



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032034

(51)<sup>7</sup> G01N 33/00

(13) B

(21) 1-2017-01937

(22) 27/08/2010

(62) 1-2012-00354

(86) PCT/US2010/047032 27/08/2010

(87) WO 2011/031562 17/03/2011

(30) 61/237,549 27/08/2009 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/07/2017 352A

(73) ALLTECH, INC. (US)

3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356, United States of America

(72) YIANNIKOURIS, Alexandros (FR); KWIATKOWSKI, Stefan (US); KUDUPOJE, Manoj, Bojappa (IN); MATNEY, Clayton (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP CÀNG HÓA ĐỘC TỔ NẤM RA KHỎI VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYME ĐƯỢC TẠO KHUÔN PHÂN TỬ

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa polyme được tạo khuôn phân tử (MIP). Cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa MIP tái sử dụng được, thân thiện với hệ sinh thái và có thể được sản xuất với số lượng lớn, phương pháp sản xuất chế phẩm này và phương pháp sử dụng chúng (ví dụ, để càng hóa và/hoặc hấp phụ hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm)). Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong chế độ ăn uống, trị liệu, phòng bệnh, chế biến và sản xuất thực phẩm và đồ uống, cũng như được ứng dụng trong nghiên cứu, kiểm soát chất lượng và truy xuất nguồn gốc.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Nhìn chung, sáng chế đề cập đến polyme được tạo khuôn phân tử (molecularly imprinted polymers - MIP). Cụ thể, sáng chế đề cập đến MIP tái sử dụng được, thân thiện với hệ sinh thái, phương pháp sản xuất và phương pháp sử dụng chúng (ví dụ, để sàng hóa và/hoặc hấp phụ hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm)). Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau, bao gồm chế độ ăn uống, trị liệu, phòng bệnh, chế biến và sản xuất thực phẩm và đồ uống, cũng như các ứng dụng trong nghiên cứu và kiểm soát chất lượng.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Độc tố nấm là chất chuyển hoá thứ cấp được tiết ra bởi nhiều loại nấm khác nhau, thường được tạo ra ở các loại hạt ngũ cốc cũng như thức ăn thô cho gia súc trước, trong và sau khi thu hoạch. Thức ăn thô cho gia súc và ngũ cốc tiếp xúc một cách tự nhiên với bào tử nấm. Việc nhiễm nấm của cây trồng và quá trình sinh tổng hợp các độc tố phụ thuộc vào tình trạng sức khỏe của cây trồng trước khi thu hoạch, các điều kiện khí tượng, kỹ thuật thu hoạch, điều kiện ủ và chế độ thủy nhiệt trước khi làm ổn định để bảo quản và chế biến thức ăn. Tùy thuộc vào loại nấm, sự phát triển của nấm được kiểm soát bởi nhiều thông số hóa-lý gồm lượng nước tự do ( $a_w$ ), nhiệt độ, sự có mặt của oxy, bản chất của cơ chất, và các điều kiện pH. Độc tố nấm sinh sôi nảy nở trước khi thu hoạch cũng như sau khi thu hoạch trong quá trình bảo quản.

Một số nấm chỉ sản xuất độc tố ở một mức ẩm, nhiệt độ hoặc oxy cụ thể. Ảnh hưởng của độc tố nấm thay đổi rất lớn theo độ độc của chúng. Một số độc tố nấm gây chết người, một số gây ra bệnh hoặc các vấn đề về sức khỏe có thể nhận thấy được, nhưng một số làm yếu hệ miễn dịch mà không tạo ra các triệu chứng đặc trưng cho độc tố nấm đó, một số chỉ tác động như chất gây dị ứng hoặc chất kích thích và một số vẫn chưa rõ tác động như thế nào đến người hoặc động vật. Trong chiến tranh thế giới lần thứ II, các binh lính Nga mắc phải chứng hoại tử da nghiêm

trọng, chứng xuất huyết và tiêu xương sau khi ăn các loại hạt mốc bị nhiễm *Fusarium*. Tuy nhiên, chỉ đến những năm 1960, khi hơn 100.000 con gà tây ở Anh bị chết bởi bệnh gan gây chết (Bệnh Turkey X) thì cộng đồng các nhà khoa học mới nhận ra tác động tiêu cực này có liên quan đến độc tố nấm (xem, ví dụ, Trenholm H.L., Charmley L.L., and Prelusky D.B., 1996. Mycotoxin binding agents: An update on what we know. In: Biotechnology in the Feed Industry (Lyons T. P and Jacques K.A eds.) Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK, pp. 327-349.). Theo báo cáo của Tổ chức Nông Lương Liên hiệp quốc (FAO), khoảng 25% nguồn cung cấp ngũ cốc trên thế giới bị nhiễm độc tố nấm. Việc nhiễm độc tố nấm có tác động tiêu cực về kinh tế đối với các nhà sản xuất thực phẩm và thức ăn cho gia súc, đặc biệt là các nhà sản xuất ngũ cốc và chăn nuôi gia cầm.

Độc tố nấm có thể xuất hiện trong chuỗi thức ăn do việc nhiễm nấm của sản phẩm thực vật (ví dụ, thức ăn thô cho gia súc, ngũ cốc, protein thực vật, sản phẩm phụ của ngũ cốc đã qua chế biến, sản phẩm thức ăn thô và rỉ đường), mà có thể được con người ăn trực tiếp hoặc được ăn vào thông qua các loại hạt đã bị nhiễm độc, (các) loại thức ăn cho vật nuôi hoặc động vật khác. Độc tố nấm có nhiều khả năng không bị phân hủy trong quá trình tiêu hóa, vì vậy chúng vẫn tồn tại trong chuỗi thức ăn trong các sản phẩm thực phẩm (ví dụ, thịt, cá, trứng và các sản phẩm từ sữa) hoặc ở dạng các chất chuyển hoá của độc tố gốc đã bị phân cắt. Việc xử lý bằng nhiệt độ như nấu và làm đông lạnh không phải là các phương pháp thích hợp để làm giảm hàm lượng của độc tố nấm. Như vậy, có nhu cầu về chế phẩm và/hoặc phương pháp để làm giảm các tác động bất lợi và/hoặc loại bỏ độc tố nấm có trong chuỗi thức ăn cho gia súc và/hoặc trong thực phẩm.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề cập đến polyme được tạo khuôn phân tử (MIP). Cụ thể, sáng chế đề cập đến MIP tái sử dụng được, thân thiện với hệ sinh thái, phương pháp sản xuất chúng và phương pháp sử dụng chúng (ví dụ, để sàng lọc và/hoặc hấp phụ hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm)). Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau, bao gồm chế độ ăn uống, trị liệu, phòng bệnh, chế biến và sản xuất thực phẩm và đồ uống cũng như để ứng dụng trong nghiên cứu và kiểm soát chất lượng.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa polyme được tạo khuôn phân tử được tổng hợp bằng cách sử dụng khuôn độc tố nấm. Sáng chế không bị giới hạn ở khuôn độc tố nấm được sử dụng để tạo ra polyme được tạo khuôn phân tử. Thực vậy, nhiều khuôn độc tố nấm có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axetoxycirpenediol, axetyldeoxynivalenol, axetylnivalenol, axetylneosolaniol, độc tố axetyl T-2, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 và G2, aflatrem, axit altenuic, alternariol, austdiol, austamit, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolit, brevianamit, butenolit, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, axit xyclopiazonic, deaxetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diaxetat, deoxynivalenol monoaxetat, diaxetoxycirpenol, destruxin B, emestrin, enniatin, các độc tố alkaloit nấm cựa gà và nội ký sinh thực vật như ergin, ergocornin, ergocristin, ergocryptin, ergometrin, ergonin, ergosin, ergotamin, ergovalin, lysergol, axit lysergic, và các epime có liên quan, fructigenin +1, fumagilin, fumonisin, fumonisin A1, A2, B1 và B2 và B3, fusarenon X, fusarochromanon, axit fusaric, fusarin, gliotoxin, độc tố HT-2, hyalodendrin, ipomeanin, islanditoxin, isofumigaclavin A và B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzin, moniliformin, monoaxetoxycirpenol, axit mycophenolic, neosolaniol, nivalenol, độc tố NT-1, độc tố NT-2, ocratoxin, oosporein, axit oxalic, paspalitrem A và B, patulin, axit penixillic, penitrem, phomopsin, độc tố PR, roridin E, roquefortin A và B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxin, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframin, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonin, độc tố T-1, độc tố T-2, axit tenuazoic, triaxetoxycirpendiol, trichothexen, trichodermin, trichothecin, trichoverrin, trichoverrol, tryptoquivalen, verrucarín, verruculogen, verticillin, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenol, zearalanon, zearalenon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearanol và các họ phụ và/hoặc dẫn xuất của chúng và/hoặc các thể tiếp hợp. Theo một số phương án được ưu tiên, khuôn độc tố nấm là OTA. Theo phương án được ưu tiên khác, khuôn độc tố nấm là sporidesmin hoặc alkaloit nấm cựa gà. Theo một số phương án, khuôn ocratoxin là N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin. Theo một số phương án, khuôn sporidesmin là 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới

