明提供了允许大规模生产模板和MIP的方法(例如,合成

方法)和材料,其不仅是经济的(例如,能够实现以经济上可行的方式大规模生产),而且使用比历史上使用的MIP模板更容易获得的试剂。在一些实施方案中,本发明还提供了生物中性(例如,不是环境有害的)的组合物(例如,模板化合物、单体、交联剂以及MIP)。例如,在一些实施方案中,本发明的单体和交联剂能够形成与模板具有高亲合力、可逆的络合物(例如,与模板的官能团),从而制备对靶化合物(例如,真菌毒素)具有高亲合力并且对环境提供正面影响的MIP(例如,高的水吸附性质,由此MIP吸附比其重量大高达10倍的水从而通过保留水来有益于土壤水合 作用)。类似地,在一些实施方案中,本发明提供了对可再用(例如,能从靶化合物中分离并再使用)靶化合物(例如,真菌毒素)具有高亲合力的MIP。

[0099] I.用于合成分子印迹聚合物(MIP)的模板

[0100] 用于MIP合成的一般方案包括在MIP网络内控制结合部位形成的模板分子的存在下,单体的聚合和交联步骤。将几何学特异性给予MIP结合部位,所用步骤类似于在美术学的脱蜡铸造法过程中使用蜡塑复制品制备模具。在形成MIP网络后,去除模板使得无模板的MIP可用于螯合靶化合物。在一些实施方案中,通过一系列洗涤步骤(例如,使用在下面第IV部分描述的那些)实现模板的去除。

[0101] 在一些实施方案中,将靶化合物用作模板。然而,这增加了模板渗出或逐渐浸出残留模板进入样品中的潜在问题。在分析应用中,模板渗出导致不正常的高背景,而在非分析应用(例如,螯合)中,模板渗出能通过实际上将靶分子引入样品中而混淆螯合结果。此外,例如当合成控制具有有毒和/或致癌性质的靶标(例如,真菌毒素)的MIP时,从人身安全以及最小化有害废物的观点出发,可能期望在MIP合成过程中使用危害较小的模板分子。在优选实施方案中,模板分子为无害的和/或容易降解,因此并不代表健康或环境危险。在优选的实施方案中,经从MIP中释放的模板为可再用的。在优选的实施方案中,与能被生产的真菌毒素相比,能以更大量和更安全的模式生产模板。

[0102] 因此,在一些实施方案中,用于MIP合成的模板可为与期望的靶化合物相同的化合物。在一些实施方案中,用于MIP合成的模板可与期望的靶化合物不同。在本发明的优选实施方案中,期望的靶化合物为真菌毒素。真菌毒素的实例包括但不限于黄曲霉毒素:黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2、M1、P1、Q1、丙曲霉素和亚科、黄曲霉毒醇;单端孢霉烯族毒素:脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二乙酰氧基藨草镰刀烯醇、单乙酰氧基藨草镰刀烯醇、藨草镰刀菌烯醇、T-2毒素、HT-2毒素、T-2四醇、镰刀菌烯酮X、镰菌素C、镰孢菌酸、镰孢红素酮、黄色镰刀菌素、层出镰孢菌素、新茄病镰刀菌烯醇、雪腐镰刀菌烯醇和代谢物和亚科以及轭合物; 伏马菌素:伏马菌素A1、A2、B1、B2、B3和亚科以及轭合物;赭曲霉素:赭曲霉素A、B、α、β和代谢物;玉米烯酮、玉米赤霉烯醇、α和β-玉米赤霉酮、玉米赤霉烯醇(zearalanol)、α和β-赤霉醇和代谢物以及轭合物;棒曲霉素、麦考酚酸、串珠镰刀菌素、环匹阿尼酸、橘霉素、白僵菌素、黄绿青霉素、细胞松弛素H;胶霉毒素、甚孢菌素、透明菌素、西洛菌素、毛壳菌素、毛壳素、轮枝孢菌素、线叶金鸡菊甙、翘孢菌素和亚科;青霉酸、PR-毒素、异烟棒曲霉素A、B、红色青霉毒素和亚科;麦角生物碱:麦角胺、麦角环肽、麦角缬氨酸、麦角柯碱、麦角新碱、麦角生碱、麦角宁碱、麦角柯宁碱、麦碱、麦角醇、麦角酸和差向异构体、棒麦角生物碱;酪青霉毒素A、B;雀裨麦角生物碱A、B、黄曲霉震颤毒素、青霉震颤素和亚科;拟茎点霉毒素:拟茎点霉毒素A和亚科;粘液霉素A、疣孢青霉原和亚科;流涎素、苦马豆素、细交链孢菌酮酸、格链孢酚和渥曼青霉素。在某些实施方案中,靶化合物为OTA、甚孢菌素、麦角生物碱。

[0103] 在一些实施方案中，通过靶分子的仔细的结构分析、结构最小化以及测定对有效的MIP结合部位形成至关重要的结构特征和官能团来进行非靶模板化合物的设计和/或测定。结构最小化的方法在本领域是已知的(参见例如，Baggiani C.，Giraudi G.和Vanni A.，2002.Bioconjugation(生物偶联技术)，10:389-394;以其整体内容通过引用并入本文)。当本发明不限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时，在模板设计过程中考虑的结构因素包括但不限于手性、平面性、消除对分子不期望性质反应的结构(例如，消除毒性的分子决定因素)和/或存在合适的模板分子的溶剂可达表面、静电势表面和/或亲脂性-亲水性表面及其与单体和交联剂潜在的相互作用以及模板合成的简单性。在一些实施方案中，应用超快形状识别技术已能够实现与分子最紧密相似的化合物的常规筛选，这不仅根据较好的二维结构识别而且优选根据常用识别模式(即三维分子形状)中的一种(参见例如，Balletser P.和Richards W.G.，2007.Proceedings of the Royal Society A:Mathematical，Physical and Engineering Sciences(皇家学会会报A:数学、物理和工程科学)，463:1307-1321。

[0104] 在一个非限制性实例中，如图1所示，用于赭曲霉素A的模板为N-(2- 羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。

[0105] 在N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸的合成方法的一个非限制性实例中，合成从3,5-二氯水杨酸与醋酸酐的反应开始以获得2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸，其反过来通过草酰氯的作用转化为酸性氯化物。然后，在三乙胺的存在下，2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯与苯丙氨酸乙酯盐酸盐原位反应以生成N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸的乙酯。合成方法的最后步骤引入N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯的两个酯官能的新的且高度特异性水解以获得OTA模板，N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸(I)的产率为98％。该合成反应在图2中概述。

[0106] 因此，本发明提供了用于以经济可实现的方式合成可扩展至大质量模板(例如，OTA模板)的方法和材料。

[0107] II.用于聚合MIP的单体和交联剂

[0108] 用于合成MIP的单体的选择考虑了模板分子的结构特征以评价哪个单体或单体组合最可能形成与模板的相互作用(例如，共价、非共价、离子、氢键、疏水相互作用、范德华相互作用)。在一个非限制性实例中，本文描述的OTA模板(I)(例如，N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸)的关键结构特征包括(i)两个酸性官能团(-OH和-CO_2H)；(ii)一个强极性肽基团(-NHCO-)；(iii)以及模板结构的若干低极性的烃片段(例如，其各自具有与单体和交联剂分子形成络合物的电势)。以其整体内容通过引用并入本文的第10/181435号美国专利申请描述了MIP功能单体和计算单体选择的方法(参见例如，Baggiani等人，2002.如前所引用)。

[0109] 单体和特定单体(例如，在本发明的MIP合成方法中使用的)的种类包括但不限于下列种类及其衍生物其：丙烯酸和衍生物(例如，2-溴丙烯酸、丙烯酰氯、N-丙烯酰基酪氨酸，N-丙烯酰基吡咯烷酮、反式-2-(3-吡啶基)-丙烯酸)、丙烯酸酯(例如，烷基丙烯酸酯、烯丙基丙烯酸酯、羟丙基丙烯酸酯)、甲基丙烯酸和衍生物(例如，衣康酸、2-(三氟甲基)丙烯酸)、甲基丙烯酸酯(例如，甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟基乙酯、甲基丙烯酸2-羟基乙酯、甲基丙烯酸3-磺丙酯钠盐、单甲基丙烯酸乙二醇酯)、苯 乙烯(例如，(2,3和4)-氨基苯乙

烯、苯乙烯-4-磺酸、3-硝基苯乙烯、4-乙基苯乙烯)、乙烯基(例如,氯甲酸乙烯酯、4-乙烯基苯甲酸、4-乙烯基苯甲醛、乙烯基咪唑、4-乙烯基苯酚、4-乙烯基胺、丙烯醛)、乙烯基吡啶(例如,(2,3和/或4)-乙烯基吡啶、3-丁烷1,2-二醇)、硼酸(例如,4-乙烯基硼酸)、磺酸(例如,4-乙烯基磺酸、丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙烷-磺酸)、金属螯合剂(例如,苯乙烯亚氨基二乙酸)、丙烯酰胺和衍生物(例如,N-甲基丙烯酰胺)、甲基丙烯酰胺和衍生物(例如,N,N-二甲基丙烯酰胺、N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺)、烯烃(例如,4-戊烯酸、3-氯-1-苯基-1-丙烯)、(甲基)丙烯酸酐和衍生物(例如,甲基丙烯酸酐)、含硅的单体(例如,(3-甲基丙烯酰氧基丙基)三甲氧基硅烷、四甲基二硅氧烷)、多烯(例如,异戊二烯、3-羟基-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳三烯)、叠氮化物(例如,4-叠氮基-2,3,5,6-四氟苯甲酸)、硫醇(例如,烯丙基硫醇)。丙烯酸酯终端的或其它不饱和聚氨酯、碳酸酯和环氧树脂也能用于本发明的实施方案,如同硅类单体也能用于本发明的实施方案。

[0110] 在优选的实施方案中,用于合成对OTA的模板(即N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸)进行控制的MIP的单体和交联剂包括2-乙烯基吡啶、2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和/或乙二醇二甲基丙烯酸酯。当本发明不局限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时,2-乙烯基吡啶与模板的酸基团形成离子键,并在紧密接近吡啶环的碱性氮原子中包含乙烯基键。模板和2-乙烯基吡啶之间的该相互作用促进在非常接近模板分子的附近处形成聚合物,并且在MIP中实现MIP和OTA之间的紧密连接(例如,在去除模板化合物后并使MIP与靶OTA分子相互作用)。当本发明不局限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时,2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯单体的羟基与模板的高极性肽键形成另外的氢键。另外的试剂为二甲基丙烯酸乙二醇酯。当本发明不局限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时,二甲基丙烯酸乙二醇酯在一些实施方案中用作交联剂(参见下文),作为与在OTA模板分子中存在的低极性基团相互作用的不饱和二酯。在一些实施方案中,单独地或与其它类型的单体组合使用各个类型的单体。

[0111] 若使用,则交联剂或试剂优选为一种或若干种聚合或低聚化合物,或在特定条件下提供裂解的化合物。向主体聚合物提供硬度的交联剂对本领域技术人员而言是已知的,并且包括但不限于二、三、四和五官能丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、含乙烯基树脂、含烯丙基树脂和苯乙烯。交联剂的特定实例包括但不限于对-二乙烯基苯、二甲基丙烯酸乙二醇酯(简写为EGDMA)、二甲基丙烯酸四亚甲基酯(简写为TDMA)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(简写为MDAA)、N,N'-1,3-亚苯基双(2-甲基-2-丙烯酰胺)(PDBMP)、2,6-双丙烯酰基酰胺基吡啶、1,4-二丙烯酰基哌嗪(简写为DAP)、1,4-亚苯基二丙烯酰胺和N,O-双丙烯酰基-L-苯基氨基丙醇。可逆、可裂解的交联剂的实例包括但不限于N,N'-双-(丙烯酰基)胱胺、N,N-二烯丙基酒石酸二酰胺、N,N-(1,2-二羟基亚乙基)二丙烯酰胺、N1-((E)-1-(4-乙烯基苯基)亚甲基)-4-乙烯基苯胺、烯丙基二硫化物和双(2-甲基丙烯酰氧基乙基))二硫化物。在优选的实施方案中,将二甲基丙烯酸乙二醇酯用作交联剂。尽管优选的交联单体为二甲基丙烯酸乙二醇酯,但本发明的实施方案不局限于该试剂,并且可使用其它交联单体,例如二乙烯基苯和三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(简写为TRIM)。

[0112] 能使用可提供适当完整性的MIP结构的简单单体与交联剂的任何比例,例如,能用于最终的应用背景(例如,在食品或饲料产品中,意图用于水产业用途的水中、体内等)。本领域的技术人员能选择合适比例的单体以提供期望的结构完整性,其与靶分子的性质和结

构以及所用模板的性质和结构密切相关。

[0113] 在有待在体内使用聚合或低聚化合物的情况下(例如,作为治疗或诊断,或作为动物饲料或人食品的可消耗的螯合组分),选择无毒并表现出适当的体内稳定性和溶解度的单体是至关重要的。优选的实例包括但不限于丙烯酰胺和甲基丙烯酸酯。或者,可在聚合后处理聚合物以增强模板溶解度,例如通过与合适的有机或无机试剂反应。

[0114] 可使用包括游离自由基、阳离子和阴离子聚合在内的不同聚合方法。在本文选择并提供聚合条件,其对化合物的活性构象不产生不利地影响,对此可制备补充性聚合物。在特别优选的实施方案中,使用游离基沉淀聚合方法(参见下文第III部分)。

[0115] 此外,MIP的聚合通常通过加入引发剂而开始。引发剂包括但不限 于偶氮双异丁腈(简称为AIBN)、偶氮双二甲基戊腈(简写为ABDV)、苯偶酰的二甲基乙缩醛、苯甲酰基过氧化物(简写为BPO)和4,4'-偶氮(4-氰基戊酸)。在优选的实施方案中,引发剂为偶氮双异丁腈。

[0116] 在优选的实施方案中,单体、交联剂和/或MIP具有诸如减少的毒性或无毒性以及高水吸附和滞留的有利安全性和/或环境性质。在优选的实施方案中,MIP能可再用并能为经济上可实现/可生产的。

[0117] III.用于合成MIP的溶剂

[0118] 进行聚合反应的溶剂/溶剂混合物的选择对MIP与其靶化合物的结合亲合力的范围、选择性和特异性具有显著影响。当本发明不局限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时,通过表现出下列性质的致孔溶剂或溶剂混合物促进或提供孔隙率:其溶解在单体混合物中,对聚合反应呈惰性并且不溶解所产生的聚合物(MIP)。合适的致孔溶剂包括但不限于:诸如甲苯、二甲苯、乙苯和二乙苯的芳族烃类;诸如环己烷的非极性溶剂;诸如己烷、庚烷、辛烷和癸烷的饱和烃类;诸如异丙醇和异戊醇的醇类;诸如二氯甲烷、二氯乙烷和三氯乙烷的脂肪族卤代烃类;诸如醋酸乙酯、醋酸丁酯、邻苯二甲酸二甲酯的脂肪族或芳族酯类。在优选的实施方案中,使用芳族烃类溶剂。在特别优选的实施方案中,单独使用甲苯。在一些实施方案中,使用甲苯与另一溶剂的混合物。在一些实施方案中,将甲苯与环己烷组合而使用。能单独地或以两种或多种的组合使用致孔溶剂。基于单体总量,加入的致孔溶剂的量能从约10%质量比变化至500%质量比。当本发明不局限于任何特殊机制并且机制的理解不必实践于本发明时,极性溶剂(例如,水、乙腈)破坏单体和模板间的紧密络合,从而降低MIP对靶分子结合的特异性(例如,如在甲苯中,等)。

[0119] 用作MIP合成用培养基的溶剂或溶剂混合物还对MIP的膨胀性质以及三维MIP网络内的孔径具有影响。在某些实施方案中,当期望增加MIP膨胀和增加MIP孔径时,将诸如乙腈的极性溶剂用作用于MIP聚合的溶剂或共溶剂;或者,当不期望增加MIP膨胀和增加MIP孔径时(例如,当MIP旨在用于色谱柱时,其中膨胀可能妨碍流速并干扰分析物的 洗脱以及HPLC仪器的运行能力),避免这类溶剂。

[0120] 溶剂体系的合理选择可直接影响MIP孔径。在非限制性实例中,在针对OTA模板的MIP的合成过程中,在类似环己烷和/或甲苯的低极性溶剂中形成最小颗粒(1-20μm),而在类似乙腈或水的极性溶剂中形成更大和更小的尺寸均匀(10-170μm)的颗粒。此外,在高浓度的单体下,聚合反应生成大的MIP簇,其容易通过研磨而分散,不产生在MIP块的研磨过程中所出现的非常细的颗粒(参见在下面第IV部分中的详细讨论)。非常细的颗粒在一些应用

中可能为不期望的，例如在MIP旨在用作柱树脂(其中细颗粒可能妨碍流速)，或当存在细颗粒时在离心或过滤过程中妨碍或使MIP的收集复杂化，或在过滤的情况下干扰MIP的适当限制，因此如果过滤器应维持所包含的MIP的量，则其受包含MIP的特定筛网过滤器孔径的影响。可筛分已分散的MIP簇以提供所定义的均匀尺寸的产物。因此，可选择聚合溶剂、单体浓度和物理处理方法的选择以导致具有期望孔径和粒度的MIP的最佳产率，同时避免细颗粒的形成。

[0121] 溶剂体系的选择表明在聚合过程中形成的MIP的物理形式。例如，如上所述，在称为沉淀聚合的过程中，一些溶剂体系(包括但不限于诸如环己烷和/或甲苯的低极性溶剂)产生固体MIP簇。其它溶剂体系(包括但不限于诸如聚乙烯醇水溶液的极性溶剂)促进称为乳液聚合的动力学显著过程(Vivaldo-Lima E.,Wood P.E.,Hamielec A.E.,1997.Industrial and Engineering Chemistry Research(工业和工程化学研究),36:939-965)。通常，聚合的性质影响MIP网络的物理形式和其可被进一步加工的难易度二者(例如，研磨的需要、粒度的均匀性、产率、缓冲液或溶剂交换的容易度、稳定性)。在Yan H.和Ho Row K.,2006.International Journal of Molecular Science(分子科学的国际期刊),7:155-178中评论了聚合过程，其以其整体内容通过引用并入本文。在优选的实施方案中，使用沉淀聚合。在某些实施方案中，沉淀聚合导致以均匀粉末和易控粒度的形式而形成的MIP产品。相比之下，包括但不限于本体聚合的其它聚合方法可产生MIP的大块，在进一步加工或使用之前必须将其压碎，并导致不规则的粒度，因此具有较差性能。

[0122] IV.在MIP合成和MIP的物理加工后从MIP中去除模板的方法

[0123] 用于从新合成的MIP中分离模板的技术通常由模板-MIP相互作用的性质而确定。例如，当在模板和MIP网络间形成共价键时，需要从MIP中化学裂解模板。相比之下，当模板和MIP网络间的相互作用为非共价时，溶剂萃取可足以去除模板(参见例如，Yan H.和Ho Row K.,2006，如前所引用，并以其整体内容通过引用并入本文;Sellergren B.,2001.The non-covalent approach to molecular imprinting(分子印迹的非共价方法).In:Molecularly Imprinted Polymers:Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry(分子印迹聚合物:抗体的人造模拟及其在分析化学中的应用),(Sellergen B.编辑),Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry(分析化学中的技术和仪器),第23卷,Elsevier,Amsterdam,Netherlands,pp.113-184)。MIP的合成后加工还称为MIP激活。在优选的实施方案中，MIP激活的第一步包括倾析，然后在稍微降低的压力下从MIP材料中蒸发(循环)溶剂(例如，使用旋转蒸发系统)。第二步包括研磨MIP颗粒以产生较小粒径(例如，使用研钵和研棒或碾磨设备)。第三步包括多次洗涤MIP颗粒，例如，使用0.2w/v％的氢氧化钠。在合成OTA MIP的实施方案中，可跟踪整个洗涤过程直至使用$FeCl_3$溶液获得负测试以检测模板(参见实施例2至实施例4)。在一些实施方案中，洗使用1％的醋酸涤一次并使用水洗涤一次，随后干燥最终的MIP产物(例如，在80℃的干燥烘箱中6-8小时)直至去除所有溶剂痕迹。最后，可筛选MIP颗粒以提供规定粒度的产物。在优选的实施方案中，在使用之前，物理形式的MIP不需要大量研磨，例如，MIP不形成需要破碎或研磨而分散的整块。在优选的实施方案中，大多数MIP形成经干燥而形成粉末的球体。

[0124] 在优选的实施方案中，洗涤步骤足以从MIP网络中去除至少95％的模板分子。在特

别优选的实施方案中，洗涤步骤足以从MIP网络中去除至少99％的模板分子。在大多数优选的实施方案中，洗涤步骤足以从MIP网络中去除至少99.9％的模板分子。

[0125] V.MIP组合物的应用

[0126] 本发明的组合物和方法用于包括饮食、治疗、预防剂、食品和饮料加工及制造以及研究和质量控制应用在内的多种应用。例如，在一些实施方案中，将合成的模板(例如，使用本文描述的方法而生成的)用于MIP合成。本发明不限于任何特定的合成模板和/或合成的MIP。实际上，能生成和使用多种合成模板，其包括但不限于OTA模板(例如，N-(3,5-二氯-2-羟基苯甲酰基)-L-苯丙氨酸，参见实施例1)、黄曲霉毒素模板、单端孢酶烯模板(例如，倍半萜烯醇模板(例如，脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)模板))、玉米烯酮模板、甚孢菌素模板、丙曲霉素模板、伏马菌素模板、棒曲霉素模板、橘霉素模板和/或与麦角菌相关的内生菌模板。在一些实施方案中，本发明提供了组合物和方法以制备包含类似于真菌毒素的外部官能团的合成模板(例如，用于MIP OTA合成)(例如，其中在本发明的方法中模板用于产生MIP并随后从其中去除，MIP对于由外部官能团而相似的真菌毒素显示出高亲合力)，其中所述真菌毒素选自乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇，乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇，乙酰基雪腐镰刀菌烯醇，乙酰基新茄病镰刀菌烯醇，乙酰基T-2毒素，扩展至所有黄曲霉毒素，黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2，黄曲霉震颤毒素，细交链孢酸，格链孢酚，焦曲二醇，焦曲酰胺，焦曲斯汀，燕麦镰孢菌素+1，白僵菌素+2，bentenolide，brevianamide，丁烯酸内酯，丽赤壳菌素，毛壳球菌素，毛壳素，毛壳菌素，橘霉素，黄绿青霉素，可皆霉素，细胞松弛素，环匹阿尼酸，脱乙酰丽赤壳菌素，脱乙酰新茄病镰刀菌烯醇，脱氧雪腐镰刀菌烯醇二醋酸酯，脱氧雪腐镰刀菌烯醇一醋酸酯，二乙酰氧基藨草镰刀烯醇，腐败菌素B，翘孢菌素，恩镰孢菌素，扩展至所有麦角生物碱毒素和诸如麦碱、麦角柯宁碱、麦角柯碱、麦角环肽、麦角新碱、麦角宁碱、麦角生碱、麦角胺、麦角缬氨酸、麦角醇、麦角酸的内生菌以及相关的差向异构体，产果镰孢菌素+1，烟曲霉素，伏马菌素，伏马菌素A1，A2，B1和B2及B3，镰刀菌烯酮-X，镰孢红素酮，镰孢菌酸，镰菌素，胶霉毒素，HT-2毒素，透明菌素，甘薯宁，岛青霉毒素，酪青霉毒素A和B，侧生赤霉素+1，线叶金鸡菊甙，番茄菌肽+1，畸形素，麦芽米曲霉素，串珠镰刀菌素，单乙酰氧基藨草镰刀烯醇，麦考酚酸，新茄病镰刀菌烯醇，雪腐镰刀菌烯醇，NT-1毒素，NT-2毒素，延伸至所有赭曲霉素，卵孢霉素， 草酸，雀裨麦角生物碱A和B，棒曲霉素，青霉酸，青霉震颤素，拟茎点霉毒素，PR-毒素，杆孢菌素E，异烟棒曲霉素A和B，红色青霉毒素，瑰天精，黄梅精，细皱青霉素，sambucynin+1，葡萄穗霉毒素F、G、H，雪腐镰刀菌醇，西洛菌素，流涎素，甚孢菌素，丙曲霉素，苦马豆素，T-1毒素，T-2毒素，细交链孢菌酮酸，延伸至所有单端孢霉烯族毒素的三乙酰氧基藨草镰刀菌烯二醇，木霉素，单端孢菌素，trichoverrins，trichoverrols，色氨酸震颤素，粘液霉素，疣孢青霉原，轮枝孢菌素，紫红紫素，紫黄素，绿垂毒素，渥曼青霉素，黄青霉素，yavanicin+1，玉米赤霉烯醇，玉米赤霉酮，玉米烯酮α、β，玉米赤霉酮α、β，赤霉醇和亚科和/或其衍生物和/或轭合物。在某些实施方案中，靶化合物为OTA、甚孢菌素或麦角生物碱。

[0127] 类似地，能生成和使用多种MIP，包括但不限于使用上述合成模板中的任一种或任何其它有机分子作为模板(例如，诸如维生素的营养物、药物、抗生素、污染物、荷尔蒙、酶、蛋白质等)而生成的MIP。

[0128] 本文描述的MIP用于多种应用。例如，在一些实施方案中，MIP用于纯化液体。例如，在一些实施方案中，MIP用于从液体中选择性去除靶化合物(例如，一种或多种真菌毒素)。

本发明不受从液体中去除的靶化合物(例如,一种或多种真菌毒素)的限制。实际上,可去除包括但不限于本文描述的真菌毒素的多种靶化合物。类似地,本发明不受从中去除靶化合物的液体类型的限制。实际上,多种不同的液体溶液能具有一种或多种从其中去除的靶化合物(例如,真菌毒素)(例如,通过向溶液给予一种或多种不同类型的MIP),其包括但不限于饮料(例如,人类所消耗的(例如,果汁、酒(例如,白酒、红酒等)、水、啤酒、茶、咖啡等))、水(例如,在水产业、引用水等中所使用的)、用于食品(例如,人类、动物的食品)生产的液体、生物流体(例如,血液、瘤胃液、胃液等)等。

[0129] 例如,在一些实施方案中,本文描述的组合物和方法提供了从液体中选择性去除靶化合物(例如,真菌毒素)的MIP。液体能为饮料、水、生物样品、引用水供给、血液、瘤胃液或包含靶化合物的其它类型的液体。此外,能从其它类型的液体中去除靶化合物。在一些实施方案中,使本文描述的MIP与液体接触(例如,与液体混合)充足的时间,以使MIP与 靶化合物(例如,真菌毒素)相互作用并与靶化合物(例如,真菌毒素)结合。尽管机制的理解不必实践于本发明并且本发明不受任何特殊机制的限制,但在一些实施方案中,在使液体与MIP相互作用后,在MIP中包含的络合/结合腔(例如,在从MIP中去除模板分子后残留的腔)经接触而与靶化合物结合,从液体中有效去除靶化合物。然后,能将液体进一步处理、包装或准备进行消耗(例如,用于人类消耗、用于动物消耗或用于动物栖息地)。在一些实施方案中,本文生成和/或提供的MIP具有承受与去除/螯合过程相关的物理和化学力的坚硬结构。例如,在优选实施方案中,本文提供的MIP选择性结合靶化合物,从而从物质(例如,液体、固体表面、生物流体(例如,血液、瘤胃液等)、维持生命的必要物(例如,空气或水产业介质)等)中去除靶化合物,并当从物质中收集和/或去除MIP-靶化合物络合物时维持与靶化合物的关系(例如,泵送液体通过过滤器、倾倒液体通过过滤器、将过滤器浸入液体、在容器表面上涂覆MIP、离心、在过滤器表面上涂覆MIP、动物粪便排泄,等)。

[0130] 在一个实施方案中,从液体中去除靶化合物的方法是高选择性的。例如,液体可包含大量靶化合物,其中MIP仅选择性去除一种特定的靶化合物(例如,真菌毒素),其中“一种”是指靶化合物的类型而不是去除的靶化合物的数量。在一些实施方案中,将多个MIP(例如,多个不同群体的MIP(例如,其中一个群体的MIP对一种类型的真菌毒素(例如,赭曲霉素)有特异性而第二群体的MIP对第二类型的真菌毒素(例如,黄曲霉毒素)有特异性)给予液体并使其相互作用充足的时间以从液体中选择性去除多个不同类型的靶化合物(例如,真菌毒素)。本发明不受不同类型的MIP的数量限制,将所述MIP给予至包含多个不同类型的靶化合物(例如,真菌毒素)的液体。在一些实施方案中,液体包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多种不同类型的靶化合物(例如,真菌毒素),在使MIP与靶化合物接触并螯合靶化合物的条件下,将包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多种不同类型的MIP的组合物给予至液体,所述组合物对多个靶化合物中的一种具有特异性。在一些实施方案中,MIP对单一的靶分子/化合物表现出特定的亲合力。在一些实施方案中,MIP对一组具有常见化学或物理性质的分子表现出特定的亲合力。在一 些实施方案中,MIP具有多个用于不同靶化合物的不同络合/结合腔,以便当处理MIP时在使用多个靶分子/化合物之后,MIP能够选择性结合多个靶化合物。

[0131] 在一些实施方案中,本发明提供了从包含多个不同类型的靶化合物(例如,真菌毒素或其它有机分子靶分子/化合物(例如,诸如维生素的营养物、药物、抗生素、污染物、荷尔

蒙、酶、蛋白质等))的液体中去除靶化合物的方法。在一些实施方案中，方法包括设计为与不同靶化合物结合的一组不同类型的MIP。例如，在一些实施方案中，提供液体样品，其中进行检验以识别液体样品中一种或多种靶化合物的存在。能检测特定真菌毒素的存在以确定存在哪种真菌毒素。经识别液体样品中存在的一种或多种类型的靶化合物(例如，其中液体样品代表了从中采集样品的液体的特性)，生成(例如，根据本文描述的方法)和/或结合一种或多种MIP，然后将一种或多种MIP给予至液体溶液以去除靶化合物。在一些实施方案中，一种或多种类型的靶化合物的识别包括使用包含一种或多种对靶化合物有特异性的MIP的柱和/或过滤器。在一些实施方案中，一旦MIP用于从样品(例如，液体样品)中去除靶化合物，则从MIP中去除靶化合物并将MIP再使用。在一些实施方案中，以适当的方式处理MIP。例如，能通过使用合适的溶剂和/或溶液进行洗涤来从MIP中去除靶标化合物(例如，为使MIP可再用)，所述溶剂和/或溶液能从所述方法所用的溶剂中选择以在合成反应后从模板中分离MIP，并物理处理MIP(例如，包括但不限于乙腈、甲苯、甲醇、氢氧化钠、醋酸等)等。然后将回收的MIP再度使用。

[0132] 从液体中去除靶化合物的方法由于MIP的选择性质，因而能产生高的回收率。在一些实施方案中，去除方法回收约25％至约99％的在液体中存在的靶化合物。在一些实施方案中，去除方法回收约35％至约99％的在液体中存在的靶化合物。在一些实施方案中，去除方法回收约50％至约99％的在液体中存在的靶化合物。在一些实施方案中，去除方法回收约75％至约99％的在液体中存在的靶化合物。在其它实施方案中，去除方法将生成的液体的靶化合物浓度降低至十亿分率(ppb)的水平(例如，降低至适用于人和/或动物消耗的浓度)。如在本领域技术人员已知的现有 和推荐的调节方案中所获悉的，能调节去除方法以提供特定的浓度水平。在一些实施方案中，在具有特定pH水平的液体上使用去除方法。例如，能对具有约1至13的pH的液体使用本发明的组合物和方法。

[0133] 在一些实施方案中，MIP用于从表面去除靶化合物。例如，本发明的某些实施方案提供了用于减少表面上存在的靶化合物(例如，真菌毒素)的方法，其包括使表面与包含MIP的组合物接触。在特定实施方案中，将接触进行足够的时间以使MIP结合和/或螯合靶化合物。在其它实施方案中，本发明提供了净化包含靶化合物的环境表面的方法。在一个这样的实施方案中，靶化合物与环境表面缔合并且所述方法包括使环境表面与足以净化表面的组合物(例如，包含MIP)接触。当期望这样时，净化不需要导致靶化合物的全部消除。在一些实施方案中，组合物(例如，包含MIP的组合物)和方法还包括染料、颜料以及其它标记和识别化合物，从而确保处理的表面已被本发明的组合物充分处理。

[0134] 在一些实施方案中，MIP用于防止靶化合物与表面或其它化合物(例如，土壤)接触。例如，本发明的某些实施方案包括制备组合物的方法，由此将MIP与其它材料(例如，塑料或淀粉型产物)结合并应用于植物(例如，生长的农业植物)以在生长过程中使植物免受表面化合物(例如，真菌毒素)，并且进一步防止化合物污染其它化合物(例如，土壤)。

[0135] 在某些实施方案中，使用本发明的组合物治疗(例如，外部或内部治疗)个体(例如，人或动物)的表面(例如，外表面或内表面)。在其它实施方案中，通过口服、鼻、颊、直肠、阴道或局部给药进行接触。当以药物形式给予本组合物时，期望的是组合物还包含药物可接受的辅剂、赋形剂、稳定剂、稀释剂等。在其它实施方案中，本发明提供了还包含另外的药物可接受的生物活性分子(例如，抗体、抗生素、用于核酸转染的装置、维生素、矿物、辅因

子、能够结合和/或螯合真菌毒素的因子(例如,酵母细胞壁提取物(例如,与粘土材料结合的酵母细胞壁提取物和/或包含粘土和/或粘土颗粒的酵母细胞壁提取物,所述粘土颗粒融入和/或交织进入酵母细胞壁)等)的组合物。在一些实施方案中,给予个体本发明的组合物(例如,包含MIP的组合物)以临床治疗疾病或疾病状态(例如,足癣)。在其它实施方案中,给予个体本发明的组合物(例如,包含MIP的组合物) 以预防性治疗(例如,预防迹象或症状的开始)疾病或疾病状态(例如,足癣)。在一些实施方案中,将组合物(例如,包含MIP的组合物)和方法应用于任何类型的区域或表面。例如,在一些实施方案中,区域包括固体表面(例如,医疗设备)、溶液、有机体表面(例如,人的外部或内部)或食物产品。

[0136] 本发明不受一种或多种给予至(例如,进行混合)液体或固体(例如,用于去除靶化合物)的MIP的量的限制。在一些实施方案中,每升液体或固体给予约0.10mg、0.50mg、1.0mg、2.0mg、5.0mg、10.0mg、20.0mg、50.0mg、100.0mg、500.0mg或更多的MIP。

[0137] 在一些实施方案中,将本发明的MIP用于诸如血液灌流的毒素消除方法。血液灌流是一种治疗技术,其中大量的个体血液通过吸附物质(例如,MIP)以从血液中去除有毒物质。

[0138] 通常,最常用于血液灌流的吸附剂为树脂和各种形式的活性碳或活性炭。然而,这些物质的结合特异性相对较差并且有时它们吸附重要的血液因子以及靶分子。因此,在一些实施方案中,本发明提供了本发明MIP作为对靶分子具有更好特异性和高亲合力的吸附剂的用途。

[0139] 血液灌流通过将经动脉导管抽出的血液泵送进入包含吸附剂材料的柱或筒而运作(例如,在一些实施方案中,本发明提供了所使用的吸附剂物质是本文描述的MIP)。当血液通过柱中的碳或树脂颗粒时,有毒分子或颗粒被吸引至吸附剂颗粒表面并在柱内被捕获。血液流出柱的另一端并通过与静脉导管连接的管子返回至个体。与血液透析或其它过滤方法相比,血液灌流能够从大量血液中清除毒素,例如,其每分钟能处理超过300mL的血液。

[0140] 本发明的MIP可用于血液灌流。在一些实施方案中,使用血液灌流,本发明的MIP用于从个体的血液中去除一种或多种真菌毒素。

[0141] 可调节给药方案以提供最佳的期望反应(例如,治疗或预防反应)。例如,可向动物给予含MIP的单一丸剂,也可随时间给予若干分次剂量,或可根据治疗情况的指示来按比例减少或增加剂量。有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物,从而方便给药和剂量均匀性。本发明MIP的剂量通常取决于(a)活性化合物的特性和待获得的特定治疗或预防效果,和(b)本领域中,将用于治疗对个体中真菌毒素过敏的这类活性化合物进行混合而存在的固有局限性。当然,给予的剂量根据已知因素而变化,例如特定试剂的药效特性及其给药模式和途径;接受者的年龄、健康状况和体重;症状的性质和程度、共同治疗的种类、治疗频率和期望的效果。

[0142] 能将本发明的MIP混入适于向个体给药的药物组合物。例如,药物组合物可包含MIP和药物可接受的载体。如本文所用,“药物可接受的载体”包括生理学可接受的溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药物可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等中的一种或多种,以及它们的组合。在许多情况下,其优选在组成中包含等渗剂,例如糖、诸如甘露醇、山梨醇的多元醇类或氯化钠。药

物可接受的载体还可包含微量的诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液的辅助物质，其增强MIP的保存期或有效性。

[0143] 在某些实施方案中，例如可与惰性稀释剂或可消化食用载体一起口服给予本发明的MIP。还可将化合物(如果需要，和其它的成分)封装在硬或软壳明胶胶囊中、压缩成片剂或直接混入个体饮食中。对于口服治疗给药，可将化合物与赋形剂混合并以可食用的片剂、颊片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、薄片剂、颗粒剂等形式而使用。为了通过除肠胃外给药之外的其它途径给予本发明的化合物，可能需要使用采用涂覆化合物或与材料共同给予化合物以防止其失活。

[0144] 还能将补充活性化合物混入组合物中。在某些实施方案中，与一种或多种其它治疗剂共同配制和/或共同给予本发明的MIP。

[0145] 本发明的药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的MIP。“治疗有效量”是指在给药时以及必要时间内有效实现期望治疗结果的量。治疗有效量可根据多种因素而变化，例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及印迹纳米粒在个体中引起期望反应的能力。治疗有效量还是其中治疗有益效果超过印迹纳米粒的任何有毒或不利影响的量。“预防有效量”是指在给药时和必要时间内有效实现期望预防结果的量。通常，由于在疾病之前或疾病早期阶段将预防剂量用于个体，因此 预防有效量小于治疗有效量。

[0146] 在一些实施方案中，当与有机物质(例如，饲料)和/或液体(例如，水、酒或其它饮料)混合和/或直接供给至个体时，本发明的组合物降低个体对真菌毒素的吸收或摄取(例如，从而减轻降低的性能、增加健康和/或减少个体中与真菌毒素有关的疾病或病理反应的发生率)并减少和/或防止真菌毒素或其代谢物在肉、鱼、蛋、奶和注定进入人类食物链的其它产物中沉积。

[0147] 在一些实施方案中，本发明用于制备分离设备(例如，固相萃取(简写为SPE))，所述设备基于不同于可使用的常规分离设备(例如，正相、反相或离子交换固相萃取)的物理和化学性质而用于从杂质混合物中去除固体或半固体化合物。在一些实施方案中，能将分离设备并入在萃取时使用的筒，因而纯化所生产的MIP的特定对应模板(corresponding template)和模板类似物。

[0148] 在一些实施方案中，本发明能用于封装与液体色谱一起使用的色谱柱，并能实现所使用的MIP的对应模板和模板类似物的特定洗脱。与本领域已知的可使用的其它技术和材料(例如，正相、离子交换、与多肽和小分子相互作用的包含各种尺寸的疏水烷基链(-$(CH_2)_n$-CH_3，n等于但不限于4、8、18)的反相硅胶柱)相比，制备的MIP柱能实现更有针对性的相互作用，而且更具体地指向所制备的MIP的对应模板和模板类似物。在一些实施方案中，各自用于特定真菌毒素或真菌毒素群的多种不同类型的MIP能用于柱的封装。

[0149] 在一些实施方案中，本发明提供了用于分离和定量真菌毒素的材料。然后，本发明能用于饲料/食物材料或液体源的溯源检测以用于检测样品中存在的真菌毒素及其与通常公认的参考化合物(例如，使用与UV-联用的HPLC、荧光检测器或质谱检测器等洗脱的真菌毒素标准品)的比较。

[0150] 在一些实施方案中，使用一种类型的MIP或多种不同类型的各自调节至特定真菌毒素或真菌毒素群的MIP，能够完成真菌毒素水平的溯源，并将其应用于检测包含饲料或食品样品(例如，谷物样品(例如，玉米、小麦等)、水果(例如，苹果、梨、葡萄等)、咖啡、茶、可可

等)的样品物质。

[0151] 在一些实施方案中,将使用一种MIP或多种不同类型的各自调节为 靶向特定真菌毒或真菌毒素群的MIP的真菌毒素水平溯源用于分析研究(例如,HPLC)以测定是否样品中存在真菌毒素,并且若存在,则存在哪种真菌毒素并且处于何种水平。在一些实施方案中,用于检测真菌毒素的分析工具(例如,HPLC)能用于预测饲料中真菌毒素污染的危险性。在其它实施方案中,用于检测真菌毒素的分析工具能用于确定需要将哪种MIP或MIP组合应用于采集样品的材料以减少或消除存在的真菌毒素。

[0152] 在一些实施方案中,将使用一种MIP或多种不同类型的各自用于特定真菌毒或真菌毒素群的MIP的真菌毒素水平溯源用于检测在动物生产系统中使用的或用作动物和人消耗用饮料的液体(例如,水、牛奶、果汁、酒、啤酒等)的真菌毒素含量。

[0153] 在一些实施方案中,真菌毒素含量的溯源能用于饲料/食物加工(肉加工、新鲜农产品加工)以检测整个生产流过程中真菌毒素的存在,从而确定哪里发生污染问题并需要召回。应当相应地参考条形码和其它跟踪介质、产品的所有变动及生产过程中的步骤,从而溯源所分析的样品。

[0154] 在一些实施方案中,将使用一种MIP或多种不同类型的各自用于特定真菌毒或真菌毒素群的MIP的真菌毒素水平溯源用于检测血液的真菌毒含量。例如,本发明能用于输血实践以有助于连续审计追踪,其通过真菌毒素水平溯源来解释从捐献者的初始采集直至向接受者输血或丢弃的所有时间点的与处理、测试、储存等方面有关的血液产品行踪及其目前状态。