hạn ở các khuôn ocratoxin hoặc sporidesmin này. Thực vậy, nhiều khuôn khác nhau có thể được sử dụng bao gồm N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyanilin, 2,3-dimethoxyanilin, ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylat, 6,7-dimethoxyisatin, hoặc 6,7-dimethoxy-1-methylisatin.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất polyme được tạo khuôn phân tử bao gồm các bước: tạo ra: khuôn độc tổ nấm; và một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang; và cho khuôn độc tổ nấm tiếp xúc với một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang trong điều kiện cho phép polyme hoá một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang khi có mặt khuôn độc tổ nấm. Theo một số phương án, khuôn độc tổ nấm là N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanin. Theo một số phương án, khuôn độc tổ nấm là 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatin. Sáng chế không bị giới hạn ở khuôn độc tổ nấm được sử dụng. Thực vậy, nhiều phân tử tổng hợp có thể được sử dụng làm khuôn độc tổ nấm, trong đó phân tử tổng hợp này bắt chước một hoặc nhiều cấu trúc, hình dạng và/hoặc các đặc tính hóa học khác của độc tổ nấm tự nhiên. Tương tự, sáng chế không bị giới hạn ở loại monome được sử dụng. Ví dụ, nhiều monome là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 2-vinylpyridin, 2-hydroxyethylmetacrylat và axit metacrylic. Tương tự, sáng chế không bị giới hạn ở loại chất liên kết ngang được sử dụng. Ví dụ, nhiều chất liên kết ngang là đã biết đối với người có trình độ trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ethylen glycol dimetacrylat. Theo một số phương án, sự polyme hoá được khơi mào bằng cách tạo thành gốc tự do trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 110°C, mặc dù nhiệt độ thấp hơn (ví dụ, 50, 45, 40, 35, 30°C hoặc thấp hơn) và cao hơn (ví dụ, 115, 120, 125, 130°C hoặc cao hơn) có thể được sử dụng. Theo một số phương án, gốc tự do được tạo thành bằng cách phân hủy nhiệt đối với azoisobutyronitril (AIBN). Sáng chế cũng không bị giới hạn bởi loại dung môi hữu cơ được sử dụng. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là toluen, cyclohexan, axetonitril, dung dịch rượu polyvinyl (PVA)/nước, và hỗn hợp của hai hoặc nhiều toluen, cyclohexan, axetonitril, và dung dịch PVA/nước. Theo một số phương án, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 và 75°C. Theo một số phương án, khuôn độc tổ nấm được loại ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử sau

khi polyme hoá một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang. Theo một số phương án, polyme này được rửa bằng dung dịch một hoặc nhiều lần để loại bỏ khuôn độc tố nấm ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại dung dịch được sử dụng để rửa. Theo một số phương án, dung dịch này là dung môi hữu cơ, chất đệm, nước hoặc hỗn hợp của chúng. Sáng chế cũng không bị giới hạn bởi loại dung môi hữu cơ được sử dụng. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là rượu etylic, rượu metylic, axetonitril, toluen, và/hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, chất đệm là dung dịch chất đệm được điều chế bằng cách cho phản ứng natri hydroxit, axit xitric, axit succinic và axit axetic. Theo một số phương án, nước là nước khử ion. Theo một số phương án, polyme được tạo khuôn phân tử được làm khô sau một hoặc nhiều lần rửa. Theo một số phương án, cho polyme được tạo khuôn phân tử tiếp xúc với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 90°C (ví dụ, nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C; nằm trong khoảng từ 75 đến 80°C) để làm khô polyme được tạo khuôn phân tử, mặc dù có thể sử dụng nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp cang hóa độc tố nấm từ vật liệu, phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp vật liệu chứa độc tố nấm; và polyme được tạo khuôn phân tử được tạo ra thông qua sự polyme hoá một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang trong điều kiện có mặt khuôn độc tố nấm; và cho polyme được tạo khuôn phân tử tiếp xúc với vật liệu chứa độc tố nấm trong điều kiện cho phép polyme được tạo khuôn phân tử liên kết với độc tố nấm. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại độc tố nấm được cang hóa (ví dụ, được nhắm đích để cang hóa) từ vật liệu. Thực vậy, nhiều độc tố nấm có thể được cang hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axetoxycirpenediol, axetyldeoxynivalenol, axetylnivalenol, axetylneosolaniol, độc tố axetyl T-2, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 và G2, aflatrem, axit altenuic, alternariol, austdiol, austamit, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolit, brevianamit, butenolit, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodiol, cytochalasins, axit xyclopiazonic, deaxetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diaxetat, deoxynivalenol monoaxetat, diaxetoxycirpenol, destruxin B, emestrin, enniatin, các độc tố alkaloit nấm cựa gà và nội ký sinh thực vật như ergin, ergocornin, ergocristin, ergocryptin, ergometrin, ergonin, ergosin, ergotamin,

ergovalin, lysergol, axit lysergic, và các epime có liên quan, fructigenin +1, fumagilin, fumonisin, fumonisin A1, A2, B1 và B2 và B3, fusarenon X, fusarochromanon, axit fusaric, fusarin, gliotoxin, độc tố HT-2, hyalodendrin, ipomeanin, islanditoxin, isofumigaclavin A và B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzin, moniliformin, monoaxetoxycirpenol, axit mycophenolic, neosolaniol, nivalenol, độc tố NT-1, độc tố NT-2, ocratoxin, oosporein, axit oxalic, paspalitrem A và B, patulin, axit penixillic, penitrem, phomopsin, độc tố PR, roridin E, roquefortin A và B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxin, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframin, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonin, độc tố T-1, độc tố T-2, axit tenuazoic, triaxetoxycirpendiol, trichothexen, trichodermin, trichothecin, trichoverrin, trichoverrol, tryptoquivalen, verrucarín, verruculogen, verticillin, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenol, zearalanon, zearalenon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zeranol và các họ phụ và/hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án được ưu tiên, độc tố nấm được cang hóa từ vật liệu là ocratoxin A. Theo một số phương án được ưu tiên, độc tố nấm là sporidesmin. Theo một số phương án, vật liệu chứa độc tố nấm là đồ uống, thực phẩm, thức ăn cho động vật, dược phẩm, chế phẩm dưỡng dược, mỹ phẩm, các chất cần thiết để duy trì sự sống hoặc vật liệu khác. Theo một số phương án, chất cần thiết để duy trì sự sống là môi trường để sử dụng trong nghề nuôi trồng thủy sản và mẫu khí chứa oxy. Theo một số phương án, polyme được tạo khuôn phân tử đã được liên kết với độc tố nấm không được tách ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm. Theo một số phương án, phương pháp cang hóa độc tố nấm từ vật liệu, còn gồm tách riêng polyme được tạo khuôn phân tử đã được liên kết với độc tố nấm ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm. Theo một số phương án, bước tách riêng gồm chiết, cô đặc và phân tách polyme được tạo khuôn phân tử đã liên kết với độc tố nấm ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm. Theo một số phương án, bước tách riêng này được thực hiện trong cột hoặc hộp sắc ký hoặc phân tách. Theo một số phương án, sau khi tách riêng, độc tố nấm đã được liên kết với polyme được tạo khuôn phân tử được loại ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử bằng cách rửa. Theo một số phương án, độc tố nấm được phân tích định tính và định lượng sau khi loại bỏ ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử. Theo một số phương án, phân tích định lượng và định tính được sử

dụng để truy xuất nguồn gốc (ví dụ, để xác định và/hoặc thiết lập mối tương quan giữa niên đại, vị trí, và/hoặc ứng dụng của đối tượng (ví dụ, vị trí, loại và lượng của độc tố nấm được phát hiện) bằng phương pháp xác định được ghi trong tài liệu). Theo một số phương án, polyme được tạo khuôn phân tử đã loại bỏ độc tố nấm được tái sử dụng để càng hóa độc tố nấm từ vật liệu chứa độc tố nấm. Theo một số phương án, polyme được tạo khuôn phân tử hấp phụ nước nhiều hơn từ 1 đến 10 lần (ví dụ, nhiều hơn từ 1 đến 5 lần, nhiều hơn từ 1 đến 2 lần) so với khối lượng của nó. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều polyme được tạo khuôn phân tử khác nhau được cho tiếp xúc với vật liệu chứa độc tố nấm để càng hóa hai hoặc nhiều độc tố nấm đặc trưng từ vật liệu này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin, bao gồm: chuyển hóa axit 3-5 diclosalixylic thành axit 2-axetoxyaxetoxy-3,5-diclobenzoic; chuyển hóa axit 2-axetoxyaxetoxy-3,5-diclobenzoic thành dạng clorua của axit 2-axetoxyaxetoxy-3,5-diclobenzoic; cho clorua của axit 2-axetoxyaxetoxy-3,5-diclobenzoic phản ứng với etyl este của L-phenylalanin để tạo thành N-(2-axetoxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin; và chuyển hóa N-(2-axetoxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin thành N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin. Theo một số phương án, quá trình chuyển hóa bao gồm bước thủy phân nhóm chức este trong N-(2-axetoxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin, gồm: chuyển hóa axit 2,3-dimetoxybenzoic thành 2,3-dimetoxy-N-tertbutoxycarbonylanilin; chuyển hóa 2,3-dimetoxy-N-tertbutoxycarbonylanilin thành 2,3-dimetoxyanilin; cho 2,3-dimetoxyanilin phản ứng với diethylketomalonat để tạo thành etyl 6,7-dimetoxy-3-hydroxy-3-(2-indolon)-cacboxylat; chuyển hóa etyl 6,7-dimetoxy-3-hydroxy-3-(2-indolon)-cacboxylat thành 6,7-dimetoxyisatin; chuyển hóa 6,7-dimetoxyisatin thành 6,7-dimetoxy-1-metylisatin; và chuyển hóa 6,7-dimetoxy-1-metylisatin thành 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp polyme được tạo khuôn phân tử đặc hiệu đối với độc tố nấm, phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra hợp chất khuôn hỗ trợ MIP liên kết với độc tố nấm; kết hợp hợp chất khuôn này trong phản ứng gồm monome MIP và chất phản ứng liên kết ngang trong hệ dung môi gồm

dung môi không cực, không proton; và thúc đẩy quá trình polyme hóa bằng tác động được chọn từ nhóm gồm cho bình phản ứng tiếp xúc với nhiệt độ cao hoặc chiếu tia xạ UV vào bình phản ứng này. Theo một số phương án, độc tố nấm gồm ocratoxin A, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án trên. Thực vậy, nhiều polyme được tạo khuôn phân tử đặc hiệu đối với độc tố nấm có thể được tổng hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, MIP đặc hiệu đối với axetoxycirpenediol, axetyldeoxynivalenol, axetylnivalenol, axetylneosolaniol, độc tố axetyl T-2, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 và G2, aflatrem, axit altenuic, alternariol, austdiol, austamit, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolit, brevianamit, butenolit, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, axit xyclopiazonic, deaxetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diaxetat, deoxynivalenol monoaxetat, diaxetoxycirpenol, destruxin B, emestrin, enniatin, các độc tố alkaloit nấm cựa gà và nội ký sinh thực vật như ergin, ergocornin, ergocristin, ergocryptin, ergometrin, ergonin, ergosin, ergotamin, ergovalin, lysergol, axit lysergic, và các epime có liên quan, fructigenin +1, fumagilin, fumonisin, fumonisin A1, A2, B1 và B2 và B3, fusarenon X, fusarochromanon, axit fusaric, fusarin, gliotoxin, độc tố HT-2, hyalodendrin, ipomeanin, islanditoxin, isofumigaclavin A và B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzin, moniliformin, monoaxetoxycirpenol, axit mycophenolic, neosolaniol, nivalenol, độc tố NT-1, độc tố NT-2, ocratoxin, oosporein, axit oxalic, paspalitrem A và B, patulin, axit penixillic, penitrem, phomopsin, độc tố PR, roridin E, roquefortin A và B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxin, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframin, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonin, độc tố T-1, độc tố T-2, axit tenuazoic, triaxetoxycirpendiol, trichothexen, trichodermin, trichothecin, trichoverrin, trichoverrol, tryptoquivalen, verrucarín, verruculogen, verticillin, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenol, zearalanon, zearalenon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zeranol và các họ phụ và/hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, khuôn gồm N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin. Theo một số phương án, khuôn gồm 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisin. Sáng chế không bị giới hạn ở monome hoặc chất liên kết ngang cụ thể bất kỳ. Thực vậy, nhiều monome và chất liên kết ngang có thể

được sử dụng, bao gồm các chất được mô tả ở đây. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước rửa polyme được tạo khuôn phân tử để loại bỏ khuôn. Theo một số phương án, việc rửa gồm 1, 2, 3, 4 hoặc nhiều lần rửa bằng dung dịch (ví dụ, bằng dung dịch kiềm loãng, dung dịch axit loãng, hoặc nước) để loại bỏ khuôn.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 thể hiện ocratoxin A và N-(3,5-diclo-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanin (Khuôn OTA).

Fig.2 thể hiện con đường tổng hợp N-(3,5-diclo-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanin (Khuôn OTA).

Fig.3 thể hiện hiệu quả càng hóa MIP-OTA đối với OTA ở một số tỷ lệ kết hợp.

Fig.4 thể hiện MIP-OTA được quan sát thấy trên kính hiển vi quét điện tử Hitachi S-4300 ở tỷ lệ phóng đại 15.000 lần và ở 3,0keV.

Fig.5 thể hiện ái lực càng hóa của MIP (được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-xyclohexan) cho 5 mức kết hợp khác nhau ở 3 nồng độ OTA khác nhau.

Fig.6 thể hiện hoạt tính càng hóa đối với OTA bởi MIP được sản xuất sử dụng styren và 2-vinylpyridin làm các monome chức năng và được polyme hóa khi khơi mào bằng nhiệt hoặc nhiệt độ thấp và khơi mào bằng UV. Độ hấp phụ ban đầu và độ hấp phụ còn lại sau khi rửa bằng chất đệm xitrat (độ pH bằng 4,0) và sau khi rửa bằng metanol nồng độ 100% được báo cáo.

Fig.7 thể hiện hoạt tính càng hóa đối với polyphenol và axit 3-indol axetic bởi MIP được sản xuất từ styren và 2-vinylpyridin làm các monome chức năng và được polyme hóa bằng cách khơi mào ở nhiệt độ thấp và khơi mào bằng UV. Các giá trị hấp phụ ban đầu được báo cáo.

Fig.8 thể hiện ảnh lưới sợi thủy tinh được phủ MIP-OTA và được sử dụng trong ống falcon dung tích 50ml để càng hóa OTA trong rượu vang.

Fig.9 thể hiện các kết quả của thử nghiệm càng hóa ở ba mức MIP-OTA được phủ trên lưới sợi thủy tinh sử dụng bốn điều kiện polyme hóa khác nhau và được thử nghiệm với rượu vang trắng pha OTA ở nồng độ 50, 100, 200 ppb.

Fig.10 thể hiện các kết quả của thử nghiệm cang hóa ba mức NIP được phủ trên lưới sợi thủy tinh sử dụng ba điều kiện polyme hóa và được thử nghiệm trong rượu vang trắng pha OTA ở nồng độ 50, 100, 200 ppb.

Fig.11 thể hiện profin sắc ký của dung dịch chuẩn chứa OTA được ghi lại bằng bộ dò sự phát huỳnh quang và sử dụng sự chọn lọc gradien để tối ưu hóa thời gian lưu giữ của độc tố nấm.

Fig.12 thể hiện cấu trúc phân tử sporidesmin và khuôn sporidesmin (5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin).

Fig.13 thể hiện con đường tổng hợp khuôn sporidesmin.

Fig.14 thể hiện hiệu quả cang hóa đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin bởi MIP-sporidesmin và NIP ở một vài tỷ lệ kết hợp.