[0155] 在一些实施方案中,本发明将与一种或多种本文所述方法和/或材料结合的本文所述MIP用于减少、去除和/或消除真菌毒素的组合物和/或方法(例如,本文描述的物理、混合、化学、微生物方法(例如,以吸附和/或螯合毒素))。例如,在一些实施方案中,与一种或多种物理、混合、化学、微生物方法一起使用本文描述的MIP以螯合真菌毒素。能将多种物理方法用于减少真菌毒素存在,例如机械分离(参见例如,Dickens J.W.和Whitaker T.B.,1975.Peanut Science,2:45-50)、密度分离(参见例如,Huff W.E.和Hagler W.M.,1982.Cereal Chemistry,59:152-153)、通过使用水或碳酸钠洗涤的谷物清洗以减少玉米污染(例如,具有镰刀菌毒素)、整理污染的谷物(例如,通过物理分离或荧光性以检测真菌毒素的存在)、热失活(参见例如,Lee L.S.,1989.Journal of American Oil Chemistry Society,66:1398-1413)、UV照射、X射线或微波照射(参见例如,CAST,2003.Mycotoxins:Risk inplant,animal,and human systems.In:Task Force Report 139(NiyoK.编辑),Council for Agricultural Science and Technology,Ames,Iowa,USA:pp.1-199)以及毒素的溶剂萃取(参见例如,Scott P.M.,1998.Review of Veterinary Medicine,149:543-548)。诸如酸、碱(例如,氨、苛性钠)、氧化剂(例如,过氧化氢、臭氧)、还原剂(例如,亚硫酸氢盐)、氯化剂和甲醛的多种化学试剂已经用于降解污染的饲料中的真菌毒素,特别是黄曲霉毒素(参见例如,Hagler W.M,Jr.,1991.In Mycotoxins,Cancer and Health,(Bray G.和Ryan D.编辑),Lousiana State University Press,Baton Rouge,LN,USA;Phillips T.D.,Clement B.A.和Park D.L.,1994.Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds.In:The toxicology of aflatoxins:Human health,veterinary agriculture significance(Eaton L.D.和Groopman J.D.编辑),Academic Press,New

York,NY,USA:pp.383-406)。类似地,过滤器(例如,过滤柱)和类似的设备能用于去除真菌毒素。

[0156] 本发明还提供了供给各个方面产品的体系和方法(例如,本发明的产品和/或其组分和/或使用本发明的服务)。本发明还提供了向公司以外的一方供给公司产品的体系和方法,例如用于向顾客或产品经销商提供公司产品,例如一种或多种MIP(例如,特异的真菌毒素-靶向的MIP)。例如,在一些实施方案中,本发明提供了能从溯源体系中分离或与溯源体系结合的产品管理体系。例如,能分析材料样本以确定材料中是否存在或不存在真菌毒素;如果存在真菌毒素,则能识别具体的真菌毒素。该信息能用于溯源(例如,以说明不存在所有或某些真菌毒素)。该信息还能用于提供MIP产品管理的体系,由此能建立特异的MIP组合并将其结合在一起以特异地靶向样品材料中存在的真菌毒素。

[0157] 在一些实施方案中,公司接收从公司以外的一方(例如,经销商和/或顾客)至指令部门的输入(例如,指令、信息或材料(例如,生物样品(例如,怀疑包含靶化合物的液体样品))的形式);并提供了输出(例如,从运输部分递送的产品形式(例如,至经销商和/或顾客)或数据报告形式(例如, 实验室分析服务形式的溯源))。在一些实施方案中,组织产品管理体系以最优化指令接收和向公司以外的一方的产品(例如,包含一种或多种MIP(例如,真菌毒素-特异性MIP)的组合物)递送(例如,以成本有效方式);并从所述方获得这类产品的支付。在一些实施方案中,组织产品管理体系以使递交的样品或材料具有条形码从而用于分析和将数据表报告(例如,通过使用由MIP(例如,真菌毒素-特异性MIP)制备的MIP-SPE或HPLC柱分析的若干真菌毒素水平)递送(例如,以成本有效方式)至公司以外的一方;以及从所述一方获得这类产品的支付。

[0158] 在一些实施方案中,公司包括制造过程和给药过程。本发明的组合物能在制造过程中生产和/或通过第三方生产,并能诸如以物料储存和/或其它组分储存(例如,产品储存)形式在上述过程中单独地储存和/或能被进一步集合(例如,组合(例如,能将一种或多种MIP与一种或多种其它类型的MIP和/或与其它组分(例如,本文描述的载体和/或其它生物活性组分)组合))和储存(例如,在设备和/或产品储存中)。在一些实施方案中,给药包括指令部门(例如,接收来自顾客和/或经销商的产品的指令形式的输入)。然后,指令部门以指示运输部门满足指令的形式提供输出(即,按照顾客或经销商的要求运输产品)。在一些实施方案中,运输部门除了满足产品或服务的指令之外还能向财务部门提供信息/数据。在一些实施方案中,公司的其它组分可包括客服部门(例如,能从顾客接收输入和/或以反馈或信息的形式向顾客提供输出和/或接收信息或向公司的任何其它组分提供输出)。例如,客服部门还可以以所需的技术信息形式从顾客接收输入,例如用于确定本发明的产品和方法能用于特殊需要的顾客,并能以对所需技术信息做出响应的形式向顾客提供输出。

[0159] 因此,在一些实施方案中,适当配置公司的部分以进行彼此交流从而促进材料和部件、设备、其它部分、产品、公司内部和外部的数据资料和信息的传递。例如,物理路径能用于当从指令部门接收合适的输入时将产品从产品储存传送至运输部门,或当接收紧急分析要求时将产品从样品储存传送至分析部门。相比之下,能将指令部门与公司内的其它部分电子连接,例如通过通信网络(例如,网络(例如,因特网和/或内联网)),并能被进一步配置以便例如通过电话网络、通过邮件或其它载体服 务或通过因特网而从顾客接收输入。

[0160] 在一些实施方案中,产品管理体系还包括一种或多种数据采集系统。

[0161] 在一些实施方案中，公司能使用大量软件应用以向公司部分提供信息和/或向公司以外一方提供对一种或多种公司部分的访问(例如，对指令部门和/或客服部门和/或数据采集/储存的访问)。这样的软件应用可包括诸如因特网、局域网络或内联网的通信网络。例如，在基于因特网的应用中，顾客能访问与指令部门合作的合适的网站和/或网络服务器，以使顾客能向指令部门提供指令形式的输入。作为回应，指令部门能与顾客交流以确认已经接收到指令，并还能与运输部门交流，提供将本发明的产品(例如，包含一种或多种不同类型的MIP(例如，真菌毒素特异性MIP)的组合物)运输至顾客或分析部门的输入，提供输入，即，应使用本发明的产品(例如，将包含一种或多种不同类型的MIP(例如，真菌毒素特异性MIP)的组合物包装为分离装置)进行的分析。因此，以该方式，公司业务能以有效的方式进行。

[0162] 因此，在一些实施方案中，在网络布置中，公司的各个子部分(例如，储存、分析、财务部门和运输部门)能通过各自的计算机系统彼此交流。在一些实施方案中，本发明提供了方法，其用于向一方(例如，顾客/使用者、经销商、第三方(例如，政府机构(例如，健康研究中心和/或疾病控制中心)等)提供各个方面的产品(例如，本发明的产品和/或其组分)以及关于本发明各个方面的产品信息(例如，性能数据、使用统计等)。在一些实施方案中，例如通过运输部门从产品储存中移除产品并发送至诸如顾客或经销商的需求方。通常，这样的运输响应于下指令一方而发生，然后其在组织内被处理(例如，传送至合适部分)并导致指令的产品发送至所述一方或向所述一方提供服务。能在组织内进一步传送关于产品装货的数据或针对所述一方的分析服务数据资料，例如，从运输或分析部门传送至财务部门，其反过来能向所述一方传送随同产品或数据资料或在产品或数据资料已经发送后的账单。本发明还提供了向使用本发明的产品和/或其组分的一方提供技术服务的方法。当这样的功能可通过与产品研究和开发有关的个人进行时，与技术服务相关的询问通常能由组织的行政部门(例如，客服部门)处理、安排和/或管理。技术服务(例如，解决与产 品或产品各个组分的使用有关的问题)交流可能需要使用者(例如，顾客)和客服部门间交换信息。

[0163] 如上所述，向使用者提供产品(例如，本文描述的产品和/或其组分)和/或服务的方法的许多变型是可能的并在本发明的范围内。因此，本发明包括的方法(例如，商业方法)涉及(1)产品(例如，本文描述的产品和/或其组分)的生产；(2)接收这些产品的指令；(3)向下这些指令的一方发送产品；(4)向负责支付所发送的产品的一方发送账单；和/或(5)接收产品所发送至的一方的付款。例如，提供包括下列步骤中的两种或多种的方法：(a)从供应商获得部件、材料和/或组分；(b)制备一种或多种第一产品(例如，一种或多种本文描述的组分(例如，本文描述的MIP模板和/或使用MIP模板生成的一种或多种不同类型的MIP))；(c)储存一种或多种步骤(b)的第一产品；(d)将一种或多种步骤(b)的第一产品与一种或多种其它组分结合以形成一种或多种第二产品(例如，包含两种或多种不同类型的MIP的组合物)；(e)储存一种或多种步骤(b)的第一产品或一种或多种步骤(d)的第二产品；(f)获得步骤(b)的第一产品或步骤(d)的第二产品的指令；(g)向下步骤(f)的指令的一方运输步骤(b)的第一产品或步骤(d)的第二产品；(h)跟踪关于骤(g)中产品被运输至的一方的欠款量的数据；(i)向步骤(g)中产品被运输至的一方发送账单；(j)获得步骤(g)中运输的产品的付款(通常但不必须地，付款由步骤(g)中产品被运输至的一方进行)；以及(k)在组织部门和拥有步骤(d)中运输的产品的一方(通常，为在步骤(g)中产品被运输至的一方)之间交换

技术信息。

[0164] 购买者希望购买一种或多种不同类型的MIP。在一些实施方案中，针对购买者订制包含多种不同类型的MIP的组合物(例如，基于与一种或多种类型的待消除/螯合的靶化合物的存在有关的信息)。该优点在于顾客可按照其需要订制特定的产品(例如，购买包含多种不同类型的对各个靶化合物有特异性的MIP的组合物，而不分别购买包含仅一种MIP的组合物，然后与其它的进行结合而使用各个组合物)。

[0165] 本发明还提供了与定制产品设计有关的方法。这些方法包括例如(1)收集客户对具有特殊子组分的产品和/或操作所述产品的方法进行的指令，(2)制备或准备具有特殊子组分的产品和/或操作所述产品的方法，(3) 以及向顾客提供(例如，运输)(b)的产品。

[0166] 此外，本发明还涉及以下实施方案：

[0167] 1.组合物，其包含使用真菌毒素模板合成的分子印迹聚合物。

[0168] 2.如实施方案1所述的组合物，其中所述真菌毒素模板为赭曲霉素模板。

[0169] 3.如实施方案2所述的组合物，其中所述赭曲霉素模板为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。

[0170] 4.如实施方案1所述的组合物，其中所述真菌毒素模板为甚孢菌素模板。

[0171] 5.如实施方案4所述的组合物，其中所述甚孢菌素模板为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0172] 6.如实施方案4所述的组合物，其中所述甚孢菌素模板选自3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙酯、6,7-二甲氧基靛红和6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0173] 7.制备分子印迹聚合物的方法，其包括：

[0174] a)提供：

[0175] i.真菌毒素模板；和

[0176] ii.一种或多种单体和一种或多种交联剂；以及

[0177] b)在允许所述一种或多种单体和所述一种或多种交联剂在存在所述真菌毒素模板时聚合的条件下，使所述真菌毒素模板与所述一种或多种单体和所述一种或多种交联剂接触。

[0178] 8.如实施方案7所述的方法，其中所述真菌毒素模板为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。

[0179] 9.如实施方案7所述的方法，其中所述真菌毒素模板为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0180] 10.如实施方案7所述的方法，其中所述一种或多种单体选自2-乙烯基吡啶、2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸。

[0181] 11.如实施方案7所述的方法，其中所述一种或多种交联剂包含二甲基丙烯酸乙二醇酯。

[0182] 12.如实施方案7所述的方法，其中在55摄氏度至110摄氏度的温 度下，通过在有机溶剂中形成自由基引发所述聚合。

[0183] 13.如实施方案12所述的方法，其中通过偶氮异丁腈(AIBN)的热引发分解而形成所述自由基。

[0184] 14.如实施方案12所述的方法，其中所述有机溶剂选自甲苯、环己烷、乙腈、聚乙烯

醇(PVA)/水溶液以及甲苯、环己烷、乙腈和PVA/水溶液中的两种或多种的混合物。

[0185] 15.如实施方案12所述的方法，其中所述温度为55摄氏度至75摄氏度。

[0186] 16.如实施方案7所述的方法，其中在所述一种或多种单体和所述一种或多种交联剂聚合之后，从所述分子印迹聚合物中去除所述真菌毒素模板。

[0187] 17.如实施方案16所述的方法，其中利用由选自有机溶剂、缓冲液、水及其组合的溶液的一次或多次洗涤从所述分子印迹聚合物中去除所述真菌毒素模板。

[0188] 18.如实施方案17所述的方法，其中所述有机溶剂选自乙醇、甲醇、乙腈、甲苯及其混合物。

[0189] 19.如实施方案17所述的方法，其中所述缓冲液为通过使氢氧化钠、柠檬酸、琥珀酸和醋酸反应而制备的缓冲液。

[0190] 20.如实施方案17所述的方法，其中所述水为去离子水。

[0191] 21.如实施方案17所述的方法，其中在所述一次或多次洗涤后干燥所述分子印迹聚合物。

[0192] 22.如实施方案21所述的方法，其中利用将所述分子印迹聚合物暴露于20摄氏度至90摄氏度的温度来干燥所述分子印迹聚合物。

[0193] 23.如实施方案22所述的方法，其中所述温度为60摄氏度至80摄氏度。

[0194] 24.如实施方案23所述的方法，其中所述温度为75摄氏度至80摄氏度。

[0195] 25.从材料中螯合真菌毒素的方法，其包括：

[0196] a)提供：

[0197] i)包含真菌毒素的材料；和

[0198] ii)在真菌毒素模板的存在下通过聚合一种或多种单体和一种或多种交联剂而生成的分子印迹聚合物；以及

[0199] b)在允许所述分子印迹聚合物与所述真菌毒素结合的条件下，使所述分子印迹聚合物与所述包含真菌毒素的材料接触。

[0200] 26.如实施方案25所述的方法，其中所述方法从所述材料中螯合赭曲霉素A。

[0201] 27.如实施方案25所述的方法，其中所述方法从所述材料中螯合葚孢菌素。

[0202] 28.如实施方案25所述的方法，其中所述包含真菌毒素的材料选自饮料、食品、动物饲料、药物组合物、营养品组合物、化妆品组合物和维持生命所必需的物质。

[0203] 29.如实施方案28所述的方法，其中所述维持生命所必需的物质选自在水产业中使用的培养基和包含氧气的气体样品。

[0204] 30.如实施方案25所述的方法，其中与真菌毒素结合的分子印迹聚合物未与所述包含真菌毒素的材料分离。

[0205] 31.如实施方案25所述的方法，其还包括c)从所述包含真菌毒素的材料中分离与真菌毒素结合的分子印迹聚合物。

[0206] 32.如实施方案31所述的方法，其中所述分离包括从所述包含真菌毒素的材料中萃取、浓缩和隔离所述与真菌毒素结合的分子印迹聚合物。

[0207] 33.如实施方案32所述的方法，其中所述分离发生在色谱或分离柱或筒中。

[0208] 34.如实施方案32所述的方法，其中分离后，通过洗涤从所述分子印迹聚合物中去除与所述分子印迹聚合物结合的真菌毒素。

[0209] 35.如实施方案34所述的方法，其中在从所述分子印迹聚合物中去除之后，定性和定量分析所述真菌毒素。

[0210] 36.如实施方案35所述的方法，其中将所述定量和定性分析用于溯源。

[0211] 37.如实施方案34所述的方法，其中将所述已经去除真菌毒素的分子印迹聚合物再使用以从包含真菌毒素的材料中螯合真菌毒素。

[0212] 38.如实施方案25所述的方法，其中所述分子印迹聚合物吸附比其 重量大1至10倍的水。

[0213] 39.如实施方案38所述的方法，其中所述分子印迹聚合物吸附比其重量大1至5倍的水。

[0214] 40.如实施方案38所述的方法，其中所述分子印迹聚合物吸附比其重量大1至2倍的水。

[0215] 41.如实施方案25所述的方法，其中使两种或多种不同的分子印迹聚合物与所述包含真菌毒素的材料接触以从所述材料中螯合两种或多种特定的真菌毒素。

[0216] 42.用于合成N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸的方法，其包括：

[0217] a)将3-5二氯水杨酸转化为2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸；

[0218] b)将2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸转化为2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯；

[0219] c)使2-乙酰氧基乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯与L-苯丙氨酸乙酯反应以形成N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸；以及

[0220] d)将N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸转化为N-(2-羟基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸。

[0221] 43.如实施方案42所述的方法，其中所述转化包括水解N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸中的酯官能团。

[0222] 44.用于合成5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红的方法，其包括：

[0223] a)将2,3-二甲氧基苯甲酸转化为2,3-二甲氧基-N-叔丁氧基羰基苯胺；

[0224] b)将2,3-二甲氧基-N-叔丁氧基羰基苯胺转化为2,3-二甲氧基苯胺；

[0225] c)使2,3-二甲氧基苯胺与酮基丙二酸二乙酯反应以形成6,7-二甲氧基-3-羟基-3-(2-吲哚酮)-羧酸乙酯；

[0226] d)将6,7-二甲氧基-3-羟基-3-(2-吲哚酮)-羧酸乙酯转化为6,7-二甲氧基靛红；

[0227] e)将6,7-二甲氧基靛红转化为6,7-二甲氧基-1-甲基靛红；以及

[0228] f)将6,7-二甲氧基-1-甲基靛红转化为5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。

[0229] 实施例

[0230] 提供下列实施例以说明和进一步例示本发明的某些优选实施方案和方面，并且不应理解为限制其范围。

[0231] 实施例1

[0232] 赭曲霉素A模板的合成

[0233] 2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸的制备。将1L装备有机械搅拌器、温度计以及压力平衡的125mL滴液漏斗的圆底三口烧瓶放置在水浴中，并保持在65℃下。随后，伴随高效搅拌将下列试剂装入至烧瓶：250mL的干燥甲苯、2.5mL的浓硫酸和207g的充分研磨的固体3,5-

二氯水杨酸，其形成流动悬浮液。当该不断搅拌的混合物的温度达到60℃时(使水浴温度保持在65℃下)，开始滴加108g(100mL)的醋酸酐并在30分钟内完成。在醋酸酐加入过程中，使反应混合物温度不超过75℃。在完成加入后，将混合物搅拌并加热至70℃，另外保持4小时。在该时间后，停止搅拌并将混合物冷却过夜至室温。将从混合物分离的白色结晶过滤除去，用2×10mL的冰冷甲苯洗涤并在50℃下真空干燥以产生206g(产率为82.7％)的2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸。通过浓缩滤液至1/2的最初体积，在冰水浴中冷却溶液，过滤除去结晶产品并在50℃下将其真空干燥来回收另外的30.6g(产率为12.3％)的产物。

[0234] 原位制备2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰氯及其在N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯的制备中的用途(出于个人安全，该过程在通风厨下进行)。

[0235] 制备体系由3L反应器组成，所述反应器装备有高效机械搅拌器(Ace Glass Inc，Louisville,KY,cat#13650-12/23)、250mL滴液漏斗、具有出口与酸性蒸汽吸收器连接的$CaCl_2$干燥管的回流冷凝器、干燥氮气入口和放置在22℃水浴中的温度计。在搅拌下，将1L的干燥甲苯、5mL的二甲基甲酰胺和103g的2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酸装入反应器中。在搅拌下一滴一滴地加入至217mL(1.05当量)的2M草酰氯溶液的二氯甲烷反应混合物中，时间为2.5小时。在放置在使用自来水冷却的截止阀中的1 L的10％氢氧化钠溶液中吸收在反应中产生的有毒气体混合物流：HCl、CO和CO_2。在伴随着完全溶解固体而完成的草酰氯加入之后，使强流的干燥氮气通过溶液1小时以去除保持溶解在反应混合物中的大多数酸性气体(HCl、CO_2)。之后，在冰水浴中将烧瓶的容纳物冷却低于15℃，并将95g(1.0当量)的固体L-苯丙氨酸乙酯盐酸盐加入至混合物中。安装新的500mL滴液漏斗代替250mL的漏斗并充满145mL三乙胺(2.55当量)的350mL甲苯的溶液。然后，在2小时内将三乙胺溶液加入至冰水浴冷却和搅拌的反应混合物中。在加入过程中，将混合物的温度保持低于25℃。在完成三乙胺加入后将该温度保持4小时，然后过滤除去三乙胺盐酸盐并用两份100mL的甲苯洗涤白色滤饼。然后，将滤液转移至3L分液漏斗中并用两份500mL的水和一份500mL的盐水洗涤。然后，将甲苯层浓缩至500mL的体积并在冰箱中放置过夜以结晶。在过滤器上收集白色结晶并用一份100mL的冰冷甲苯洗涤，生成108.7g(62％产率)的N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯。