Fig.15 thể hiện hoạt tính cang hóa đối với gliotoxin của MIP và NIP được tổng hợp bằng sự polyme hóa được khơi mào bởi nhiệt hoặc nhiệt độ thấp/được khơi mào bằng UV và độ ổn định/tính đặc hiệu của tương tác sau sáu lần rửa liên tiếp được thực hiện với mức metanol tăng dần.

Fig.16 thể hiện hoạt tính cang hóa đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin của MIP và NIP được tổng hợp bằng sự polyme hóa được khơi mào bởi nhiệt hoặc nhiệt độ thấp/được khơi mào bằng UV và độ ổn định/tính đặc hiệu của tương tác sau sáu lần rửa liên tiếp được thực hiện với mức metanol tăng dần.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

#### **Các định nghĩa**

Theo sáng chế, thuật ngữ “polyme được tạo khuôn phân tử” hoặc “MIP” chỉ polyme tổng hợp liên kết có chọn lọc với một hợp chất cụ thể. Theo phương án được ưu tiên, polyme được tạo khuôn phân tử được tổng hợp trong điều kiện có mặt hợp chất đích, còn gọi là hợp chất khuôn, tạo ra MIP có ái lực cao đối với một hợp chất đích đặc hiệu (ví dụ, độc tố nấm). Nhìn chung, polyme được tạo cấu trúc với khuôn (ví dụ, phân tử/phối tử/khuôn được tạo cấu trúc bằng cách tổng hợp (ví dụ, khuôn độc tố nấm tổng hợp)) bắt chước cấu trúc, hình dạng và/hoặc các đặc tính hóa học khác của đích tự nhiên (ví dụ, độc tố nấm tự nhiên) và các thành phần khác như các monome và/hoặc chất phản ứng liên kết ngang. Ví dụ, hợp chất khuôn được

kết hợp vào hỗn hợp tiền polyme và được để tạo ra dạng liên hợp với các monome. Sau đó, hỗn hợp này được polyme hóa bằng hợp chất khuôn để thay thế. Khi polyme đã tạo thành, hợp chất khuôn được loại bỏ, để lại các lỗ hổng bổ sung có ái lực đối với khuôn (hoặc các thành phần khác giống với khuôn (ví dụ, độc tố nấm có trong tự nhiên). Các vùng này (ví dụ, các lỗ hổng hoặc các vùng khác) được điều chỉnh thích hợp để liên kết các hợp chất đích cần liên kết sau này để tạo ra ái lực cao đối với các hợp chất này.

Đáng chú ý là trong khi các hợp chất đích đặc hiệu được sử dụng để tạo thành polyme được tạo khuôn phân tử, polyme này có thể có ái lực cao đối với nhóm hợp chất khác nhưng tương tự với hợp chất đích. Ví dụ, polyme được tạo khuôn phân tử có thể liên kết với một số hợp chất mà tương tự về hình dạng, mật độ điện tích, hình học hoặc các tính chất vật lý hoặc hóa học khác với hợp chất khuôn (ví dụ, khuôn độc tố nấm tổng hợp).

Theo sáng chế, thuật ngữ “polyme”, chỉ phân tử (đại phân tử) được cấu thành từ các đơn vị cấu trúc lặp lại thường được nối với nhau bằng liên kết hóa học cộng hóa trị để tạo thành mạng lưới.

Theo sáng chế, thuật ngữ “hợp chất khuôn” hoặc “hợp chất đích” chỉ hợp chất được tạo phức bằng các phối tử (ví dụ, các monome) mà sau đó được polyme hóa, tạo thành polyme được tạo khuôn phân tử. Hợp chất khuôn bao gồm các hợp chất hữu cơ (ví dụ, độc tố nấm, peptit, và protein) cũng như các hợp chất vô cơ (ví dụ, các khoáng chất và kim loại nặng). Theo sáng chế, thuật ngữ “khuôn độc tố nấm” chỉ phân tử được tạo cấu trúc bằng cách tổng hợp mà bắt chước cấu trúc, hình dạng và/hoặc các đặc tính hóa học khác của độc tố nấm tự nhiên (ví dụ, ochratoxin, sporidesmin, v.v.). Sáng chế không bị giới hạn bởi loại khuôn độc tố nấm được sử dụng. Thực vậy, nhiều độc tố nấm có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Aflatoxin: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin và các họ phụ, aflatoxicol; Trichothexen: deoxynivalenol, diacetoxycirpenol, monoacetoxycirpenol, scirpenetriol, độc tố T-2, độc tố HT-2, T-2 tetraol, fusarenol X, fusarin C, axit fusaric, fusarochromanon, aurofusarin, fusaproliferin, neosolaniol, nivalenol cùng với chất chuyển hóa và họ phụ; Fumonisin: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 và các họ phụ; Ochratoxin: ochratoxin A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$  và chất chuyển hóa;

Zearalenon, zearalenol  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon, zearalanol  $\alpha$ ,  $\beta$ , zeranol và chất chuyển hoá; Patulin, gliotoxin, axit mycophenolic, axit moniliformin xyclopiazonic, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; axit penixillic, độc tố PR, roquefortin A, B, rubratoxin và các họ phụ; alkaloit nấm cựa gà: ergotamin, clavin alkaloit; Isofumigaclavin A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrem và các họ phụ; Phomopsin: Phomopsin A và các họ phụ; Verrucarín A, verruculogen và các họ phụ; Sporidesmin và các họ phụ; slaframin, swainsonin, axit tenuazoic, alternariol, wortmannin và các độc tố nấm khác được mô tả theo sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ “monome”, chỉ phân tử có thể được liên kết hóa học với các monome khác để tạo thành polyme.

Theo sáng chế, thuật ngữ “liên kết ngang” và “chất liên kết ngang”, chỉ phân tử chứa hai, ba hoặc bốn liên kết đôi mà có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều monome để tạo thành mạng lưới polyme.

Theo sáng chế, thuật ngữ “đơn vị cấu trúc”, chỉ khối xây dựng nên mạch polyme, và liên quan đến đơn vị lặp lại.

Theo sáng chế, thuật ngữ “anionic” hoặc “anion” chỉ ion có điện tích âm.

Theo sáng chế, thuật ngữ “cationic” hoặc “cation” chỉ ion có điện tích dương. Thuật ngữ này có thể chỉ hợp chất dạng polyme, như polyme được tạo khuôn phân tử, mang điện tích dương.

Theo sáng chế, thuật ngữ “axit” chỉ hợp chất hóa học bất kỳ có thể cho (các) proton và/hoặc nhận (các) electron. Theo sáng chế, thuật ngữ “bazơ” chỉ hợp chất hóa học bất kỳ có thể nhận (các) proton và/hoặc cho (các) electron hoặc ion hydroxit. Theo sáng chế, thuật ngữ “muối” chỉ hợp chất có thể thu được từ axit và bazơ vô cơ hoặc hữu cơ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “rò rỉ”, chỉ phân đoạn còn lại của khuôn vẫn kết hợp với MIP sau một vài giai đoạn rửa MIP, và tiếp tục phân ly khỏi MIP và cản trở hoạt động hút thấm của nó.

Theo sáng chế, thuật ngữ “porogenic/porogen”, chỉ hợp chất, phân tử, chất đệm, dung môi, (ví dụ, toluen, xylen, etylbenzen) được sử dụng để thay đổi kích thước của các lỗ hổng trên polyme (ví dụ, các lỗ hổng của MIP), trong khi tỷ lệ của

polyme so với porogen tỷ lệ thuận với mức độ xốp (số lượng lỗ hổng) của cấu trúc cuối cùng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độ xốp”, chỉ đơn vị đo khoảng trống trong vật liệu (ví dụ, lỗ hổng MIP) có thể giữ lại chất khí hoặc chất lỏng hoặc cho phép chúng đi qua.

Theo sáng chế, thuật ngữ “polyme hoá”, chỉ quá trình phản ứng của các phân tử monome với nhau trong phản ứng hóa học để tạo thành mạng lưới ba chiều hoặc mạch polyme.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kết tủa”, chỉ sự tạo thành chất rắn trong dung dịch trong phản ứng hóa học. Khi phản ứng xảy ra, chất rắn được tạo thành được gọi là chất kết tủa, và chất lỏng vẫn còn trên chất rắn được gọi là phần dịch nổi.

Theo sáng chế, thuật ngữ “ly tâm” chỉ quy trình phân tách các phân tử theo kích thước hoặc tỷ trọng sử dụng lực ly tâm được tạo ra khi rôto này quay đối tượng xung quanh một trục cố định, tạo ra lực vuông góc với trục này. Hoạt động ly tâm này dựa trên nguyên lý lắng cặn, trong đó gia tốc hướng tâm được sử dụng để phân bố đồng đều các chất có tỷ trọng lớn hơn và thấp hơn thành các lớp có tỷ trọng khác nhau.

Theo sáng chế, thuật ngữ “nồng độ” chỉ lượng hợp chất trong một khoảng không xác định. Nồng độ thường được biểu thị dưới dạng khối lượng cho một đơn vị thể tích. Để pha loãng dung dịch, phải bổ sung nhiều dung môi hơn, hoặc làm giảm lượng chất tan (ví dụ, bằng cách phân tách chọn lọc, làm bay hơi, làm khô bằng cách phun, làm khô lạnh). Trái lại, để cô đặc dung dịch, cần phải làm giảm lượng dung môi.

Theo sáng chế, thuật ngữ “lớp” chỉ các chất lắng thường theo phương nằm ngang thành lớp vật liệu, tạo thành một phần hoặc phân đoạn nằm phía trên thu được sau khi phân tách bằng cách ly tâm hoặc lắng nhờ tỷ trọng của vật liệu.

Theo sáng chế, thuật ngữ “được tinh chế” hoặc “tinh chế” chỉ việc loại bỏ các thành phần ngoại lai ra khỏi mẫu. Khi sử dụng theo khía cạnh hóa học “được tinh chế” hoặc “tinh chế” chỉ việc phân tách vật lý các chất hóa học đang quan tâm ra khỏi các chất ngoại lai, không mong muốn hoặc các tạp chất. Các phương pháp

thường được sử dụng để tinh chế phân tử hữu cơ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các phương pháp sau: tinh chế ái lực, lọc cơ học, ly tâm, làm bay hơi, chiết tạp chất, hòa tan trong dung môi trong đó các thành phần khác là không tan, kết tinh, hấp phụ, chưng cất, cất phân đoạn, thăng hoa, nóng chảy, tinh lọc, điện phân và thẩm tách.

Theo sáng chế, thuật ngữ “làm khô” chỉ loại quy trình bất kỳ để làm giảm hoặc loại bỏ chất lỏng trong chất.

Theo sáng chế, thuật ngữ “làm khô bằng cách phun” chỉ phương pháp làm khô vật liệu chứa chất lỏng sử dụng khí nóng để làm bay hơi chất lỏng để làm giảm hoặc loại bỏ chất lỏng trong vật liệu đó. Nói cách khác, vật liệu được làm khô bằng cách phun hoặc phun hoặc phun sương vào luồng gió của không khí khô được gia nhiệt.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bột chảy tự do khô” chỉ bột khô chảy tự do.

Theo sáng chế, thuật ngữ “nghiền” chỉ việc làm giảm cỡ hạt bởi sự va đập, cắt, hoặc mài mòn.

Theo sáng chế, thuật ngữ “rửa” chỉ việc loại bỏ hoặc làm sạch (ví dụ, sử dụng loại chất hòa tan bất kỳ (ví dụ, nước cất, chất đệm, hoặc dung môi, hoặc hỗn hợp) để hòa tan tạp chất hoặc thành phần hòa tan không mong muốn của chế phẩm (ví dụ, MIP có thể được rửa để loại bỏ thành phần khuôn ra khỏi mẫu).

Theo sáng chế, thuật ngữ “chất phân tích” chỉ nguyên tử, phân tử, chất, hoặc phân tử hóa học. Nhìn chung, chất phân tích, bản thân nó không xác định được, đúng hơn là, dạng hoặc các tính chất (vật lý, hóa chất, sinh học, v.v.) của chất phân tích được xác định bằng cách sử dụng quy trình phân tích, như sắc ký lỏng hiệu năng cao (được viết tắt là HPLC). Ví dụ, nhìn chung không xác định bản thân “cái ghế” (thành phần chất phân tích) nhưng, chiều cao, chiều rộng, v.v.. của ghế thì xác định được. Tương tự, nhìn chung không xác định độc tố nấm nhưng đúng hơn là xác định được một hoặc nhiều tính chất của độc tố nấm (ví dụ, sự phát huỳnh quang của độc tố nấm, có liên quan, ví dụ, đến độ ổn định, nồng độ, hoặc hoạt tính sinh học của nó).

Theo sáng chế, thuật ngữ “mẫu” được sử dụng theo nghĩa rộng bao gồm mẫu xét nghiệm từ nguồn bất kỳ (ví dụ, mẫu tổng hợp, sinh học và môi trường). Mẫu

tổng hợp bao gồm vật liệu bất kỳ được sản xuất một cách nhân tạo (ví dụ, MIP). Mẫu sinh học có thể thu được từ động vật (bao gồm người), và gồm các dịch lỏng, chất rắn, mô, và chất khí. Mẫu sinh học bao gồm sản phẩm máu, như huyết tương, huyết thanh và các sản phẩm tương tự. Mẫu môi trường bao gồm vật liệu môi trường như chất bề mặt, đất, nước, tinh thể và mẫu công nghiệp.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sắc ký lỏng hiệu năng cao” và thuật ngữ “HPLC” chỉ dạng sắc ký lỏng để phân tách hợp chất. Các hợp chất này được hòa tan trong dung dịch. Các hợp chất sẽ được tách riêng bằng cách phun hỗn hợp mẫu lên trên cột, qua đó dung môi hoặc hỗn hợp dung môi chảy qua, để rửa giải các thành phần của hỗn hợp, ra khỏi cột. Thiết bị HPLC gồm vật chứa pha động, bơm, thiết bị phun, cột phân tách, và bộ dò. Sự có mặt của chất phân tích trong dòng chảy ra khỏi cột được ghi lại bằng cách phát hiện một cách định lượng sự thay đổi chỉ số khúc xạ, độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng đã được thiết lập, sự phát huỳnh quang sau khi kích thích bằng bước sóng thích hợp, hoặc phản ứng điện hóa.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tín hiệu” thường được sử dụng để chỉ quy trình phát hiện bất kỳ cho thấy phản ứng đã xảy ra (ví dụ, liên kết của kháng thể với kháng nguyên). Tín hiệu có thể được đánh giá định tính cũng như định lượng. Ví dụ về loại “tín hiệu” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tín hiệu phóng xạ, tín hiệu đo huỳnh quang hoặc tín hiệu chất phản ứng/sản phẩm đo màu.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kính hiển vi quét điện tử” và thuật ngữ “SEM” chỉ loại kính hiển vi điện tử mà ghi lại hình ảnh bề mặt mẫu bằng cách quét bề mặt mẫu này bằng chùm electron năng lượng cao trong kiểu quét mảnh. Các electron sẽ tương tác với các nguyên tử tạo nên mẫu, tạo ra tín hiệu chứa thông tin về đặc trưng bề mặt của mẫu, thành phần và các tính chất khác như độ dẫn điện.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chất cố định” chỉ hóa chất có khả năng cố định một chất vào một chất khác để “cố định”, làm ổn định, hoặc theo cách khác bảo quản chất này ở dạng hiện tại của nó để ngăn ngừa chất đó không bị phân rã hoặc theo cách khác ngăn không cho chất này bị thay đổi. Thông thường, các chất cố định được sử dụng trong phép hiển vi quét điện tử (SEM) để pha chế mẫu.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*in vivo*” chỉ các nghiên cứu và/hoặc thử nghiệm được tiến hành trên sinh vật sống, xảy ra trong cơ thể sinh vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*in vitro*” chỉ môi trường nhân tạo bên ngoài cơ thể sống và các quá trình hoặc phản ứng sinh học thường xảy ra trong cơ thể nhưng được tạo ra để xảy ra trong môi trường nhân tạo. Ví dụ về môi trường *in vitro* bao gồm ống nghiệm và môi trường nuôi cấy tế bào.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*in situ*” có nghĩa là trong điều kiện của hỗn hợp phản ứng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*ex vivo*” chỉ các nghiên cứu và/hoặc thử nghiệm và/hoặc ứng dụng được thực hiện trong hoặc trên mô sống trong môi trường nhân tạo bên ngoài cơ thể khi các điều kiện tự nhiên thay đổi ít nhất.