[0236] ^1H NMR(氘代氯仿(简写为$CDCl_3$)，ppm)：7.78δ，J 2.8,1H;7.55δ，J 2.4,1H;7.30-7.27m,3H;7.11宽峰δ，J 8.0,1H;7.08δq，J 8.0和1.6,1H;4.99q，J 6.0,1H;4.24q，J 7.0,2H;3.29dd，J 5.6和14.4,1H;3.21dd，J 9.2和14.0,1H;2.11s,3H;1.31t，J 7.2,3H。

[0237] N-(3,5-二氯-2-羟基苯甲酰基)-L-苯丙氨酸(OTA模板)的制备。将108g的N-(2-乙酰氧基-3,5-二氯苯甲酰基)-L-苯丙氨酸乙酯溶解在1L的无水乙醇中并放置在装备有磁力搅拌棒的2L的圆底烧瓶中，并在环境温度下放置在水浴中。一批次将33.33g氢氧化钠的37.2mL水的溶液加入至该混合物中，并在环境温度下将混合物搅拌17小时(过夜)。在搅拌下加入体积为68.6mL的浓盐酸，将其保持另外2小时。过滤除去沉淀的氯化钠并在30T的压力下在60℃下将滤液浓缩至干燥。在冷却后，88.9g(产率为98％)的残留物以无色透明产物形式而凝固，将其充分溶解在甲苯或乙腈中从而制备OTA模板(例如，用于MIP-OTA制备)。MS：M^+354和356 ^1H NMR($CDCl_3$，ppm)：12.2非常宽s,1H;7.49d，J 2.4,1H;7.35-7.28m,3H;7.20d，J 2.0,1H;7.18-7.16m,2H;6.80br d，J 6.4,1H;6.4非常宽s,1H;5.07dd，5.2和5.2,1H;3.34dd，J 14.0和5.2,1H;3.27dd，J 13.6和5.2，1H。

[0238] 实施例2

[0239] 在甲苯-环己烷混合物中的MIP-OTA合成

[0240] 将500mL的甲苯，35.42g(0.1M)的OTA模板、16.18mL(0.15M)的2-乙烯基吡啶、12.13mL(0.1M)的甲基丙烯酸2-羟基乙酯、235.75mL(1.25M)的二甲基丙烯酸乙二醇酯和2.46g(15mM)的AIBN放置在装备有机械搅拌器、回流冷凝器、温度计和氮气入口/出口的3L四颈烧瓶中。在室温下，将产生的澄清溶液搅拌1小时并使恒定的氮气流通过容器(例如，用于去除能抑制聚合的氧气)。然后，将烧瓶加热至60℃并剧烈搅拌混合物。只要溶液的温度增加至约55℃则发生聚合(例如，通过溶液粘度的增加而观察到的)。在聚合开始后15分钟，一批加入600mL的(1:1)环己烷/甲苯混合物以促进聚合物球从溶液中分离。保持混合物的剧烈搅拌并在30分钟后加入另外500mL的甲苯以提高仍然增加体积的固体MIP悬浮液在相对低体积的溶剂中的整体混合。将60℃的温度和搅拌保持另外5小时，此后关闭搅拌以使MIP球沉淀。倾倒上层清液并将颗粒转移至2L旋转蒸发仪烧瓶中以在40℃下和30T的减压下从MIP球中去除剩余的溶剂。将干燥的球研磨至约140目并通过使用1.5L的0.2w/v%的氢氧化钠溶液搅拌30分钟并倾析来洗涤5次。将最终部分的MIP-OTA球与也被倾析的1.5L 0.5v/v%醋酸和1.5L DI水混合。使用四个玻璃托盘将生成的无模板的润湿MIP-OTA球(约1.0L体积)在80℃下的实验室烘箱中干燥4小时。白色粉末状MIP-OTA重量为248g(产率为93%)。使用该方法合成下列表1中识别的各个样品。

[0241] 对于该合成步骤和随后的合成步骤，在用于聚合前，通过真空蒸馏从单体和交联剂中去除聚合抑制剂，并且用于聚合的溶剂为ACS纯度。通过比较在$\lambda_{最大}$385nm处的模板的橙红色Fe^{3+}络合物强度与在10μg/mL至1mg/mL的模板浓度下建立的校正曲线，来获得在随后的洗涤中的模板浓度。

[0242] 表1.在甲苯-环己烷混合物中合成的样品的识别

[0243]

样品ID	甲苯-环己烷(mL)	最终的洗涤	形态

[0244]

523-29/30	45/15	乙醇	球状，白色粉末
523-31	65/15	乙醇	球状，白色粉末
523-34	65/35	乙醇/NaOH	球状，白色粉末
523-35	55/22	乙醇/NEt_3/H_2O	白色粉末，簇状
523-36	90/30	NaOH/H_2O	白色簇状

[0245] 实施例3

[0246] 在乙腈中的OTA MIP合成

[0247] 将500mL的乙腈、17.71g(50mM)的OTA模板、8.1mL(75mM)的2-乙烯基吡啶、6.1mL(50mM)的甲基丙烯酸2-羟基乙酯、117.9mL(625mM)的二甲基丙烯酸乙二醇酯和1.23g(15mM)的AIBN放置在3L的装备有机械搅拌器、500mL压力平衡的滴液漏斗、温度计和氮气入口/出口的四颈烧瓶中并使用电热套加热。将产生的澄清溶液在室温下搅拌1小时并使恒定的氮气流通过容器(例如，用于去除能抑制聚合的氧气)。然后，将烧瓶加热至60℃并剧烈搅拌混合物。只要溶液温度增加至约55℃则确保聚合发生(例如，通过溶液粘度的增加而观察到的)。在聚合开始后的30分钟(例如，当可观察到凝胶形成时)，从500mL的滴液漏斗中分三

份迅速添加1.5L的乙腈(预热至55℃并使用氮气洗涤以去除氧气)以避免阻止聚合物形成并促进从溶液中分离聚合物球。将混合物的剧烈搅拌和加热保持另外17小时(过夜)。然后,关闭加热和搅拌并使MIP球沉淀。倾析上层清液并将小球转移至2L旋转蒸发仪烧瓶中并在40℃和30T的减压下从MIP球中去除剩余的溶剂。将干燥的球研磨至约140目并通过使用1.5L的0.2w/v%氢氧化钠溶液搅拌30分钟并倾析来洗涤5次。将MIP-OTA球的最终部分与也被倾析的1.5L的0.5v/v%醋酸和1.5L DI水混合。使用4个玻璃托盘,在80℃下的实验室烘箱中将生成的无模板的湿润MIP-OTA球(体积为约1.2L)干燥6小时。白色粉末状MIP-OTA称重为115g(产率为86.2%)。使用该方法合成在下列表2中识别的各个样品。

[0248] 表2.在乙腈中合成的样品的识别

[0249]

样品ID	乙腈(mL)	最终的洗涤*	形态
523-48	100(+甲苯50mL)	NaOH	球状/簇状,黄色
523-49	50(+水150mL)	NaOH	球状,黄色/橙色

[0250]

523-59	225mL	NaOH	球状,白色
523-60	190mL	NaOH	球状,白色

[0251] *在4×0.2%NaOH洗涤后,1×1%AcOH洗涤随后使用1×H_2O洗涤。

[0252] 实施例4

[0253] 在甲苯中的大规模MIP-OTA制备

[0254] 在具有四颈盖子的3L反应器中进行制备,所述反应器装备有:具有在底部和中部安装的两个螺旋桨的机械搅拌器、电热套、温度计、空气平衡的1.5L滴液漏斗和氮气入口以及装备有控制氮气流量的流量计的回流冷凝器。将下列试剂装载入反应器:54.54g(154mM)的N-(3,5-二氯-2-羟基苯甲酰基)-L-苯丙氨酸(OTA模板)、25mL(231mM)的2-乙烯基吡啶、18.7mL(154.0mM)的单甲基丙烯酸乙二醇酯、363g(1.925M)的二甲基丙烯酸乙二醇酯、770mL的甲苯和5.0g(30.8mM)的AIBN。将另外的1.5L的甲苯放置在滴液漏斗中。将反应混合物剧烈搅拌,并通过在环境温度下使强流的氮气首先通过放置在滴液漏斗中的甲苯随后通过空体积的反应器45分钟以去除溶解的气体。在聚合过程中保持弱的氮气流。通过将反应混合物加热至高达55℃引发聚合。在15min后,混合物的粘度增加,并且搅拌变得不太有效。此时,从滴液漏斗中加入另外体积的甲苯(为环境温度)。将加入过程设置以足够快速运行,从而防止由于反应的放热性质而产生的混合物过热并保持反应混合物的粘度足够低以使在聚合物球的形成和分离过程中的搅拌有效。将60-70℃的温度和搅拌保持另外5小时,然后使混合物在环境温度下不搅拌直至第二天。然后,从MIP颗粒和研磨的甲苯湿润MIP颗粒中倾析1.75L的甲苯层并转移至2.0L的旋转蒸发仪烧瓶。在轻微的减压下和低于70℃的温度下将在MIP颗粒内捕获的大部分甲苯(约0.45L)从MIP球中蒸馏除去。在甲苯去除结束时,已经形成的粉末状产物展现出产生粉末的倾向。此时,停止蒸发并使用2份每份为500mL的乙醇来洗涤MIP颗粒。然后,从固体中倾析约0.75L的乙醇并蒸发以产生30g(55%)的再生OTA模板和700mL的再生乙醇。然后,使用4×0.5L份的0.2w/v%NaOH洗涤白色细固体,随后使用500mL的1v/v%醋酸洗涤一次和500mL份的DI水洗涤一次。然后在80℃下的实验室烘箱将生成的'湿润'OTA-MIP干燥24小时。获 得大量的411.4g(产率为96.6%)的白色粉末状产

物并使用标准筛分离。将该方法用于合成表3中识别的各个样品。表4提供尺寸重新分配的细节。

[0255] 表3.在甲苯或聚乙烯醇(简写为PVA)中合成的样品的识别

[0256]

样品ID	甲苯或PVA(mL)	最终的洗涤	形态
514-37/39	150mL甲苯	NaOH*	球状/簇状,白色
523-40	5mL PVA+100mL水	NaOH*	球状/簇状,白色
514-41	5mL PVA+50mL水	NaOH*	球状/簇状,绿色
514-42/44	388+776mL甲苯	NaOH*	球状/簇状,白色

[0257] *使用4×0.2%NaOH洗涤,随后使用1×1%AcOH1洗涤和1×水洗涤。

[0258] 表4.产生的MIP-OTA的尺寸重新分配

[0259]

分级尺寸	分级重量(g)	MIP-OTA重量百分比
＞106μm	212.81	51.8
45μm-106μm	127.72	31.1
20μm-45μm	56.97	13.9
＜20μm	13.28	3.2

[0260] 实施例5

[0261] 低温和UV引发的MIP-OTA和NIP聚合/合成

[0262] 光化学反应装置。将石英、在450瓦UV灯(ACE Glass,目录#7825-34)和450瓦套管电源(ACE Glass,目录#7830-58)中装备的光化学UV浸没池(Ace Glass,目录#7856-10)与循环冷却装置WKL 230LAUDA(由Brinkmann Instuments,Inc.提供)连接,并在UV灯开启时使4℃的冷却水运行通过池套。

[0263] 聚合(表5):将单体、模板、引发剂(IABN)和交联剂放置在半透明、聚乙烯瓶(Nalgene®型2105)中并使氩气流通过混合物15分钟以去除所有氧气,已知其抑制游离自由基聚合。然后,将瓶封闭并在UV灯中心水平处与浸没池连接,并与光化学反应装置一起浸入冰水浴中。当开启灯时使冷却水运行通过灯套,并使反应混合物照射保持四小时(当UV灯开启时需要UV安全玻璃)。在UV聚合过程中,供给另外的冰并从浴中排掉过量的水以保持冷却浴温度在4℃。在完成聚合后打开瓶,将聚合物压碎并磨碎成小块,将其洗涤:使用乙醇洗涤一次,使用0.2%的氢氧化钠 洗涤十次,使用1%的醋酸洗涤一次并使用乙醇洗涤三次以从聚合物中去除模板,并且确保最终在实验室烘箱中干燥以去除乙醇残留物的MIP的最大活性。对于#555-54A和555-54B,MIP-OTA的产率分别为56.7%和49%。

[0264] 表5.使用低温和UV引发合成的MIP-OTA样品的识别

[0265]

MIP-OTA	苯乙烯 (mM)	2-乙烯基-吡啶 (mM)	单甲基丙烯酸乙二醇酯 (mM)	二甲基丙烯酸乙二酯 (mM)	IABN (mM)	OTA 模板 (mM)
555-54A	10.73	-	7.16	89.5	1.07	7.16
555-54B	-	10.73	7.16	89.5	1.07	7.16

[0266] 实施例6

[0267] MIP对真菌毒素的螯合能力-应用于OTA

[0268] 对OTA(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA)真菌毒素,测试用于通过化学相互作用从液体或半液体介质去除OTA真菌毒素的在甲苯-环己烷、乙腈或甲苯中制备的MIP聚合物。制备的MIP在本文用于描述螯合OTA真菌毒素的亲合力差异并用于评价物质的特异性。将12.5mg的MIP放入Amicon超速离心过滤器设备(5,000Da)。与不含MIP物质的空白样品和仅包含待测试的OTA毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行螯合试验。保持在37℃的温度下,在150rpm下在轨道旋转振动器(Brnnswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。使用最终体积为12.5mL的十亿分之50、十亿分之100、十亿分之250(ppb)的体系测试三个最终浓度的OTA。在孵育后,将微型离心管在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并根据标准方法(参见例如,Entwisle A.C.,Williams A.C.,Mann P.J.,Slack P.T.,Gilbert J.,1995.Liquid chromatography method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley:Collaborative study(用于确定大麦中赭曲霉素A的具有免疫亲和性柱清洗的液体色谱方法:合作研究).Journal of AOAC,83:1377-1383)从与荧光和二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA) 中进行计算(例如,以检测真菌毒素和螯合的真菌毒素的量)。

[0269] 结果(参见表5)表明在1.00g/L的浓度下,在含有OTA-模板和不含模板(NIP)的情况下制备的MIP在pH 4.0下对OTA真菌毒素分子具有非常高的亲合力。根据所述制备方法,在沉淀聚合后生成的MIP(标识为在甲苯中合成的#523-31;在甲苯-环已烷混合物中合成的#523-34、-35、-36;以及在甲苯-乙腈混合物中合成的#523-48)具有的螯合功效高于98.8%,而在乳化聚合后生成的MIP(标识为在水和聚乙烯醇中合成的#523-40和-41;以及在乙腈中合成的49)具有的较低亲合力低于63%。NIP分子还能以98.8%的螯合功效而相互作用。在该阶段,沉淀聚合组表现出在NIP和MIP之间没有统计差别,而乳化聚合组表现出在MIP和NIP之间以及还在MIP之间的显著差别。

[0270] 在15%乙醇/氢氧化钠、醋酸1%溶液下的两次相继洗涤步骤用于评价两个MIP组保持相互作用的能力并解释螯合强度(参见表6)。乳化聚合组显示从MIP强烈释放OTA,以及与OTA真菌毒素共同洗脱的剩余模板的释放解释了负百分比吸附。因此,本发明规定乳化聚合方法不适于对OTA分子产生高效吸附剂。本发明还规定沉淀聚合组对OTA具有显著高的亲合力,使得针对在甲苯-乙腈混合物中合成的MIP仅有26.3%的OTA分子的最大去吸附,而对任何剩余的模板没有任何干扰。

[0271] 表6.对于赭曲霉素A,在甲苯、乙腈和甲苯-环已烷混合物中合成的MIP和NIP的螯合活性以及在使用15%乙醇/氢氧化钠的两次相继洗涤后的相互作用稳定性

[0272]

	平均静止吸附的(%)			平均去吸附的 (%)		
样品 ID	初始	第 1 次洗涤	第 2 次洗涤	初始	第 1 次洗涤	第 2 次洗涤
NIP 523-31#	98.84	92.52	86.66	1.162	7.478	13.342
MIP 523-34#	98.95	93.05	89.50	1.048	6.955	10.500
MIP 523-35#	99.04	90.60	86.09	0.963	9.397	13.915
MIP 523-36#	99.00	86.76	82.83	1.000	13.238	17.175
MIP 523-48#	99.73	85.76	73.71	0.273	14.242	26.293

[0273] #沉淀聚合

[0274] 实施例7

[0275] 用于螯合赭曲霉素A的MIP量的滴定

[0276] 进行滴定实验以研究0.01g/L至1.00g/L的MIP夹杂率(或0.001％至0.1％的夹杂率)。与不含MIP物质的空白样品和仅含待测试的OTA毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行螯合试验。保持在37℃的温度下,在150rpm下,在轨道旋转振动器(Brunswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。使用最终体积为12.5mL的十亿分之50、十亿分之100、十亿分之250(ppb)的体系测试三个最终浓度的OTA。在孵育后,将微型离心管在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并根据标准方法(参见例如,Entwisle等人,2000,如前所引用)从与荧光和二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)中进行计算(例如,以检测真菌毒素和螯合的真菌毒素的量)。

[0277] 如图3所示,在0.05g/L下,最佳功效高于螯合值的80％并达到平均86.4±1.5％的螯合。检查酸性缓冲液条件(pH 4.0)中,通过50ppb、100ppb、200ppb的OTA上的0.010g/L、0.025g/L、0.050g/L、0.075g/L、0.100g/L、0.50g/L和1.00g/L的MIP#523-34(在甲苯-环己烷混合物中合成的)和#523-60(在乙腈中合成的)的螯合活性来评价MIP化合物的夹杂水平的发生率。将MIP尺寸设置在45μm至106μm的粒径,因为该分级给予最佳的螯合结果并代表在合成的总MIP产物中颗粒尺寸的最高比例。

[0278] 各个MIP、#523-34和#523-60能够分别吸附91.53±10.86％和81.75±23.67％的OTA,以作为独立于夹杂水平的平均总螯合。在针对#523-34和#523-60样品分别为0.05g/L和0.10g/L的MIP夹杂水平的螯合曲线中发现偏差点。对于#523-34,0.05g/L至1.00g/L和0.10g/L至1.00g/L的夹杂螯合亲合力平均值分别为96.31±2.23％和97.39±0.70％。对于#523-60,0.05g/L至1.00g/L和0.10g/L至1.00g/L的夹杂水平的螯合亲合力平均值分别为94.51±6.54和97.76±0.91％。因此,本发明规定在甲苯-环己烷混合物中合成的MIP有利于在0.01g/L的夹杂下对OTA螯合具有72.42±2.58％的较高亲合率,而使用乙腈制备的样品在0.01g/L和0.05g/L的产物夹杂下分别具有不太有效的47.40±6.08和84.77±1.96的 亲合率。

[0279] 实施例8

[0280] 不同的MIP和NIP的亲合力及对赭曲霉素A的特异性特征

[0281] 在开展本发明实施方案的过程中进行实验,从而评价在作为聚合用溶剂的乙腈或甲苯中合成的不同NIP/MIP的亲合力。在没有任何OTA模板的情况下合成样品#523-31(甲苯)和#523-59(乙腈)(定义为非印迹聚合物);在OTA类似物模板周围聚合样品#523-34(甲

苯-环己烷的混合物)和#523-60(乙腈)。然后,使用不同截止尺寸的筛子来筛选样品。如在实施例4中描述的测试粒径范围。MIP产物主要产生直径为约45μm至106μm大小的颗粒(如图4所示)。与不含MIP物质的空白样品和仅包含待测试的OTA毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行螯合试验。保持在37℃的温度下,在150rpm下,在轨道旋转振动器(Brunswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。使用最终体积为12.5mL的十亿分之50、十亿分之100、十亿分之250(ppb)的体系测试三个最终浓度的OTA。在孵育后,将微型离心管在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并从与荧光和二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)中进行计算(例如,以检测真菌毒素和分离的真菌毒素的量)。

[0282] OTA亲合力的比较仅显示出在3种不同浓度的毒素上(50ppb、100ppb、250ppb)对没有连续洗涤步骤的单一螯合进行评价而得出的有限差异。仅由没有筛分的NIP制成的样品#523-59在每一pH浓度的OTA下展现出较低的螯合能力。对于50ppb浓度值的OTA,MIP样品#523-34也发现较低的螯合值,特别是在尺寸为20μm至45μm,以及在较少程度中直径为45μm至106μm。因此,在一些实施方案中,本发明规定根据本发明方法制备的MIP颗粒的尺寸对OTA的总吸附亲合力具有较小的影响,在最差的情况下具有螯合率为78%至99%的亲合力波动。与MIP相比NIP在它们的螯合性能中有效性低,解释了MIP与OTA真菌毒素相互作用的特异性。

[0283] 实施例9

[0284] 使用MIP在酒中捕获示踪OTA和使用MIP固相萃取(SPE)类过滤装置在酒中直接过滤示踪赭曲霉素A

[0285] 使用免疫亲和性柱在白色酒(Chardonnay 2005-California)样品上测试标准萃取步骤。在纯的酒样品上以及在包含5ppb、10ppb、20ppb的纯结晶OTA的示踪酒样品上进行萃取。酒的最初浓度平均为1.676±0.269ppb的OTA(例如,如按照标准萃取步骤所测定的)。5ppb的示踪样品回收为100%且对于10ppb为77.7%。