Theo sáng chế, thuật ngữ “hấp thụ” chỉ quy trình mà bằng quy trình này, vật liệu “thu nhận” hoặc “hút” các chất khác. Ví dụ, “hấp thụ” có thể chỉ quy trình hấp thụ hoặc đồng hóa các chất vào trong tế bào hoặc qua các mô và cơ quan thông qua sự khuếch tán hoặc thẩm thấu (ví dụ, hấp thụ các chất dinh dưỡng bởi hệ tiêu hóa hoặc sự hấp thụ thuốc vào dòng máu).

Theo sáng chế, thuật ngữ “hấp phụ” và “sự hấp phụ” chỉ quy trình xảy ra khi vật liệu được càng hóa bởi, và/hoặc được tích lũy bởi (ví dụ, trên bề mặt của) chế phẩm (tác nhân càng hóa và/hoặc chất hấp phụ), hoặc quy trình trong đó chế phẩm (ví dụ, MIP) liên kết với phân tử đích (ví dụ, độc tố nấm) trong mẫu (ví dụ, để loại bỏ phân tử đích ra khỏi mẫu).

Theo sáng chế, thuật ngữ “sự hút thấm” chỉ cả sự hấp phụ và hấp thụ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “càng hóa” và/hoặc thuật ngữ “sự càng hóa” chỉ sự kết hợp vật lý (ví dụ, thông qua liên kết (ví dụ, liên kết hydro, liên kết ion, liên kết cộng hóa trị hoặc loại liên kết khác) của hai hoặc nhiều thực thể khi tiếp xúc với nhau (ví dụ, nhờ đó tạo thành phức chất). Các dạng kết hợp nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, liên kết hydro, liên kết phối trí, và sự hình thành cặp ion. Sự tương tác càng hóa có thể bao gồm nhiều tương tác hóa học (ví dụ, liên kết hóa học) có thể thay đổi, phụ thuộc vào hóa học lập thể và hình học của mỗi thực thể (ví dụ, ngoài ra còn xác định tính đặc hiệu của sự càng hóa). Khi hai hoặc nhiều thực thể được càng hóa, chúng có thể được càng hóa theo cách liên kết hóa học, nhưng cũng có thể được kết hợp thông qua điện tích, tương tác lưỡng cực-lưỡng cực hoặc các loại tương tác khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chất càng hóa” và/hoặc “tác nhân càng hóa”, chỉ thực thể có khả năng tạo thành phức chất với thực thể thứ hai.

Theo sáng chế, thuật ngữ “phức chất” chỉ thực thể được tạo thành bởi sự kết hợp giữa hai hoặc nhiều thực thể riêng biệt (ví dụ, sự kết hợp giữa hai hoặc nhiều thực thể trong đó các thực thể giống hoặc khác nhau (ví dụ, các thực thể hóa học giống nhau hoặc khác nhau). Việc kết hợp có thể được thực hiện thông qua liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị (ví dụ, thông qua tương tác van der Waals, tĩnh điện, tương tác điện tích, tương tác kỵ nước, tương tác lưỡng cực, và/hoặc lực liên kết hydro (ví dụ, liên kết uretan, liên kết amit, liên kết este, và hỗn hợp của chúng)).

Theo sáng chế, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng chế phẩm (ví dụ, MIP) đủ để đạt được các kết quả có lợi hoặc kết quả mong muốn. Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng và/hoặc được kết hợp với vật liệu khác trong một hoặc nhiều lần sử dụng, ứng dụng hoặc liều và không được dự định là bị giới hạn ở chế phẩm hoặc đường sử dụng cụ thể.

Theo sáng chế, thuật ngữ “động vật” chỉ các loài thuộc giới động vật. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở vật nuôi, động vật trong nông trại, động vật nuôi trong nhà, vật nuôi làm cảnh, động vật biển và động vật nước ngọt, và động vật hoang dã.

Theo sáng chế, thuật ngữ “thực phẩm” chỉ (các) vật liệu mà được tiêu thụ bởi đối tượng (ví dụ, đối tượng là người và/hoặc động vật (ví dụ, mà cung cấp năng lượng và/hoặc chất dinh dưỡng từ chế độ ăn uống của đối tượng)). Ví dụ về thực phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sản phẩm từ sữa, nước ép trái cây, các loại hạt, hoa quả, thực vật, thịt, thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), (các) thức ăn cho gia súc, (các) viên tròn, (các) chất cô, (các) đồng sản phẩm được trộn trước, (các) hạt, (các) bã chưng cất rượu, rỉ đường, (các) sợi, cỏ khô (cho súc vật ăn), cỏ, cỏ khô, (các) hạt, lá, bột xay thô, (các) chất tan và (các) chất bổ sung.

Theo sáng chế, “hệ tiêu hóa” chỉ hệ thống (bao gồm hệ thống dạ dày-ruột) trong đó sự tiêu hóa có thể xảy ra hoặc thật sự xảy ra.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tiêu hóa” hoặc “sự tiêu hóa” chỉ việc chuyển hóa thức ăn, thực phẩm, hoặc các hợp chất hữu cơ khác thành dạng hấp thụ được; để làm mềm, phân hủy, hoặc phá vỡ bằng nhiệt và hơi ẩm hoặc tác động hóa học.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độ sinh khả dụng” chỉ tỷ lệ phân tử hoặc thành phần khả dụng đối với cơ thể hoặc đến được vòng tuần hoàn hệ thống. Khi phân tử hoặc thành phần được sử dụng qua đường tĩnh mạch, độ sinh khả dụng của nó là 100%. Tuy nhiên, khi phân tử hoặc thành phần được sử dụng thông qua các con đường khác (như qua đường miệng), độ sinh khả dụng của nó giảm (do sự hấp thụ không hoàn toàn và chuyển hóa lần đầu).

Theo sáng chế, thuật ngữ “việc sử dụng” và thuật ngữ “sử dụng” chỉ hoạt động đưa chất, bao gồm thuốc, tiền dược chất, hoặc chất khác, hoặc hoạt động trị liệu cho đối tượng (ví dụ, đối tượng hoặc các tế bào, mô, và cơ quan *in vivo*, *in vitro*, hoặc *ex vivo*). Đường dùng được nêu làm ví dụ có thể là thông qua mắt (mắt), mồm (miệng), da (tại chỗ hoặc qua da), mũi (qua mũi), phổi (xông hít), niêm mạc miệng (má), tai, trực tràng, âm đạo, bằng cách tiêm (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong khối u, trong bụng, v.v.) và các đường dùng khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ “việc đồng sử dụng” và thuật ngữ “đồng sử dụng” chỉ việc sử dụng ít nhất hai chất hoặc hai phương pháp trị liệu cho đối tượng và/hoặc vật liệu (ví dụ, thức ăn). Việc đồng sử dụng hai hoặc nhiều chất hoặc phương pháp trị liệu có thể là đồng thời, hoặc chất/trị liệu thứ nhất có thể được sử dụng trước chất/phương pháp trị liệu thứ hai.

Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” chỉ hoạt động cải thiện và/hoặc làm đảo ngược dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh (ví dụ, chứng ngộ độc nấm). Thuật ngữ “điều trị” chỉ cả hoạt động điều trị chữa trị và các hoạt động phòng bệnh hoặc ngăn ngừa. Ví dụ, đối tượng có thể có lợi từ việc điều trị bằng các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm các đối tượng đã mắc bệnh và/hoặc rối loạn (ví dụ, chứng ngộ độc nấm) cũng như các đối tượng trong đó bệnh và/hoặc rối loạn cần được ngăn ngừa (ví dụ, sử dụng điều trị phòng bệnh theo sáng chế).

Theo sáng chế, thuật ngữ “độc tố nấm” chỉ (các) hợp chất độc và/hoặc gây ung thư được sản xuất bởi nhiều loài nấm khác nhau.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chứng ngộ độc nấm” chỉ tình trạng trong đó độc tố nấm đi qua hàng rào đề kháng của cơ thể người hoặc động vật. Chứng ngộ độc nấm có thể được coi là một loại lây nhiễm hoặc bệnh và có thể có tác động có hại đến các đối tượng bị ngộ độc nấm này.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh”, “sự lây nhiễm” và “tình trạng hoặc đáp ứng bệnh lý” chỉ tình trạng, các dấu hiệu, và/hoặc triệu chứng có liên quan đến việc làm suy yếu trạng thái bình thường của đối tượng sống (ví dụ, người và/hoặc động vật) hoặc của bất kỳ cơ quan hoặc mô của đối tượng mà phá vỡ hoặc làm thay đổi hoạt động của các chức năng thông thường, và có thể đáp ứng với các yếu tố môi trường (như sự kém dinh dưỡng, các mối nguy hại phát sinh từ ngành công nghiệp, hoặc khí hậu, bao gồm chứng ngộ độc nấm), tác nhân gây nhiễm cụ thể (như sâu, amip, vi khuẩn, virus, prion, v.v.), đối với các khuyết tật cố hữu của sinh vật (như các dị thường về mặt di truyền khác nhau), hoặc dạng kết hợp của các yếu tố nêu trên và các yếu tố khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ “có nguy cơ mắc bệnh” chỉ đối tượng có khả năng mắc một bệnh cụ thể. Khuynh hướng này có thể là do di truyền (ví dụ, xu hướng mắc bệnh do di truyền cụ thể, như các rối loạn di truyền), hoặc do các yếu tố khác (ví dụ, tuổi, trọng lượng cơ thể, điều kiện môi trường, sự tiếp xúc với hợp chất gây hại (ví dụ, có mặt trong môi trường, v.v.)).