[0286] 与不含MIP物质的空白样品和仅包含待测试的OTA毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行螯合试验。保持在37℃的温度下,在150rpm下,在轨道旋转振动器(Brunswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。使用最终体积为12.5mL的十亿分之50、十亿分之100、十亿分之250(ppb)的体系测试三个最终浓度的OTA。在孵育后,将微型离心管在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并从与荧光和二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(例如,以检测真菌毒素和分离的真菌毒素的量)。

[0287] 使用用于在原始最佳表现的MIP#523-34(苯酚-环己烷混合物)上螯合真菌毒素的标准步骤来评价从酒中螯合OTA。对于0.05g/L、0.10g/L、0.50g/L和1.00g/L的夹杂水平,螯合分别在43.29±4.08%至67.15±4.94%至91.75±1.59%至95.612±1.201%的平均值上变化。当在0.5mg/mL和1.0mg/mL的夹杂水平下使用时,MIP的滴定测定最佳亲合力(参见图5)。

[0288] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了从酒中捕获/吸附真菌毒素(例如,OTA)的

组合物和方法(例如,用于(例如,在震动条件下)有效结合并吸附来自酒的真菌毒素的MIP颗粒)。

[0289] 例如,在一些实施方案中,本发明提供了用于捕获和/或吸附真菌毒素(例如,一种或多种不同类型的真菌毒素(例如,液体介质或来自络合物 基质(例如,饲料、食品、植物、动物等)的萃取溶液中存在的)的MIP(例如,根据本文描述的方法而制备的)。

[0290] 生成固相萃取类(SPE类)过滤装置以用于0.1g/L当量的MIP夹杂物。需要硅烷化的玻璃小瓶以确保OTA在水性溶剂中的稳定性并防止OTA和玻璃小瓶间任何非特异性相互作用。基于通常用于本领域的方法将硅烷化方法应用于尼龙和PTFE/PE过滤器和管(参见例如,Entwisle等人,2000,如前面所引用)。小瓶和过滤器通过使用硅烷化试剂(SURFASIL)填充它们或浸渍它们而制备。在1分钟后,使用甲苯将它们洗涤一次,然后使用甲醇洗涤两次,随后使用水洗涤三次并干燥。如在本领域中进行的,进行硅烷化并产生物质与OTA分子的相互作用的显著降低。例如,观察到小于5%的干扰(例如,当使用PE/PTFE过滤器时,与先前未硅烷化的物质的约16%至26%的干扰相比)。尼龙不适用于硅烷化。使用硅烷化玻璃管替换所有聚丙烯管。

[0291] 生成SPE类过滤装置以在通过柱直接过滤样品后从酒中捕获OTA。测试MIP对从加入有5ppb和10ppb OTA的酒(Chardonnay 2005-California)中清除OTA的功效。结果证实对于加入5ppb和10ppb的OTA,酒的OTA含量立即分别降低为55.41±5.542%和56.937±5.739%。因此,在一些实施方案中,本发明提供了与SPE或SPE类过滤装置一起使用的真菌毒素特异性MIP(例如,根据本文描述的方法而生成的)以从包含真菌毒素的液体(例如,酒)中去除真菌毒素。

[0292] 实施例10

[0293] 使用热引发和低温UV引发的MIP固相萃取(SPE)类过滤装置捕获赭曲霉素A以及对关键的酒成分的选择性评价

[0294] 生成固相萃取类(SPE类)过滤设备以用于0.1g/L当量的MIP的夹杂物。需要硅烷化的玻璃小瓶以确保OTA在水性溶剂中的稳定性并防止OTA和玻璃小瓶间任何非特异性相互作用。基于通常用于本领域的方法将硅烷化方法应用于尼龙和PTFE/PE过滤器和管(参见例如,Entwisle等人,2000,如前面所引用)。小瓶和过滤器通过使用硅烷化试剂(SURFASIL)填充它们或浸渍它们而制备。在1分钟后,使用甲苯将它们洗涤一次, 然后使用甲醇洗涤两次,随后使用水洗涤三次并干燥。如在本领域中进行的,进行硅烷化并产生物质与OTA分子的相互作用的显著降低。例如,观察到小于5%的干扰(例如,当使用PE/PTFE过滤器时,与先前未硅烷化的物质的约16%至26%的干扰相比)。尼龙不适用于硅烷化。使用硅烷化玻璃管替换所有聚丙烯管。

[0295] 通过在甲醇(HPLC级)中溶解并加入水和85%邻磷酸以使pH降低至约3.0来制备包含多酚的12种化合物的原液:咖啡酸(Caf A)、儿茶酸水合物(CH)、表儿茶酸(ECH)、阿魏酸(Fer)、反式-3-羟基肉桂酸(3-HCA)、2-羟基肉桂酸(2-HCA)、锦葵色素-3-半乳糖苷氯化物(Mal)、杨梅酮(Myr)、槲皮黄酮脱水物(QH)、反式-白藜芦醇(Res)、芦丁三水合物(Rut)和吲哚-3-醋酸(IAA)(Sigma,StLouis,MO,USA)。将上层清液收集在琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并从与荧光和二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(例如,以检测真菌毒素和分离

的真菌毒素的量)。使用恒温在30℃的C18反相HPLC Spherisorb ODS柱5μm,4.6μm×250mm(Waters Corp.,Milford,MA,USA)。将激发和发射波长分别设置为225nm和365nm。将UV光电二极管阵列检测器设置为210nm至799nm波长的全扫描模式。流动相由水/磷酸(99.5%:0.5%;v/v)和(B)乙腈(HPLC级)/水/磷酸(50%/49.5%/0.5%;v/v/v)组成。

[0296] 所有MIP均显示出在缓冲液溶液中的OTA的良好吸附,所有均超过80%的吸附。MIP 555-52显示出最佳的吸附,约100%。有趣地,在所有MIP的缓冲液洗涤过程中OTA保持吸附,但在甲醇洗涤过程中解吸附,特别是从热引发的MIP#555-52和#523-34并在最高的OTA浓度下显著。与对热引发的MIP相比,OTA对在甲醇洗涤中的低温和UV-引发的MIP#555-54A和#555-54B保持更好的吸附,对通过甲醇洗涤保持的UV-引发的MIP具有平均超过50%的吸附(参见图6)。

[0297] 充分记载了酒中抗氧化剂多酚化合物的健康益处。在过滤诸如OTA的液体(例如,酒)中的真菌毒素时,还基本评价了螯合剂物质对诸如多酚的一些有益化合物的影响。在一些实施方案和本文的记载中(参见例如,实施例6至实施例9),热引发聚合产生的MIP#555-52和#523-34能够与 液体介质中存在的OTA真菌毒素有效地相互作用,吸附水平超过95%,而低温和UV-引发聚合产生的MIP#555-54和#555-54X则产生为80%至92%的螯合功效的吸附功效(图6)。

[0298] 在一些实施方案中,当使用不同的多酚、花青素和吲哚-3-醋酸的混合物进行评价时,本发明的低温和UV-引发的MIP组合物具有对OTA的d特异性。在该情况下,MIP#555-54A和#555-54B具有OTA的高吸附(超过80%)并同时防止多酚或吲哚-3-醋酸的吸附(例如,其提供了感官和抗氧化特性(例如,酒的))。在UV-引发的MIP的研究中,除去孵育时间并将酒样品和洗涤剂立即推进MIP或过滤器。观察到非常少的吸附(图7)。因此,在一些实施方案中,本发明提供了具有对真菌毒素(例如,OTA)的特异性、而同时具有对有益化合物(例如,多酚和/或吲哚-3-醋酸)的较少结合或没有结合(例如,吸附)的MIP。杨梅酮、白藜芦醇和芦丁的定量倾向于不确定,由于它们在接近检测极限和HPLC分析仪器定量极限下以非常低的浓度存在,产生出大的标准偏差和负值作为结果。因此,在本实施方案中,UV-引发的MIP高效捕获OTA并且不损坏酒液体培养基的多酚含量,说明对产生的MIP物质的特异性。

[0299] 实施例11

[0300] 在玻璃纤维网上涂覆MIP用作过滤装置

[0301] 在进行本发明实施方案的过程中进行实验以测试具有MIP-OTA的玻璃纤维网涂层(参见图8)。将多种浓度的OTA用于测定各个制剂的亲合力。在下列表7中概述生成的不同MIP。使用包含不同浓度的交联剂的MIP涂覆3个网格筛,所述交联剂影响脆度。(单体溶液1、2、3和1H)。基于涂覆MIP之前和之后的重量将从涂覆的MIP制备的网格切割以产生通过微分加权而估计的50mg、100mg和200mg的MIP。使用沉入在20mL离心管中的MIP涂覆的网格进行螯合检验,在使用旋转振动器孵育90分钟后确定酒介质中OTA的螯合特性。在孵化之前和之后使用MIP-OTA网格过滤器测量来自包含加入三种不同浓度的OTA的酒溶液的管中1mL物质。将样品收集在琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素与小瓶的任何相互作用,并从与荧光和二极管阵列检测器信号 连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(例如,以检测真菌毒素和分离的真菌毒素的量)。

[0302] 表7.用于在玻璃纤维网上涂覆MIP的聚合条件的描述

[0303]

参数	功能	单体溶液			
		1	2	3	1H
赭曲霉素A类似物(mg)	模板	1000	500	250	1000
2-乙烯基吡啶(μl)	与OTA形成盐的碱	1000	500	250	1000
乙二醇二甲基丙烯酸酯(mL)	交联剂	5	5	5	5
2-羟基乙基甲基丙烯酸酯(μl)	结合分子	800	400	200	800
偶氮二异丁腈(mg)	聚合引发剂	66	55	50	66
固化(烘箱)	用于干燥网格	65°C	65°C	65°C	80-90°C
溶剂	溶解固体	没有	没有	没有	500 μl 甲苯

[0304] 结果表明对OTA的最大螯合依赖于MIP的夹杂水平。使用500mg的模板、250mg的乙烯基-吡啶和200mg的甲基丙烯酸羟基乙酯来获得螯合最大值(参见图9),所述甲基丙烯酸羟基乙酯产生在100ppb浓度的酒中吸附高达46.5%的OTA的MIP。相反地,使用在纤维玻璃上涂覆的相同处理的NIP聚合物进行相同的实验,表现出依赖制备步骤的小于15%(降至1%)的螯合功效(参见图10),从而例示针MIP-OTA物质对OTA的特异性。

[0305] 实施例12

[0306] MIP的色谱保留能力

[0307] 在水-浴中使用声波降解法,在包装物质后将MIP#523-34(使用甲苯-环已烷混合物合成的)用作4.6×150mm HPLC柱的静态相,然后采用连续过夜的5.0mL/min流速的乙腈运行通过该柱(使用HPLC Waters Alliance binary pump(Waters Corp,Milford,MA,USA)的MIP)。测定柱压力为约400psi并可与其它地方描述的其它HPLC条件比较(参见例如,Baggiani等人,2002,如前面所引用;Jodlbauer J.,Maier N.M.和Lindner Journal of Chromatography A,945:45-63;Maier N.M.,Buttinger G.,Welhartizki S.,Gavioli E.,Lindner W.,2004.Journal of Chromatography B,804:103-11)。使该柱在1.0mL/min的乙腈流速下稳定48小时并使用甲 醇99%和四乙基胺1%广泛洗涤以从柱中去除剩余的OTA模板。使用MIP柱来进行前面的OTA的HPLC-PDA-FID分析表征。

[0308] 在不同的流动相条件下以及在30℃恒温下保持通过该柱的不同梯度设置下来评价柱的生存。测试包括100%水和过渡至100%乙腈或100%甲醇且反之亦然的若干梯度;并还使用四乙基胺1%的甲醇至甲醇100%,时间为60分钟。在将压力增加至高达1600psi后,柱生存并没有静态相的任何改变,解释了柱在高压力下的生存。注射丙酮用于评价柱的空体积,而分析物的洗脱为2分钟时间。使用用于常规ODS C18洗脱特性(85%乙腈)的相同条件来评价OTA洗脱。在等度梯度下使用MIP柱在5分钟时评价OTA保留。为增加OTA的保留时间,实施允许OTA的保留增加至19.5分钟的梯度。

[0309] 图11显示所选择的最终条件并在相关的表中详细说明梯度条件。观察到两个峰,在17分钟至22分钟(在63%的乙腈下)洗脱OTA的主峰且第二峰与通过向柱加入四乙基胺1%而释放的剩余高度结合的OTA部分相关。

[0310] 实施例13

[0311] 甚孢菌素模板合成

[0312] 从2,3-二甲氧基苯甲酸制备N-叔丁氧基羰基-2,3-二甲氧基苯胺。将300mL的无水

叔丁醇、50.0g(274mM)的2,3-二甲氧基苯甲酸和28.33g(280mM,39mL)的无水三乙基乙胺装入装备有120mL压力平衡的滴液漏斗和气体流量计、重型磁力搅拌棒和温度计的1L圆底两颈烧瓶中。将烧瓶的容纳物磁力搅拌并在油浴中加热至80℃。使用足够低的速率将77.04g(280mM,60.5mL)的二苯基叠氮基磷酸酯滴加入混合物中以控制气体产物释放。加热至80℃并将磁力搅拌保持过夜。然后,在30T的真空和低于55℃的温度下将混合物的挥发性组分旋转蒸发。将油状产品转移至1L分液漏斗并溶解在500mL的环已烷和200mL的乙酸乙酯的混合物中。使用200mL DI水将溶液洗涤三次并使用200mL的饱和氯化钠水溶液洗涤一次并在无水硫酸钠上干燥15分钟,过滤并在80℃下在30T的真空下浓缩。获得67.88g无色油状形式的N-叔丁氧基羰基-2,3- 二甲氧基苯胺(产率为98%)。

[0313] TLC,SiO_2,CH_2Cl_2:环已烷(简写为c-Hex)(1∶2);R_f=0.66检测UV,热的5%$KMnO_4$亮黄色。

[0314] FT-IR膜(cm^{-1}):3319,2941,1669,1601,1529,1477,1459,1416,13691296,1258,1090,998,978,780,737。

[0315] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):1.53s,9H;3.86s,3H;3.862s,3H;6,593dd,J=8.4和1.6Hz,1H;7.004t,J=8.4和8.0,1H;7.135br s,1H;7.725d,J=8.0Hz。

[0316] 从N-叔丁氧基羰基-2,3-二甲氧基苯胺制备2,3-二甲氧基苯胺。将体积为580mL的甲醇、67.88g(268mM)的N-叔丁氧基羰基-2,3-二甲氧基苯胺和66.45mL的12.1M HCl装入至装备有磁力搅拌棒的1L烧瓶中并放置在50℃的水浴中。将加热和搅拌保持2小时,然后在环境温度下保持搅拌过夜。然后,在冰浴中冷却溶液后,伴随搅拌加入体积为130.5mL的6.16M的氢氧化钠。

[0317] 在低于40℃的温度下和在30T的真空压力下使用旋转蒸发仪从混合物中蒸发甲醇。使用180mL的甲苯稀释半固体残留物并过滤。使用180mL份的甲苯将沉淀再洗涤两次并将滤液转移至1L分液漏斗中。收集上层并使用硫酸钠干燥,浓缩并真空蒸馏。在8T下,在105℃-107℃下收集无色结晶油状形式的质量为34.6g的2,3-二甲氧基苯胺(产率为94.0%)。

[0318] TLC,SiO_2,c-Hex:四氢呋喃(简写为THF)(6∶1);R_f=0.35检测UV,5%$KMnO_4$加热/褐色-绿色。

[0319] FT-IR膜(cm^{-1}):3463,3368,2939,1609,1497,1475,1319,1262,1226,1129,1085,1050,999,773,729,694。

[0320] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):3.75br s,2H;3.83s,3H;3.84s3H;6.34d,J=8.1Hz,1H;6.38d,J=8.1Hz,1H;6.84t,J=8.1Hz,1H。

[0321] 从2,3-二甲氧基苯胺和酮基丙二酸二乙酯合成3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙基酯。将69.33g(398.1mM)酮基丙二酸二乙酯的250mL甲苯溶液放置在1L圆底烧瓶中,该烧瓶装备有空气平衡的滴液漏斗和放置在冰水浴中的磁力搅拌棒。将56.769g(370.6mM)2,3-二甲氧基苯 胺的200mL甲苯的溶液装入滴液漏斗中。开始搅拌并将2,3-二甲氧基苯胺溶液缓慢加入至烧瓶,伴随反应混合物的连续冷却和磁力搅拌。在4小时内完成添加并使混合物升温至室温并保持搅拌过夜,总计22小时。然后,将混合物加热至80℃,时间为2小时,并随后将混合物的温度升至100℃。收集体积为25mL的蒸馏物。收集包含4mL的水和21mL的甲苯的体积为25mL的蒸馏物。TLC SiO_2(PhMe∶THF/6∶1,UV,热的$KMnO_4$表示下列物质的存在:酮基丙二酸二乙酯R_f 0.86;酮基丙二酸单乙基酯的2,3-二甲氧基苯胺R_f

0.66;2,3-二甲氧基苯胺R_f 0.43;酮基丙二酸二乙酯单水合物R_f 0.30和目标产物3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙基酯R_f 0.20)。持续加热至100℃保持24小时,此后烧瓶中形成白色沉淀。然后,将烧瓶容纳物搅拌并在80℃-90℃下加热另外48小时。在该时间后,将其冷却至室温并过滤除去沉淀并使用50mL的甲苯洗涤。在干燥后,获得16.1g的3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙基酯(产率为24.0%)。在旋转蒸发仪中浓缩滤液并使用THF含量从7.5%至20%的c-Hex:THF混合物,在SiO_2上进行LC。收集另外12.2g(产率为18.2%)相当纯的产物。

[0322] Mp 150-151℃。

[0323] TLC,SiO_2,甲苯(简写为PhMe):THF(6:1),R_f=0.12检测UV,5%$KMnO_4$加热/淡黄色。

[0324] FT-IR膜(cm^{-1}):3293,2937,1728,1726,1636,1505,1466,1336,1236,1234,1164,1084,1016,1192,729。

[0325] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):1.191t,J=7.2Hz,3H;3.892s,3H;3.898s,3H;4.152-4.319m,16条线,dqx2,所有J=7.2Hz在下列位置具有四重中心:4.179,4.205,4.265,4.292,2H;4.346br s,1H;6.575d,J=8.4Hz,1H,6.961dd,J=8.4和0.4Hz,1H;7.744br s,1H。

[0326] 从3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙基酯中合成6,7-二甲氧基靛红。在环境温度的水浴中搅拌10.67g(40.2mM)3-羟基-6,7-二甲氧基-2-吲哚酮-3-羧酸乙基酯的100mL乙醇的溶液。向该混合物滴加4.828g(120.7mM)氢氧化钠的25mL水的溶液。将不含CO_2的空气流传送通过 剧烈搅拌的反应混合物。将使空气通过混合物且在环境温度下搅拌混合物的过程保持过夜。回收的混合物为强红褐色。通过加入5mL的浓盐酸中和溶液。将形成的白色无机盐沉淀过滤除去并在旋转蒸发仪中将滤液浓缩至20mL体积并保持在冰箱中结晶。收集橙黄色结晶并空气干燥。获得量为2.24g(产率为26.9%)的纯的6,7-二甲氧基靛红。通过使用SiO_2和PhMe:THF(4:1)混合物的液体层析从滤液中分离另外0.54g(产率为6.5%)的产物。

[0327] Mp 209-210℃。

[0328] TLC,SiO_2,PhMe:THF(6:1),R_f=0.18黄色点,检测UV,5%$KMnO_4$加热/淡黄色。

[0329] FT-IR膜(cm^{-1}):3218,1747,1707,1623,1507,1452,1442,1337,1286, 1240,1184,1082,1041,973,949,794,685,702,662。

[0330] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):3.91s 3H;3.98s 3H;6.60d,J=8.4Hz,1H;7.42d,J=8.4Hz,1H;7.74br s,1H。

[0331] 从6,7-二甲氧基靛红中合成6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。伴随磁力搅拌并在冰水浴中冷却,通过橡胶隔片从注射器中将2.255g(20.1mM)叔丁醇钾的20mL无水THF的溶液加入至包含2.78g(13.4mM)6,7-二甲氧基靛红的15mL无水THF的溶液的50mL圆底烧瓶中。通过注射器向该混合物中加入3.8mL(8.65g,60mM)的碘甲烷并在35℃下将含有立即形成的大量沉淀的混合物搅拌过夜。TLC(SiO_2,PhMe:THF(6:1))证实底物(6,7-二甲氧基靛红)R_f=0.18完全转化为6,7-二甲氧基-1-甲基靛红R_f=0.34。过滤除去沉淀并使用20mL份的无水THF洗涤三次。将混合的滤液浓缩至干燥并从快速层析中收集亮红颜色部分的产物。使用SiO_2和PhMe:THF(9:1)的混合物。在红色洗脱液蒸发至干燥后,收集2.517g(产率为84.8%)的亮黄色结晶。

[0332] Mp 190-191℃。

[0333] TLC,SiO_2,PhMe:THF(6:1),R_f=0.34橙红色点,检测UV,5%$KMnO_4$加热/浅黄色。

[0334] FT-IR膜(cm^{-1}):2955,1724,1614,1497,1450,1373,1264,1205,1168,1131,1086,1044,1028,979,975,828,800,775,654。