Theo sáng chế, thuật ngữ “mắc bệnh” chỉ đối tượng (ví dụ, động vật hoặc người) mắc bệnh cụ thể và không bị giới hạn ở các dấu hiệu hoặc triệu chứng, hoặc bệnh cụ thể bất kỳ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độc” chỉ (các) tác động bất kỳ gây hại, có hại, làm hại, hoặc theo cách khác tiêu cực đến đối tượng, tế bào, hoặc mô so với cùng tế bào hoặc mô trước khi tiếp xúc hoặc sử dụng độc tố/chất độc.

Theo sáng chế, thuật ngữ “được phẩm” chỉ hỗn hợp của hoạt chất (ví dụ, chế phẩm gồm MIP) với chất mang, trợ hoặc hoạt động, làm cho chế phẩm này đặc biệt thích hợp cho ứng dụng chẩn đoán hoặc trị liệu *in vitro*, *in vivo* hoặc *ex vivo*.

Theo sáng chế, thuật ngữ “được dụng” và thuật ngữ “chấp nhận được về mặt dược lý” chỉ thành phần gần như không tạo ra nhiều phản ứng bất lợi đã biết hơn so với các phản ứng có lợi đã biết.

Theo sáng chế, thuật ngữ “khả năng truy xuất nguồn gốc” chỉ tính chất của kết quả đo được hoặc giá trị tiêu chuẩn mà theo đó các kết quả này có thể phân tích trong mối tương quan so với các tham chiếu đã nêu, thường là tiêu chuẩn quốc gia hoặc quốc tế, qua chuỗi so sánh liên tục, tất cả đều có tính không chắc chắn đã nêu. Nó là ứng dụng thực tiễn của các khái niệm đo lường chung các phép xác định hóa học và cung cấp các thuật ngữ, khái niệm đường hướng để cũng đảm bảo rằng các phép đo trong hóa học phân tích tương đương nhau. Nó xác định các thực thể có thể nhận diện được duy nhất theo cách mà có thể thực hiện được. Biện pháp truy xuất nguồn gốc được sử dụng, trong số các biện pháp khác, để thiết lập mối tương quan giữa niên đại, vị trí, và/hoặc ứng dụng của đối tượng bằng cách xác định được ghi trong tài liệu.

Nhiều nhóm nấm khác nhau sản xuất ra độc tố nấm có tác động có hại đến sức khỏe động vật. Các độc tố này chủ yếu được sản xuất bởi giống nấm *Aspergillus*, *Fusarium* và *Penicillium* khi các điều kiện có lợi cho việc tạo thành của chúng chiếm ưu thế. Không có vùng nào trên thế giới không có độc tố nấm và tác động tiêu cực của chúng đến sức khỏe của người và động vật. Tác động tiêu cực của việc nhiễm độc tố nấm đến các nguồn cung cấp ngũ cốc và sức sản xuất của động vật là rất lớn và là nguy cơ thường trực đối với sức khỏe của con người. Các vùng khí hậu ẩm hơn có xu hướng dễ bị nhiễm aflatoxin và fumonisin cao hơn, trong khi các vùng lạnh hơn với độ ẩm cao hơn dễ bị nhiễm ocratoxin, sporidesmin, zearalenon, deoxynivalenol, độc tố T-2 và diacetoxycirpenol cao hơn.

Độc tố nấm là chất chuyển hoá thứ cấp được tạo ra ở các loại hạt ngũ cốc và cũng như ở thức ăn thô cho gia súc, trái cây, thức ăn và sản phẩm thức ăn cũng như trong môi trường (ví dụ, đất, nước và không khí mà chúng ngộ độc nấm mốc phải thông qua việc hít phải khí nhiễm độc tố, v.v.) nhiễm nấm và mốc. Độc tố nấm có tác động nguy hiểm đối với sức khỏe của người và động vật. Vì độc tố nấm có mặt trong toàn bộ chuỗi thức ăn nên độc tố nấm bị điều chỉnh bởi các quy định đưa ra giới hạn mức nhiễm độc tố quá mức của vật liệu là thức ăn cho gia súc/thức ăn và của môi trường dựa trên các tính chất độc học của các nhóm độc tố khác nhau (Ví dụ, xem: Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ocratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisin in products intended for animal feeding. Official Journal of European Union (2006/576/EC)).

Về khía cạnh này, nhiều cơ quan an toàn khác nhau trên thế giới đã thiết lập các giá trị giới hạn và quy trình kiểm soát để kiểm tra mức độ nhiễm độc tố. Các quy định này vẫn không hài hòa giữa các quốc gia và/hoặc lục địa và còn bị ảnh hưởng bởi yếu tố chính trị và kinh tế của khu vực địa lý cần xem xét. Các quy định này, khi có sẵn, được tìm thấy trên số lượng báo cáo không hạn chế liên quan đến các trường hợp ngộ độc cấp tính do dạng tinh thể của độc tố nấm gây ra trong trường hợp giả định. Khi hiểu biết về độc tố nấm ngày càng tăng thì tác động của việc tiếp xúc lâu dài, thời gian tiếp xúc và việc có mặt đồng thời của các độc tố nấm khác nhau nhiễm một cách tự nhiên vào vật liệu là thức ăn thô cho gia súc/thức ăn và môi trường có thể gây ra tác động gây độc hiệp đồng, có thể có vai trò quan trọng đối với tình trạng sức khỏe của động vật và người và độ nhạy cảm của các đối tượng này đối với nhiều dạng lây nhiễm khác nhau và theo đó, có vai trò quan trọng trạng thái miễn dịch. Trong hoàn cảnh này, cần tính đến các giải pháp để khống chế mức chất độc đi vào chuỗi thức ăn và có mặt trong môi trường mà chưa được quy định. Do đó, theo một số phương án của sáng chế, phương pháp kinh tế áp dụng trên quy mô lớn để tổng hợp chất hấp thụ ái lực cao để loại bỏ độc tố nấm (ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, toàn bộ họ thuộc nhóm chính hoặc phụ của phân tử độc tố nấm bao gồm: Aflatoxin: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin và các họ phụ, aflatoxicol; Trichothexen: deoxynivalenol, diacetoxycirpenol, monoacetoxycirpenol, scirpenetriol, độc tố T-2, độc tố HT-2, T-2 tetraol, fusarenon X, fusarin C, axit fusaric, fusarochromanon, aurofusarin, fusaproliferin, neosolaniol, nivalenol cùng với chất chuyển hoá và họ phụ; Fumonisin: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 và các họ phụ; Ocratoxin: ocratoxin A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$  và chất chuyển hoá; Zearalenon, zearalenol  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon, zearalanol  $\alpha$ ,  $\beta$ , zeranol và chất chuyển hoá; Patulin, gliotoxin, axit mycophenolic, moniliformin axit xyclopiazonic, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; axit penixillic, độc tố PR, roquefortin A, B, rubratoxin và các họ phụ; alkaloit nấm cựa gà: ergotamin, clavin alkaloit; Isofumigaclavin A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrem và các họ phụ; Phomopsin: Phomopsin A và các họ phụ; Verrucarín A, verruculogen và các họ phụ; Sporidesmin và các họ phụ; slaframin, swainsonin, axit tenuazoic, alternariol, và wortmannin).