[0335] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):3.490s,3H;3.877s,3H;3.982s,3H;6.575d,J=8.4Hz,1H;7.416d,J=8.4Hz,1H。

[0336] 5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红的合成。将2.517g(11.38mM)的6,7-二甲氧基-1-甲基靛红和1.823g(13.65mM)的N-氯琥珀酰亚胺和30mL的DMF放置在装备有磁力搅拌棒和空气平衡的10mL滴液漏斗的100mL圆底烧瓶中并放置在冰水浴中。将1.125mL(13.6mM)浓盐酸的DMF的10mL溶液装入至滴液漏斗并滴加进入搅拌和冷却的反应混合物中。在完成添加后,在环境温度下将溶液混合另外2小时。然后,在8T真空和50℃下旋转蒸发溶剂并使用PhMe:THF(19:1)混合物在SiO_2上使残留物进行快速层析。收集包含砖红色带产物的洗脱液并旋转浓缩至干燥产生1.83g(产率为62.9%)的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红的砖红色结晶。

[0337] Mp 140-142℃。

[0338] TLC,SiO_2,PhMe:THF(6:1),R_f=0.51红色点,检测UV,5%$KMnO_4$加热/浅黄色。

[0339] UV/VIS(nm)c.-0.143mg/mL的乙醇:318,e 2.75,433,e 0.70。

[0340] FT-IR膜(cm^{-1}):2951,1726,1602,1457,1442,1423,1404,1359,1292,1263,1232,1093,1046,1005,979,941,897,881,797,766,668。

[0341] ^1H NMR,(400MHz),$CDCl_3$,δ(ppm):3.475s,3H;3.935s,3H;4.027s,3H;7434s,1H。

[0342] 在图12中能发现甚孢菌素和5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的分子结构。在图13中概述合成途径。

[0343] 实施例14

[0344] 甚孢菌素MIP和NIP合成(使用甲基丙烯酸)

[0345] 将1.8g(7.04mm)的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红、1.194mL(1.212g,14.08mM)的甲基丙烯酸、3.415mL(3.664g,28.16mM)的甲基丙烯酸2-羟基乙基酯、39.83mL(41.86g,211.2mM)的二甲基丙烯酸乙二醇酯和1.0g(6.09mM)的AIBN的100mL甲苯的溶液放置在装备有气体平衡的120mL滴液漏斗、机械搅拌器、具有流量计和温度计的回流冷凝器的500 mL四颈圆底烧瓶中。将体积为120mL的甲苯放置在滴液漏斗中,开启搅拌器并使氮气传送通过甲苯(在滴液漏斗中)和烧瓶中混合物的整个表面并通过流量计释放到外部。在搅拌和吹入氮气30分钟后,将气体流的速率限制为单一气泡并通过将烧瓶浸入在70℃的水浴中使烧瓶的温度增加至65℃。在聚合开始的15分钟内,溶液变得越来越粘稠。当难于维持剧烈搅拌时,尽可能快地从滴液漏斗中添加甲苯以稀释混合物。将剧烈搅拌和加热保持4小时。在该时间过程中,形成MIP的小球。在不搅拌或加热的情况下保持混合物过夜。在早晨,过滤除去MIP球并每次使用150mL的乙醇洗涤13次。收集橙红色滤液,旋转浓缩。通过使用PhMe:THF(98:2)的快速层析回收5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红(甚孢菌素模板)并收集砖红色带的模板。旋转蒸发产生1.572g(回收率为87.3%)的非常纯的结晶5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。在环境温度下,将MIP球空气干燥过夜并在80℃下在实验室烘箱中干燥另外1小时。

[0346] 以小的蛋壳白色球形式获得数量为45.362g的甚孢菌素MIP(甲基丙烯酸)并标识

为MIP#519-98。

[0347] 通过下列相同的步骤获得雪白色球形式的甚孢菌素NIP(甲基丙烯酸)45.883g,然而没有甚孢菌素模板加入至反应混合物中并且仅进行三次乙醇洗涤(每次150mL)。将聚合物标识为MIP#555-99。

[0348] MIP和NIP都容易过滤和在烧结的玻璃过滤器上洗涤。

[0349] 实施例15

[0350] 甚孢菌素MIP和NIP合成(使用2-乙烯基吡啶)

[0351] 将1.5g(5.86mM)的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红、1.260mL(1.232g,11.72mM)的2-乙烯基吡啶、2.845mL(3.053g,23.46mM)的甲基丙烯酸2-羟基乙基酯、33.191mL(34.833g,176mM)的二甲基丙烯酸乙二醇酯和0.833g(5.07mM)的AIBN的80mL甲苯的溶液放置在装备有气体平衡的100mL滴液漏斗、机械搅拌器、具有流量计和温度计的回流冷凝器的500mL四颈圆底烧瓶中。将体积为120mL的甲苯放置在滴液漏斗中,开启搅拌器并使氮气传送通过甲苯(在滴液漏斗中)和烧瓶中混合物的整个表面并通过流量计释放到外部。在搅拌和吹入氮气30分钟后,将气体 流的速率限制为单一气泡并通过将烧瓶浸入在70℃的水浴中使烧瓶的温度增加至65℃。在聚合开始的15分钟内,溶液变得越来越粘稠。当难于维持剧烈搅拌时,尽可能快地从滴液漏斗中添加甲苯以稀释混合物。将剧烈搅拌和加热保持4小时。在该时间过程中,形成MIP的小球。在不搅拌或加热的情况下保持混合物过夜。然后,过滤除去MIP球并每次使用150mL的乙醇洗涤13次。收集自洗涤的MIP的所有滤液并旋转浓缩至干燥。将红色的残留物溶解于20mL的甲苯并应用至填充有200mLSiO_2的甲苯的液体层析柱(24mm×50cm)的顶部。使用PhMe:THF(5:1)洗涤红色带。旋转蒸发产生1.489g(回收率为99.2%)的结晶5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红。在环境温度下将MIP球空气干燥过夜并在80℃下在实验室烘箱中另外干燥两小时。获得小蛋壳白色球形式的37.936g的甚孢菌素MIP(2-乙烯基吡啶)并标识为MIP#519-101。

[0352] 甚孢菌素NIP(2-乙烯基吡啶)。按照下列步骤获得雪白色球形式的39.2g的量,然而没有甚孢菌素模板加入至反应混合物中并且仅进行三次乙醇洗涤(每次150mL)。将聚合物标识为MIP#555-102。

[0353] 实施例16

[0354] 甚孢菌素MIP的UV引发、低温聚合/合成

[0355] 光化学反应设备。将在450瓦UV灯(ACE Glass,目录#7825-34)和450瓦套管电源(ACE Glass,目录#7830-58)中装备的石英光化学UV浸没池(Ace Glass,目录#7856-10)与循环冷却装置WKL 230LAUDA(由Brinkmann Instuments,Inc.提供)连接,并在UV灯开启时使4℃的冷却水运行通过池套。

[0356] 聚合过程。单体:甲基丙烯酸1.2g(13.95mM)和单甲基丙烯酸乙二醇酯3.631g(13.95mM)、甚孢菌素模板1.783g(6.97mM)、引发剂(IABN)0.991g(6.03mM)和交联剂(二甲基丙烯酸乙二醇酯41.444g(209.1mM))的混合物放置在半透明、聚乙烯瓶(Nalgene®型2105)中并使氩气流通过混合物15分钟以去除所有氧气,已知其抑制游离自由基聚合。然后,封闭瓶并在UV灯中心水平处与浸没池连接,并与光化学反应设备一起浸入冰水浴中。当开启灯时使冷却水运行通过灯套,并使反应混合物照射保 持3.5小时(当UV灯开启时需要UV安全玻璃)。在UV聚合过程中,供给另外的冰并从浴中排掉过量的水以保持冷却浴温度在

4℃。在完成聚合后打开瓶，将聚合物压碎并磨碎成小块，将其洗涤：使用乙醇洗涤三次，使用1:1的水-乙醇混合物洗涤两次，使用3:1的水-乙醇混合物洗涤六次并使用乙醇再洗涤一次以从聚合物中去除模板并确保最终在实验室烘箱中干燥的MIP的最大活性以去除乙醇残留物产生41.1g(产率为89％)的产物。

[0357] 实施例17

[0358] MIP对真菌毒素的螯合能力-应用于甚孢菌素类似物

[0359] 测试通过在甲苯中使用甲基丙烯酸或2-乙烯基吡啶单体的热引发沉淀聚合而制备的MIP和NIP聚合物(参见例如，实施例14和实施例15)对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板(参见例如，实施例13)和胶霉毒素(包含相似的二硫化物-桥接的哌嗪双酮环体系的甚孢菌素分子类似物(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA))的通过化学相互作用从液体或半液体介质中去除模板和胶霉毒素真菌毒素的能力。制备的MIP和NIP在本文用于描述螯合亲合力的差别。通过称重400mg的MIP/NIP物质放入琥珀色Schott瓶并加入100mL的研究的分析物处理溶液以获得介质中螯合剂的0.4g/L的夹杂率来进行分离实验。与不含MIP物质的空白样品和包含5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行分离试验。保持在37℃的温度下，在150rpm下，在轨道旋转振动器(Brunswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。使用体系-十亿分之500、1,000、1,500、2,000、2,500(ppb)或1,000、2,000、3,000、4,000、5,000测试五个最终浓度的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素。在孵育后，将制剂在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中，防止真菌毒素或模板与小瓶的任何相互作用，并根据标准方法从与光电二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(例如，以检测真菌毒素和分离的真菌毒素的量)。使用乙腈/醋酸/三氟醋酸(34.9:65:0.1,v/v) 的混合物作为流动相进行胶霉毒素的HPLC分析。根据用于由乙腈/水/甲醇(45:45:10,v/v)混合物组成的甚孢菌素分析的标准洗脱参数来选择检测5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的HPLC方法。在具有全波长扫描(268.1nm产生胶霉毒素的最佳信号；258.8nm产生模板的最佳信号)的U.V.光电二极管阵列上进行检测。

[0360] 结果显示在pH 4.0下，对于吸附剂0.4％的夹杂水平，MIP#519-98和#519-101以及NIP#519-99和#519-10X能够在500ppb至2,500ppb之间与大于90.8％的测试的胶霉毒素相互作用(参见表8)。还研究了5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的吸附，给出了在吸附剂的0.4％的夹杂水平下，对于在pH 4.0的培养基中存在的模板浓度为1,000ppb至5,000ppb的模板分子，MIP#519-98和#519-101以及NIP#519-99和#519-10X大于94.9％的亲合力(表8)。因此，在一些实施方案中，本发明规定在甲苯合成的MIP均倾向于吸附甚孢菌素类似物(例如，胶霉毒素和5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板)，具有对于使用2-乙烯基吡啶单体合成的MIP#519-101的轻微优势，当在pH 4.0下以4g/L的夹杂率进行加入时，对于胶霉毒素和5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板所具有的螯合亲和力分别为高达97.82±4.25％和95.85±1.25％的亲合力率。MIP和NIP间的差别对于制备的任何制剂是最小的。

[0361] 表8.在pH 4.0和0.4％的吸附剂夹杂下所评价的2MIP和2NIP对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板以及胶霉毒素的百分比表达的平均吸附亲合力

[0362]

样品I.D.	平均吸附	
	胶霉毒素(%)	模板(%)
MIP 519-98	90.84 ± 1.47	94.94 ± 2.21
NIP 555-99	91.04 ± 1.51	95.35 ± 0.72
MIP 519-101	97.82 ± 4.25	95.85 ± 1.25
NIP 519-10X	97.14 ± 4.02	95.86± 1.02

[0363] 实施例18

[0364] 用于螯合甚孢菌素类似物的MIP量的滴定

[0365] 进行滴定实验以研究0.1g/L至1.00g/L(或0.01％至0.1％的夹杂率) 的MIP夹杂率。与不含MIP物质的空白样品和仅含待测试的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 4.0的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行螯合试验。保持在37℃的温度下,在150rpm下在轨道旋转振动器(Brunswick,Champaign,IL,USA)上将所有样品孵育90分钟。在100mL的最终体积中使用体系1,000、2,000、3,000、4,000、5,000ppb测试五个最终浓度的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素。在孵育后,将微型离心管在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止分析物与小瓶的任何相互作用,并根据标准方法从与二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(参见例如,实施例17)。

[0366] 表9.在pH 4.0和4水平吸附剂夹杂下所评价的2MIP和3NIP对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的百分比形式表达的平均吸附亲合力

[0367]

样品I.D.	%夹杂	吸附 (%)					
		模板浓度 (ppb)					
		1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	平均
MIP 519-98	0.010	48.90	57.93	48.17	37.86	38.63	46.30
	0.025	61.50	69.25	61.98	65.94	50.74	61.88
	0.050	80.37	87.95	73.97	76.41	69.28	77.59
	0.100	94.10	91.35	89.72	86.74	84.73	89.33
NIP 519-99	0.010	59.83	53.83	41.80	42.17	38.40	47.21
	0.025	76.70	67.50	61.71	58.60	57.51	64.40
	0.050	89.63	83.18	73.08	75.46	77.25	79.72
	0.100	91.50	90.97	87.99	88.86	87.23	89.31
MIP 519-101	0.010	48.60	37.95	39.12	38.29	34.72	39.74
	0.025	72.73	62.12	60.53	51.69	54.58	60.33
	0.050	76.93	73.40	73.94	70.98	70.17	73.09
	0.100	90.83	87.50	87.66	89.16	84.41	87.91
NIP 519-10X	0.010	41.33	42.88	36.18	25.54	26.58	34.70
	0.025	58.67	57.45	53.56	47.35	46.85	52.77
	0.050	75.20	68.38	68.26	65.43	63.66	68.19
	0.100	83.57	84.02	82.04	78.64	75.09	80.67
NIP 519-47X	0.010	16.57	7.48	10.59	17.05	10.39	12.42
	0.025	13.20	10.25	7.61	13.26	18.61	12.59
	0.050	4.17	12.40	11.92	12.12	13.76	10.87
	0.100	10.13	10.52	11.59	17.88	24.72	14.97

[0368] 如图14、表9和表10所示，在一些实施方案中，例如，在0.05g/L 的吸附剂夹杂水平下，本发明显示超过70％螯合值的最佳功效并在0.10g/L下达到接近90％的螯合。因此，在一些实施方案中，本发明规定使用甲基丙烯酸合成的MIP/NIP比使用2-乙烯基吡啶合成的MIP/NIP对于甚孢菌素类似物的吸附(例如，胶霉毒素和5-氯-6，7-二甲氧基-1-甲基靛红模板(例如，当在pH 4.0下以0.01g/L至0.1g/L的夹杂率而加入时))更有利。然而，对于制备的任何制剂，MIP和NIP之间的差异为最小的，除了在低温和UV引发聚合下合成的NIP随着吸附剂夹杂水平，其吸附值增加了10％至15％。

[0369] 表10.在pH 4的柠檬酸盐缓冲液介质中NIP和MIP在四种不同的夹杂率下对甚孢菌素模板的体外等温吸附特征

[0370]

夹杂(%)	NIP #519-99	MIP #519-98	NIP #519-10X	MIP #519-101	NIP #519-47X
0.010	47.207 ± 9.159	46.302 ± 8.297	34.703 ± 7.837	39.737 ± 5.229	12.416 ± 4.197
0.025	64.404 ± 7.894	61.882 ± 6.983	52.774 ± 5.517	60.331 ± 8.136	12.585 ± 4.101
0.050	79.720 ± 6.683	77.594 ± 7.047	68.186 ± 4.396	73.087 ± 2.671	10.873 ± 3.817
0.100	89.309 ± 1.858	89.329 ± 3.702	80.671 ± 3.767	87.912 ± 2.375	14.967 ± 6.288

[0371] 实施例19

[0372] 不同MIP和NIP的亲合力以及对甚孢菌素类似物的特异性特征

[0373] 在进行本发明实施方案的过程中进行实验以评价在作为用于热引发沉淀聚合的溶剂的甲苯中合成的不同NIP/MIP的亲合力。本文使用制备的MIP以描述甚孢菌素类似物(例如，胶霉毒素和5-氯-6，7-二甲氧基-1-甲基靛红模板)的螯合亲合力的差异并评价物质的特异性。将量为30mg的MIP放置在装备有硅烷化的聚乙烯固相萃取熔块的SEP-PAK柱中。硅烷化的玻璃小瓶用于确保分析物在水性溶剂中的稳定性并防止分析物和玻璃小瓶之间的任何非特异性相互作用。基于本领域通常使用的方法，将硅烷化方法应用于尼龙和PTFE/PE过滤器和管。与不含MIP物质的空白样品和仅含待测试的5-氯-6，7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素的阳性对照一起进行制备。通过将1mL的5-氯-6，7-二甲氧基-1-甲基靛红模 板或胶霉毒素溶液过滤经过30mg物质来制成固相萃取类(SPE类)过滤设备，以用于当量为0.1g/L的MIP夹杂。小瓶和过滤器通过使用硅烷化试剂(SURFASIL，参见例如，实施例9)填充它们或浸渍它们而制备。使SPE类过滤设备负载有以2,000ppb单一浓度而使用的5-氯-6，7-二甲氧基-1-甲基靛红模板或胶霉毒素的1mL溶液。与样品一起，保持控制处理溶液。伴随间歇震动，在37℃下将样品和对照均孵育2分钟。在孵育期后，将样品推出注射器并在15mL离心管中收集并在10,0000g下离心10分钟。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶并进行分析。为评价靶分子解吸的特异性，在包含MIP聚合物的物质上进行六步洗涤步骤。在15mL的离心管中收集各个洗涤并在HPLC分析之前在10,0000g下离心10分钟。使用增加浓度的有机溶剂进行六次洗涤，其包括使用50mM柠檬酸盐缓冲液洗涤的第一次洗涤和分别使用20％、40％、60％、80％、100％甲醇的水(v/v)的五次连续洗涤。实验使用前面热引发沉淀聚合的MIP#519-98和#519-101以及NIP#519-99和#519-10X(粉末形式)连同在低

温和UV聚合下生成的标识为#519-47和#519-47X的MIP和NIP的结晶形式(参见例如,实施例5)。将上层清液收集进入琥珀色且硅烷化的HPLC小瓶中,防止真菌毒素或模板与小瓶的任何相互作用,并根据标准方法,从与光电二极管阵列检测器信号连接的HPLC(Alliance,Waters Corp.,Milford,MA,USA)进行计算(例如,以检测真菌毒素和分离的真菌毒素的量)。使用乙腈/醋酸/三氟醋酸(34.9:65:0.1,v/v)的混合物作为流动相进行胶霉毒素的HPLC分析。根据由乙腈/水/甲醇(45:45:10,v/v)的混合物组成的甚孢菌素分析的标准洗脱参数来选择用于检测5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的HPLC方法。使用全波长扫描在U.V.光电二极管阵列上进行检测(268.1nm产生胶霉毒素的最佳信号;258.8nm产生模板的最佳信号)。

[0374] 结果表明(参见图15和表11)与各自用于吸附胶霉毒素的NIP#519-10X和#519-99相比,当使用40%的甲醇洗涤时,MIP#519-101和#519-98具有较低的解吸值。然而,包含大于60%的甲醇的洗涤能够去除几乎全部量的螯合的胶霉毒素。在一些实施方案中,当将使用20%的甲醇的洗涤应用于体系时,使用2-乙烯基吡啶单体合成的MIP#519-101具 有比相应的NIP#519-10X和NIP#519-99、MIP#519-98、NIP#519-47X和MIP 519-47更高的特异性。聚合物519-47X和519-47不能够吸附大于25%的胶霉毒素。缓冲液洗涤的应用能够去除任何吸附的胶霉毒素。

[0375] 结果表明(参见图16和表11)与各自的NIP#519-10X相比,当使用20%和40%的甲醇洗涤时MIP#519-101具有较低的解吸值。然而,MIP#519-98和NIP#519-99的特异性与用于吸附5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的特异性相比没有差别。然而,包含大于60%的甲醇的洗涤能够去除几乎全部量的螯合的5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板。在一些实施方案中并如使用胶霉毒素所发现的,当将使用20%和40%的甲醇洗涤应用于体系时,使用2-乙烯基吡啶单体合成的MIP#519-101比相应的NIP#519-10X和NIP#519-99、MIP#519-98、NIP#519-47X和MIP 519-47具有更高的特异性。聚合物519-47X和519-47表现出有利于MIP化合物的螯合特异性差异。然而,尽管5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的吸附低于50%,但其比使用胶霉毒素的观察值表现出更好的亲和力,其显示出对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板的MIP的更好特异性。

[0376] 表11.在0.1%水平的吸附剂夹杂下在SPE配置中在pH 4.0下3个MIP、3个NIP对5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板和胶霉毒素的吸附性质以及对使用柠檬酸盐缓冲液(溶液A)和甲醇(溶液B)的混合物滴定的甲醇洗涤的生存

[0377]

吸附剂	平均百分比吸附						
条件	初始	A: 100% B: 0%	A: 80% B: 20%	A: 60% B: 40%	A: 40% B: 60%	A: 20% B: 80%	A: 0% B: 100%
	胶霉毒素(%吸附)						
NIP519-10X	99.3±0.6	99.3±0.0	67.7±1.9	47.7±1.4	-0.3±2.0	0.8±1.6	-0.8±1.2
MIP519-101	99.9±0.3	99.9±0.0	99.9±0.0	55.5±0.1	8.3±2.0	-4.6±3.1	-5.1±8.7
NIP519-99	99.0±0.4	98.2±0.4	80.5±1.0	50.7±2.8	4.0±2.5	-8.4±6.1	-7.6±9.6
MIP519-98	99.1±0.4	99.0±0.3	78.5±0.4	44.9±2.2	15.4±1.2	-9.6±14.8	-6.1±7.7
NIP555-47X	22.7±1.2	-1.7±1.5	-10.6±0.4	-13.6±6.5	-28.4±2.7	-24.1±11.4	-33.4±5.7
MIP519-47	25.1±2.6	-2.4±10.5	-18.5±13.2	-20.7±3.05	-28.2±2.4	-28.2±11.1	-36.5±8.2
	5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红模板(%吸附)						
NIP519-10X	98.5±0.8	98.0±1.0	86.5±0.2	59.5±1.1	-1.8±1.0	-39.4±0.7	-19.5±1.8
MIP519-101	99.9±0.1	99.4±0.6	94.8±0.1	72.4±0.1	-0.2±1.3	-2.2±1.5	-15.3±1.5
NIP555-99	99.0±0.6	97.5±0.1	90.5±0.2	65.2±0.8	13.1±1.4	-1.85±1.0	-9.8±1.4
MIP519-98	98.8±0.2	97.2±0.3	89.2±0.7	55.1±0.6	9.35±1.3	-7.9±0.4	-8.0±3.3

[0378]

NIP555-47X	44.8±5.6	33.0±0.8	9.7±3.9	6.2±0.9	-29.7±0.1	-17.5±1.4	-19.3±3.2
MIP519-47	48.7±7.0	44.7±0.6	28.2±0.6	-17.1±0.8	-20.1±2.1	-21.3±13.6	-24.1±3.4

[0379] 实施例20

[0380] MIP对真菌毒素的螯合能力-应用于棘孢菌素

[0381] 对于棘孢菌素(AgResearch Limited,Ruakura Research Centre,Hamilton,New Zealand),测试使用2-乙烯基吡啶单体的甲苯(参见例如,实施例15)制备的MIP聚合物通过化学相互作用从液体或半液体介质中去除棘孢菌素(A93%;B、D、E 2至17%)真菌毒素的能力。制备的MIP用于表征螯合亲合力以评价物质的特异性。通过称重50mg和400mg的MIP物质进入Schott瓶并在介质中加入100mL的给定0.5g/L和4.0g/L吸附剂夹杂率的棘孢菌素混合物处理溶液来进行螯合实验。与不含MIP物质的空白样品和仅含棘孢菌素的阳性对照一起进行制备。在调整至pH 6.0的50mM琥珀酸盐缓冲液中进行螯合试验以满足瘤胃隔室的生理学条件。保持在37℃的温度下,在150rpm下在轨道旋转振动器上将所有样品孵育90分钟。使用体系500ppb、1,000ppb、2,000ppb测试三种最终浓度的棘孢菌素。在孵育后,将制剂在10,000rpm下离心10分钟。将上层清液收集进入HPLC小瓶中,并根据标准方法从与UV检测器信号连接的HPLC进行计算(例如,以检测真菌毒素很和分离的真菌毒素的量)。用于检测棘孢菌素的HPLC方法使用乙腈/水/甲醇(45:45:10,v/v)的混合物以进行分析物和C18柱(4.6mm×25cm)的洗脱。在U.V.检测器上进行检测(280nm产生棘孢菌素的最佳信号)。

[0382] 在500ppb、1,000ppb和2,000ppb下,MIP#519-98产物对0.5g/L夹杂率的吸附为80.5%至85.7%,并且当在4g/L夹杂率的棘孢菌素下进行使用时,吸附大于98.5%(参见例如,表12)。重复几次之间的吸附变化小于1%。在0.5g/L的夹杂率下能观察到轻微的饱和效应,整个研究的棘孢菌素范围中获得吸附值的下降。

[0383] 表12.在0.5g/L和4.0g/L的夹杂率下MIP#519-98对3种浓度的棘孢菌素的吸附功效

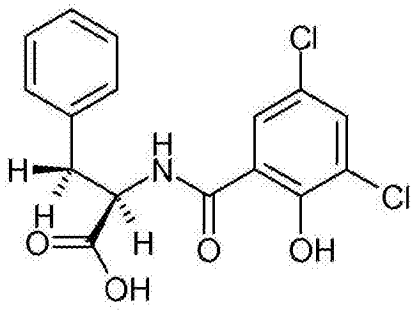
[0384]

夹杂率(%)	对于甚孢菌素浓度的平均吸附百分比(%):		
	500 ppb	1,000 ppb	2,000 ppb

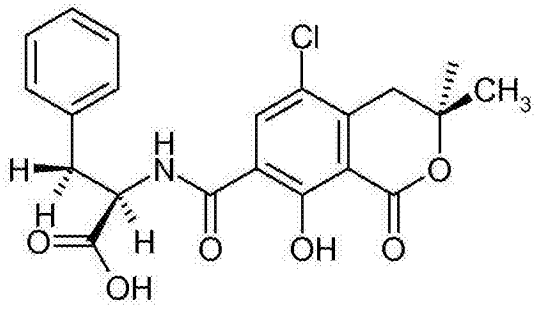
[0385]

0.05	85.65 ± 0.87	84.03 ± 0.70	80.51 ± 1.37
0.40	99.13 ± 0.00	98.85 ± 0.00	98.54 ± 0.09

[0386] 上述说明书中提及的所有公开和专利均通过引用并入本文。本发明所描述组合物和方法的各种修改和变型对于本领域技术人员而言显而易见，而不违背本发明范围和实质。尽管结合特别优选的实施方案描述本发明，但应当理解所要求保护的本发明不应过度局限于这类特定实施方案。实际上，意图将对相关领域的技术人员显而易见的用于进行本发明所描述方式的各种修改包含在本发明的范围内。

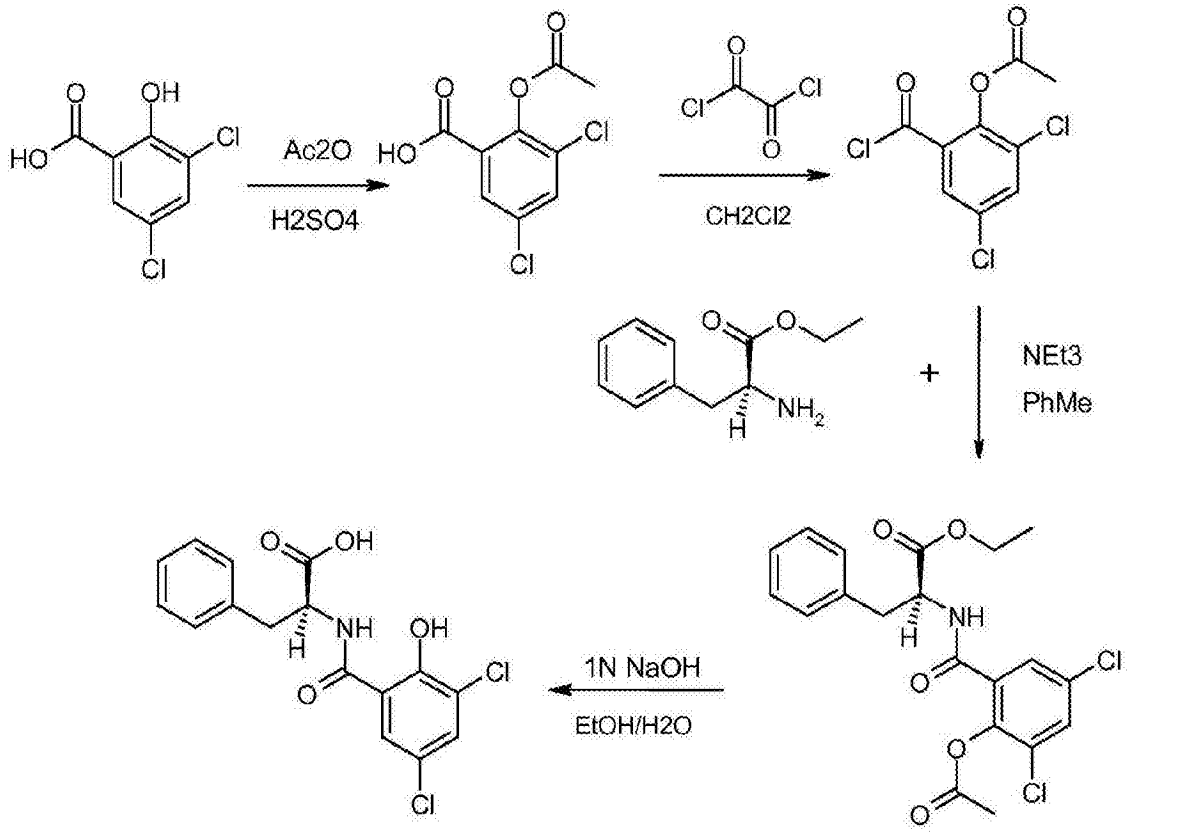


模板



赭曲毒素A

图 1



赭曲毒素A模板(I)

苯基丙氨酸苯甲酰胺二酯(II)

图 2

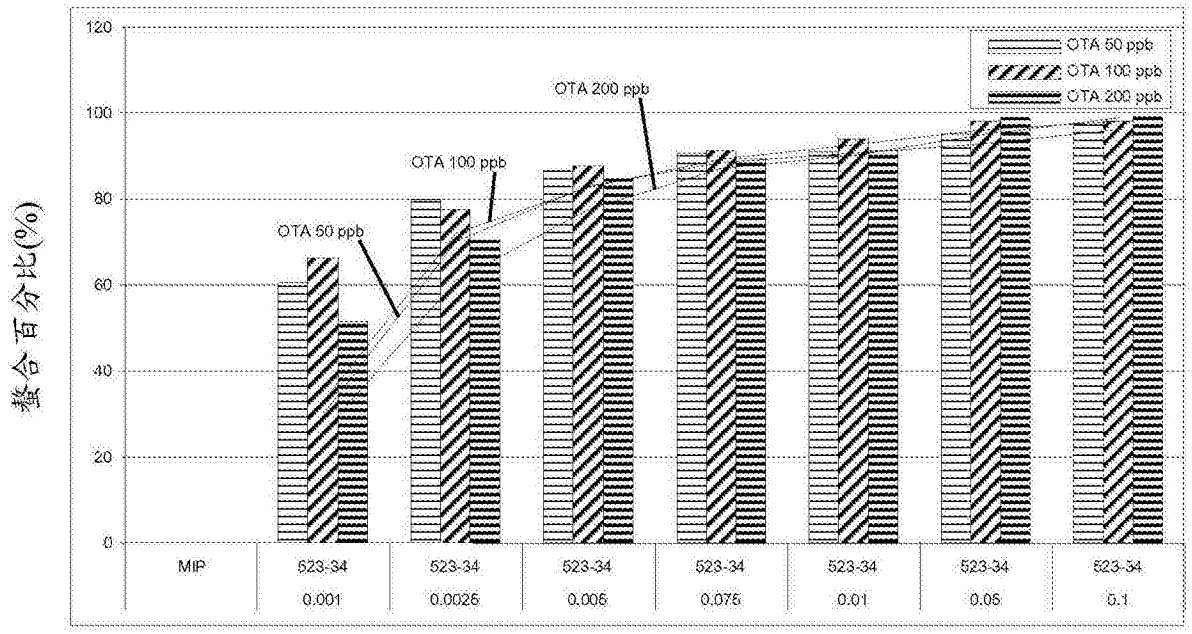

120
100
80
60
40
20
0
整合百分比(%)
OTA 50 ppb
OTA 100 ppb
OTA 200 ppb
OTA 50 ppb
OTA 100 ppb
OTA 200 ppb
MIP
523-34 0.001
523-34 0.0025
523-34 0.005
523-34 0.075
523-34 0.01
523-34 0.05
523-34 0.1

图 3

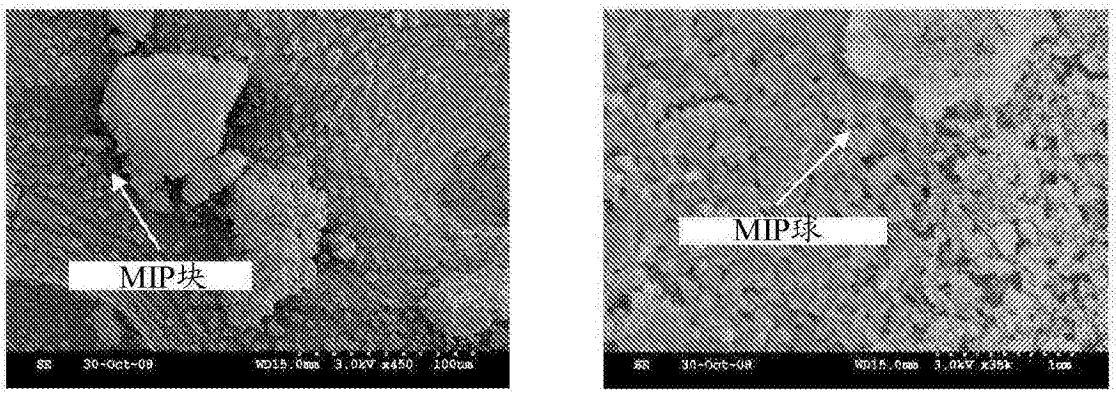

MIP块
MIP球

图 4

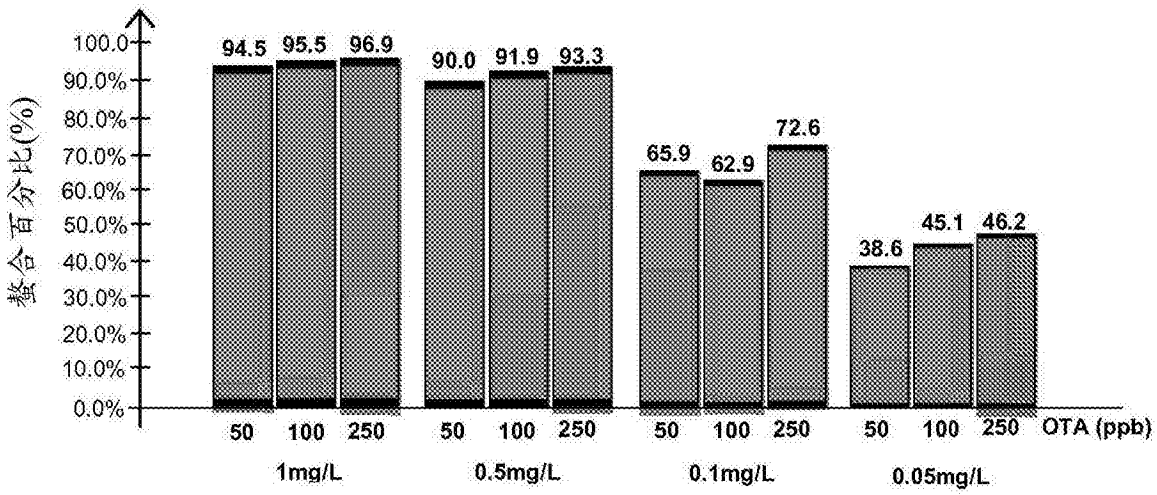

螯合百分比(%)
100.0
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
94.5
95.5
96.9
90.0
91.9
93.3
65.9
62.9
72.6
38.6
45.1
46.2
50
100
250
OTA (ppb)
1mg/L
0.5mg/L
0.1mg/L
0.05mg/L

图 5

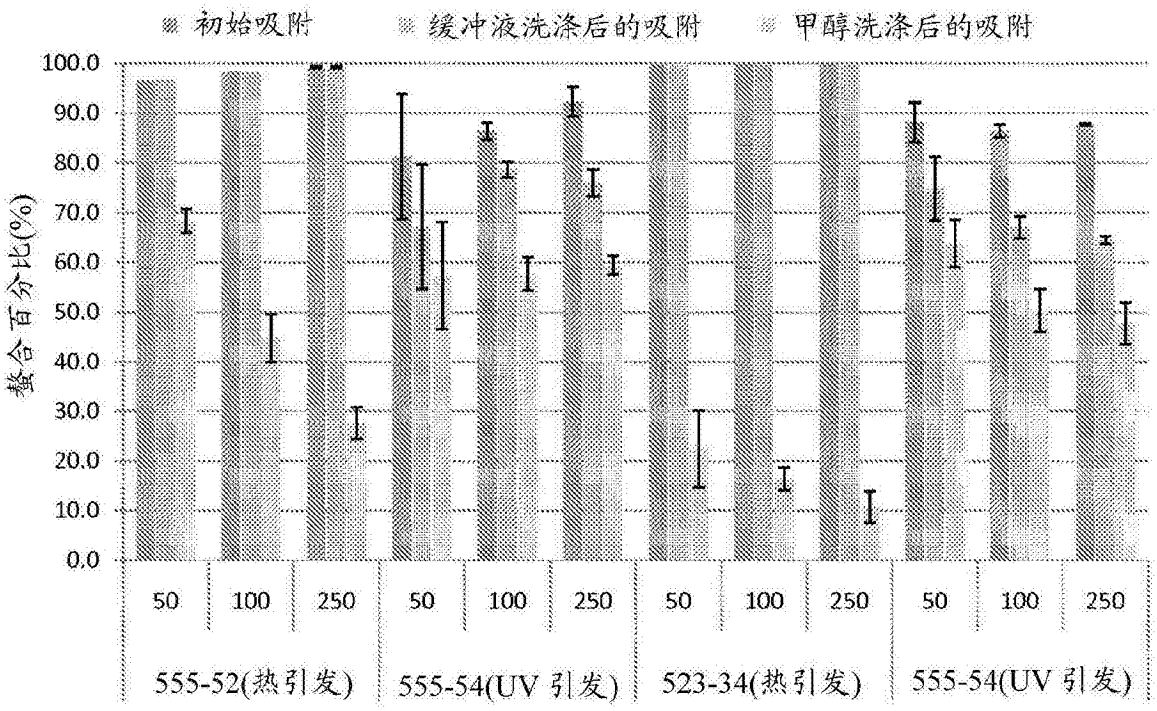

初始吸附
缓冲液洗涤后的吸附
甲醇洗涤后的吸附
螯合百分比(%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
50
100
250
555-52(热引发)
555-54(UV 引发)
523-34(热引发)
555-54(UV 引发)

图 6

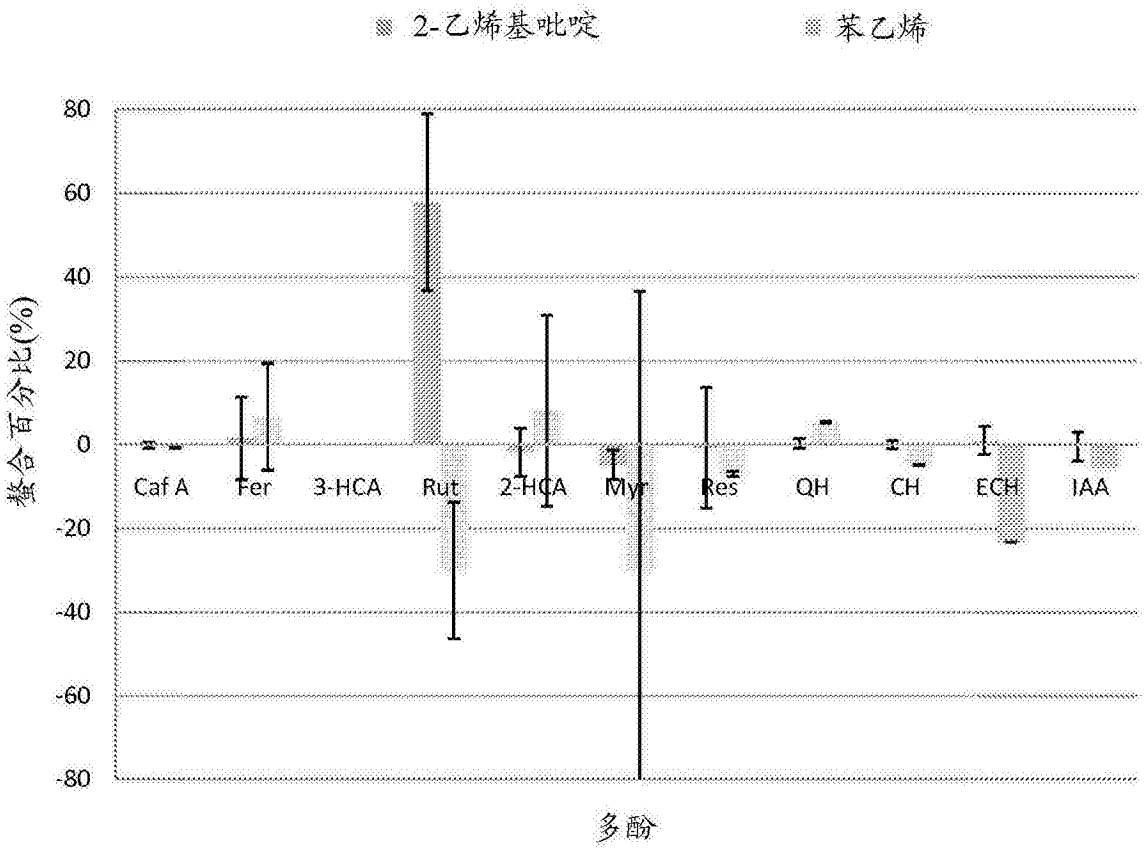

2-乙烯基吡啶
苯乙烯
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
整合百分比(%)
Caf A
Fer
3-HCA
Rut
2-HCA
Myr
Res
QH
CH
ECH
IAA
多酚

图 7

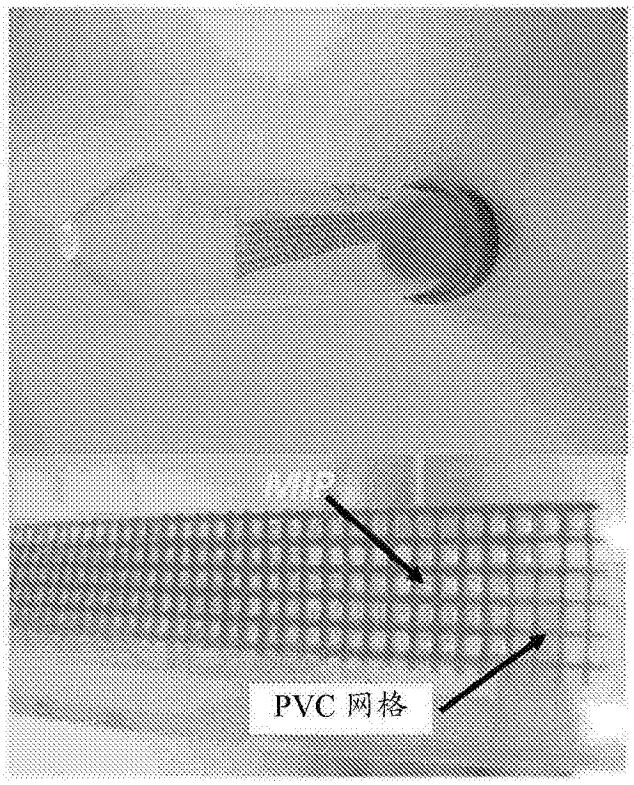

PVC 网格

图 8

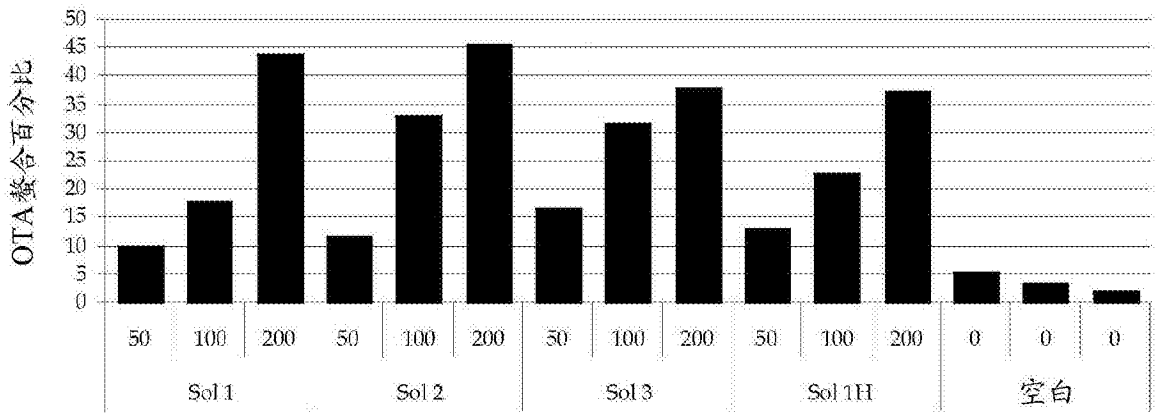

OTA螯合百分比
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50
100
200
50
100
200
50
100
200
50
100
200
0
0
0
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 1H
空白

图 9

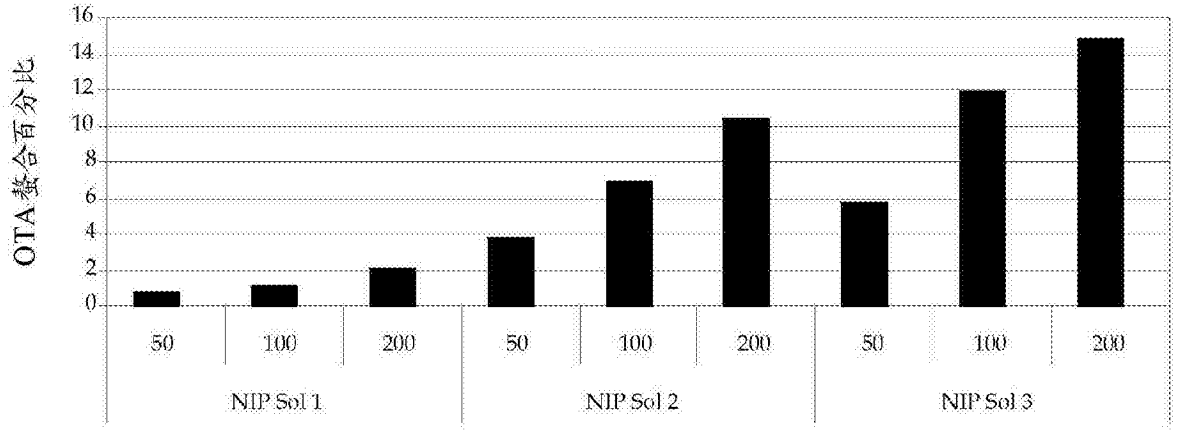
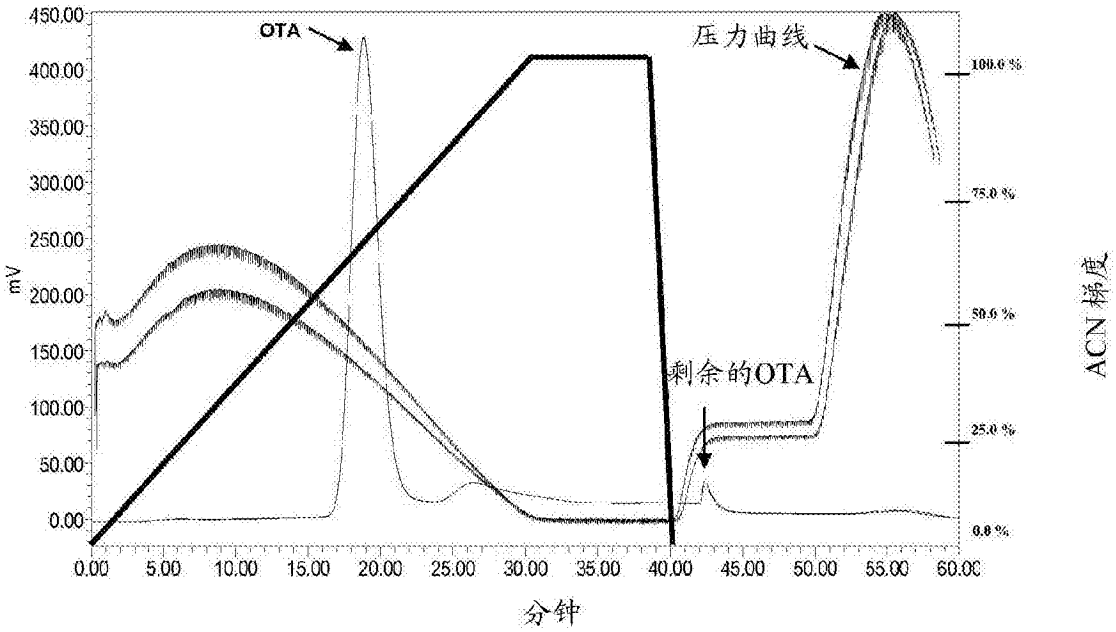
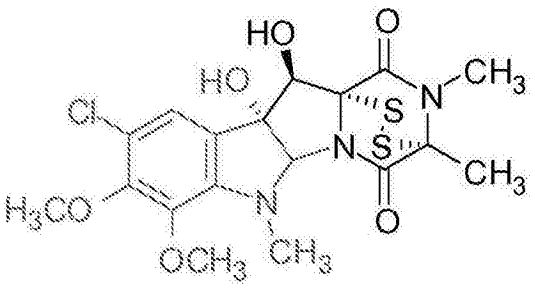


图 10

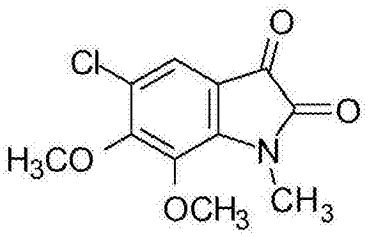


	时间	流速	% 1% 四乙基铵的甲醇	% 乙腈	% H2O
1	0.01	1.00	0.0	0.0	100.0
2	30.00	1.00	0.0	100.0	0.0
3	40.00	1.00	0.0	100.0	0.0
4	41.00	1.00	100.0	0.0	0.0
5	50.00	1.00	100.0	0.0	0.0
6	60.00	1.00	0.0	0.0	100.0
7	61.00	1.00	0.0	0.0	100.0
8	62.00	0.10	0.0	0.0	100.0

图 11



真菌毒素-甚孢菌素A



5-氯-6,7-二甲氧基-1-甲基靛红
甚孢菌素A模板

图 12

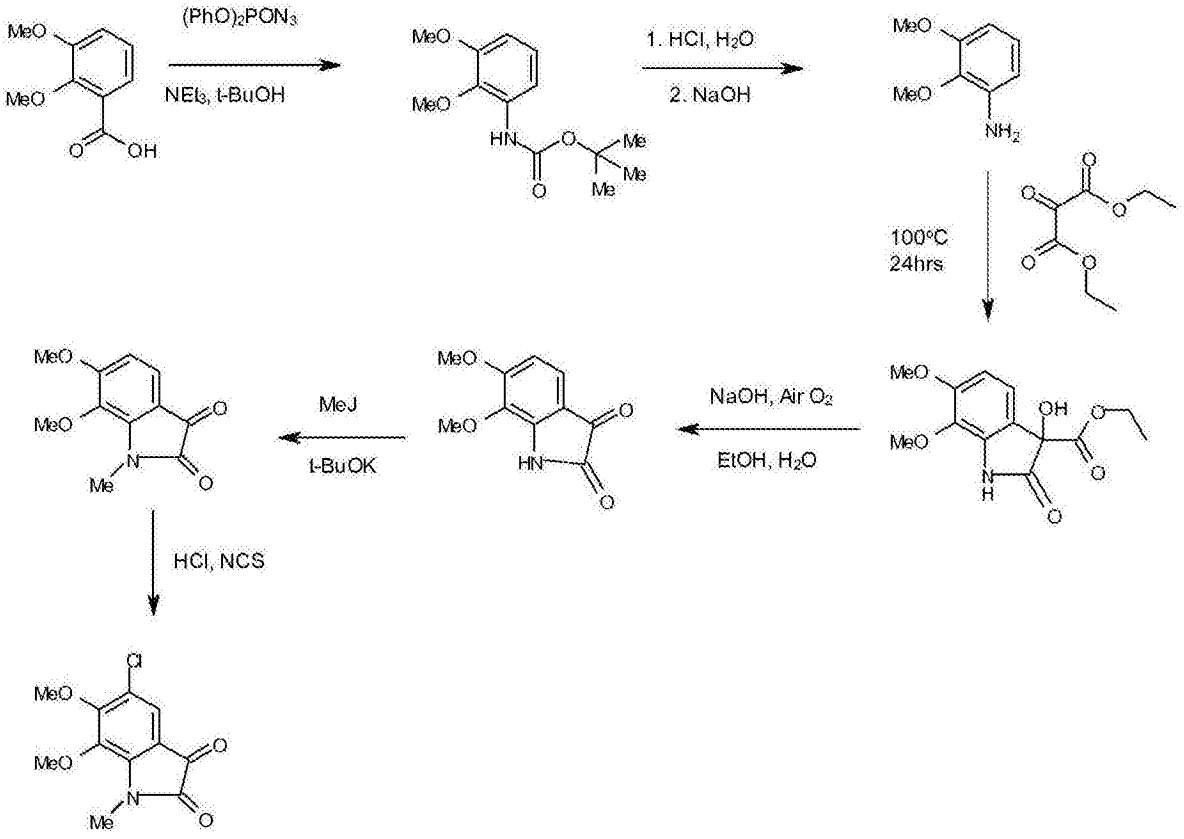


图 13

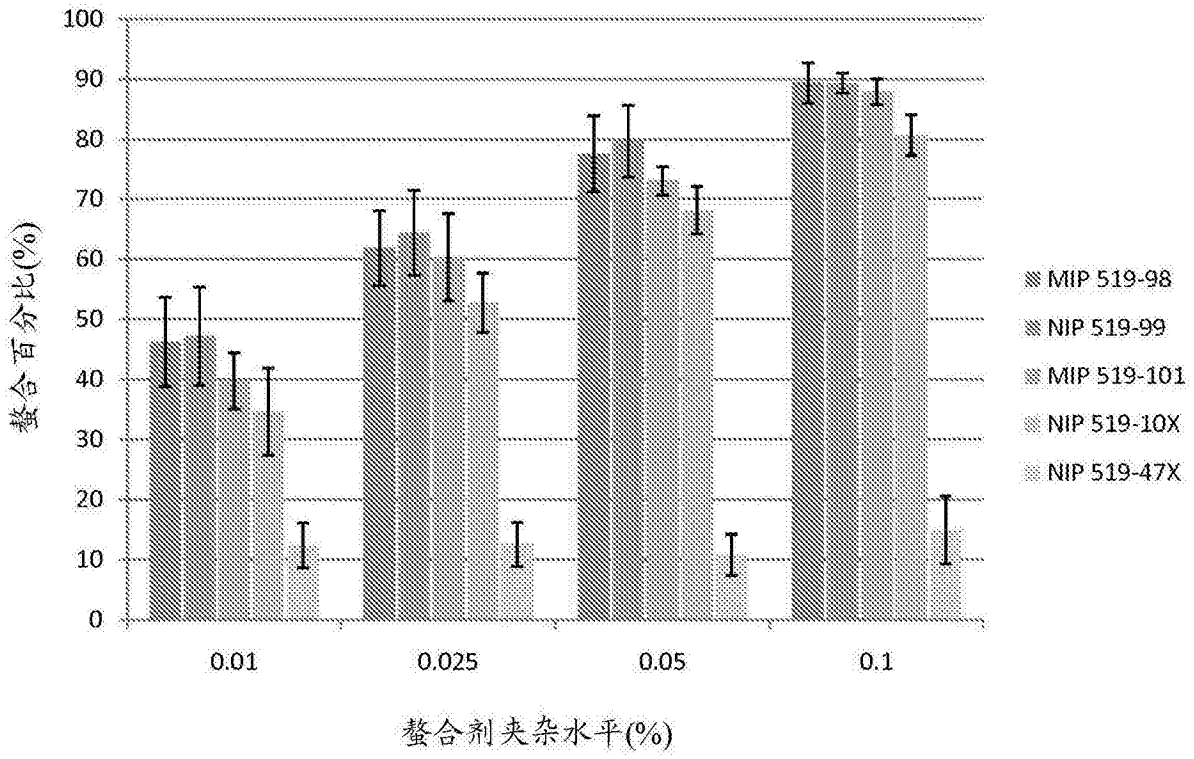

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
螯合百分比(%)
0.01
0.025
0.05
0.1
螯合剂夹杂水平(%)
MIP 519-98
NIP 519-99
MIP 519-101
NIP 519-10X
NIP 519-47X

图 14

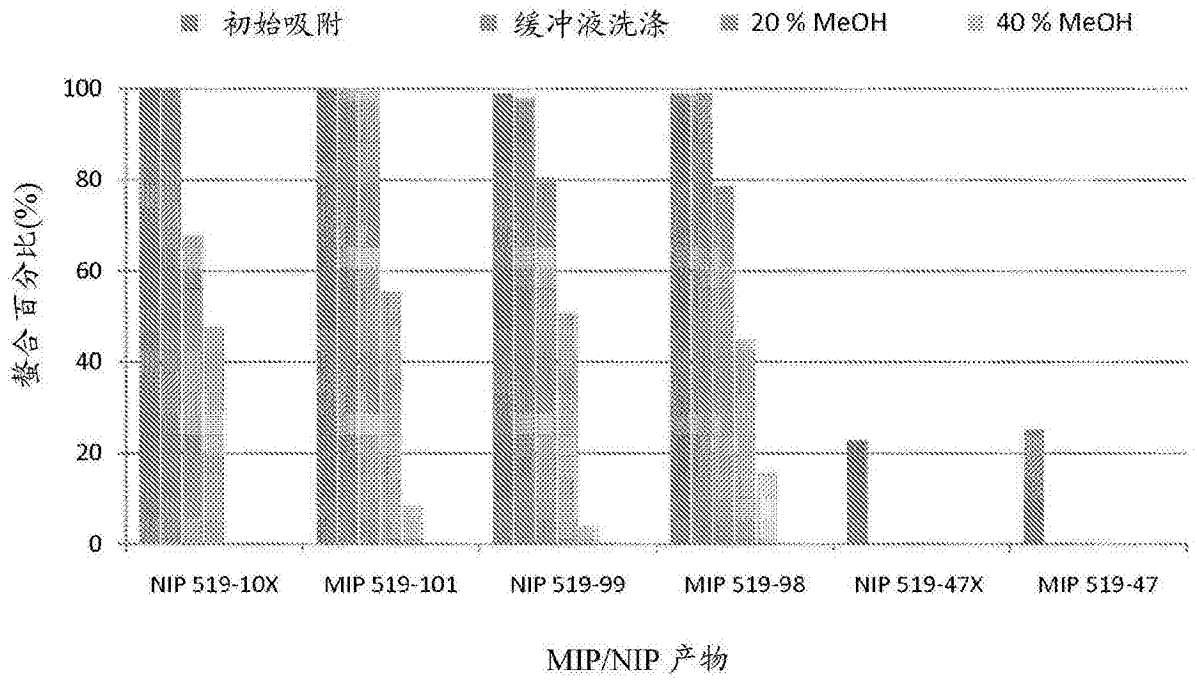

初始吸附
缓冲液洗涤
20 % MeOH
40 % MeOH
100
80
60
40
20
0
螯合百分比(%)
NIP 519-10X
MIP 519-101
NIP 519-99
MIP 519-98
NIP 519-47X
MIP 519-47
MIP/NIP 产物

图 15

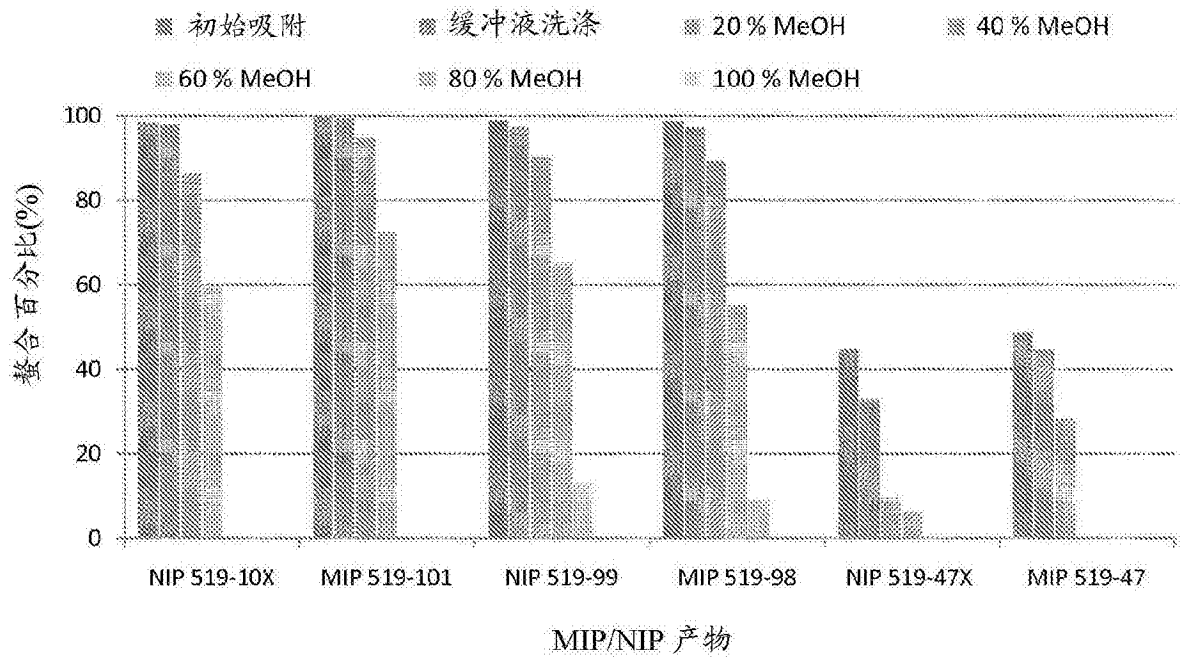

初始吸附
缓冲液洗涤
20 % MeOH
40 % MeOH
60 % MeOH
80 % MeOH
100 % MeOH
整合百分比(%)
100
80
60
40
20
0
NIP 519-10X
MIP 519-101
NIP 519-99
MIP 519-98
NIP 519-47X
MIP 519-47
MIP/NIP 产物

图 16