Ocratoxin A (được viết tắt là OTA) là sản phẩm chuyển hoá của độc tố nấm chủ yếu được sản xuất bởi *Aspergillus ochraceus* và *Penicillium verrucosum* trong số các loài nấm mốc khác mà có thể sinh trưởng trên các thực phẩm được bảo quản không đúng cách (Ví dụ xem, Pfohl-Leskowicz A., and Manderville R.A., 2007. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 61-99), ngũ cốc bị nhiễm nấm, hạt cà phê (Ví dụ xem, O'Brien E., and Dietrich D.R. 2005. *Critical Reviews in Toxicology*, 35: 33-60), nho làm rượu vang (Ví dụ xem, Blesa J., Soriano J.M., Moltý J.C., Mănes J., 2006. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 46: 473-478), và độc tố này có thể di chuyển và nhiễm vào các chất lỏng và chất rắn được tiêu thụ bởi người (ví dụ, nước nho ép, rượu vang, bia, cà phê, chất chiết từ dừa, cũng như thức ăn và thức ăn thô cho gia súc mà sử dụng các loại hạt bị nhiễm và thịt và các sản phẩm phụ khác từ động vật (ví dụ, sữa, trứng, v.v.) mà tiêu thụ các loại hạt bị nhiễm hoặc theo cách khác tiếp xúc với độc tố nấm) có thể gây hại cho người. OTA là hợp chất gây ung thư (Nhóm 2B; Ví dụ xem, Clark H.A., and Snedeker S.M., 2006. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 9: 265-96), gây độc cho thận và có thể gây ức chế miễn dịch (Ví dụ xem, Al-Anati L., and Petzinger E., 2006. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 79-90; Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007 như được trích dẫn trên đây; O'Brien and Dietrich, 2005 như được trích dẫn trên đây). OTA có thể làm thay đổi chức năng thận của lợn bao gồm thay đổi quá trình bài tiết nước tiểu, và làm tăng quá trình bài tiết glucoza vào nước tiểu, mà đã được xác định là đặc điểm của bệnh thận ở lợn. Gà, gà tây và vịt con ăn các loại hạt chứa OTA có mức chuyển hóa thức ăn kém và khả năng sản xuất trứng giảm. Ở người, bệnh học OTA về mặt lâm sàng được mô tả là bệnh thận địa phương Balkan (Ví dụ xem, Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Grosso F., Nikolov I., Chernozemsky I.N., Castegnaro M., and Dragacci S., 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:2404-2410). Các nghiên cứu trên động vật cho thấy rằng do OTA tương tự với phenylalanin nên sau khi hấp thụ giai đoạn dạ dày-ruột, OTA có thể đi vào vòng tuần hoàn ruột gan và liên kết với phần albumin trong máu và như vậy, tiếp tục tồn tại trong mô động vật trong thời gian dài (Ví dụ xem, Creppy E.E., Kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., and Frayssinet C., 1985. *Toxicology Letters*, 28: 29-35.).

Nhóm độc tố nấm khác, epipolythiodioxopiperazin bao gồm gliotoxin, hyalodendrin, sirodesmin, chaetomin, chaetocin, verticillin, leptosin, emestrin, và sporidesmin được đặc biệt quan tâm. Sporidesmin thường có ảnh hưởng lớn về mặt kinh tế đến khả năng sản xuất động vật, nó được tìm thấy ở một số vùng cụ thể trên thế giới, chủ yếu ở ngành nông nghiệp đồng cỏ New Zealand (Ví dụ xem, Hohenboken W.D., Morris C.A., Munday R., De Nicolo G., Amyes N.C., Towers N.R. and Phua S.H., 2004. New Zealand journal of Agricultural Research, 47: 119-127) nhưng cũng đã được thông cáo ở quần đảo Azores thuộc Bồ Đào Nha. Sporidesmin là một phân tử kỵ nước được tổng hợp bởi *Pithomyces chartarum*, một loài gây chết một số loại cỏ nhất định. Độc tính của nó được tạo ra nhờ sự có mặt của cầu disulphua, các cầu disulphua này có thể làm bất hoạt các protein bằng cách phản ứng với nhóm thiol và tạo ra loại oxy dễ phản ứng (gốc superoxit, hydro peroxit, gốc hydroxyl). Bệnh lý nó gây ra đã được biết rõ hơn cả là eczema mặt, một tình trạng nhạy quang do gan gây ra do các tế bào biểu mô ống mật bị phá hủy, gây tích lũy phylloerythin (chất chuyển hoá của diệp lục) trong máu tuần hoàn và hấp thụ năng lượng từ ánh sáng mặt trời, và đặc biệt ảnh hưởng đến cừu, gia súc, ngựa, và nai. Các dấu hiệu lâm sàng bao gồm giảm khả năng sản xuất sữa, sút cân, nhạy quang, và chết (Ví dụ xem, Munday R., 1982. Chemo-Biological Interactions, 41: 361-374). Ngoài việc tiếp xúc với độc tố nấm trong thức ăn cho gia súc, thức ăn, cỏ (cho súc vật gặm) và các chất lỏng, động vật và người cũng tiếp xúc với, và có thể bị tác động bởi độc tố nấm theo nhiều cách khác. Ví dụ, động vật có thể tiếp xúc với độc tố nấm ngay trong ổ của mình, cá có thể trở nên tiếp xúc với độc tố nấm trong môi trường nước chúng sống, và thực thể hữu cơ khác cũng có thể bị ảnh hưởng bởi độc tố nấm.

Việc nhiễm độc tố nấm là không thể tránh được, và để làm giảm tác động tiêu cực của độc tố nấm, các vật liệu vô cơ như đất sét, bentonit và nhôm-silicat, hoặc than hoạt tính, có các tính chất hấp phụ đã biết, đã được sử dụng trong nông nghiệp (ví dụ, để trộn với thức ăn cho động vật và/hoặc các thành phần, dùng để bao nang hoặc dùng để lọc). Đất sét được sử dụng với lượng lớn sẽ càng hóa một số độc tố nấm trong chất lỏng (ví dụ, trong đường dạ dày-ruột của động vật và/hoặc người) và giúp giảm thiểu tác động gây độc của các độc tố nấm này (Ví dụ xem, Ramos A.J., and Hernandez E., 1997. Animal Feed Science and Technology, 65: 197-206;

Grant P.G., and Phillips T.D., 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 599-605). Tuy nhiên, đất sét cản trở quá trình hấp thụ nhiều chất dinh dưỡng có lợi quan trọng đối với động vật và người như vitamin, khoáng chất và axit amin, theo đó làm giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn. Hơn nữa, đất sét là vật liệu trơ cần được sử dụng (ví dụ, khi dùng cho động vật) với lượng lớn mới tạo ra tác dụng có lợi (ví dụ, làm giảm mức độ nhiễm độc tố nấm). Tuy nhiên, đất sét khi được dùng cho động vật với lượng lớn có thể gây ra tác động tiêu cực đối với môi trường khi đất sét được bài tiết ra từ động vật. Các chất hấp phụ độc tố nấm phổ rộng khác, mà không có tính đặc hiệu đối với độc tố nấm cụ thể, bao gồm các chất hấp phụ độc tố nấm được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,045,834, cũng đã được sử dụng đến.

Nhìn chung, các polyme được tạo khuôn phân tử (được viết tắt là MIP), là polyme được tạo thành trong điều kiện có mặt phân tử, khuôn, mà được chiết sau này, theo đó để lại các lỗ hổng bổ sung. Các polyme này có ái lực hóa học nhất định đối với phân tử ban đầu và có thể được sử dụng để chế tạo bộ cảm biến, xúc tác hoặc dùng cho các phương pháp phân tách. Vật liệu được tạo khuôn đầu tiên là dựa trên natri silicat. Ứng dụng đầu tiên trong thử nghiệm của vật liệu này là để phân tách các thuốc nhuộm vào năm 1949 (Ví dụ xem, Andersson H.S., and Nicholls I.A., 2001. In: *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry*, (Sellergren B., ed.), *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 1-19).

Sáng chế đề cập đến polyme được tạo khuôn phân tử (MIP). Cụ thể, sáng chế đề cập đến MIP tái sử dụng được, thân thiện với hệ sinh thái, phương pháp sản xuất chúng, phương pháp sử dụng chúng (ví dụ, để sàng hóa và/hoặc hấp phụ hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm)), và các phương pháp áp dụng ứng dụng này theo các cách khác nhau (ví dụ, để phát hiện sự có mặt của độc tố nấm cho mục đích truy xuất nguồn gốc và để loại bỏ độc tố nấm ra khỏi nguồn bị nhiễm). Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau bao gồm chế độ ăn uống, trị liệu, phòng bệnh, chế biến và sản xuất thực phẩm và đồ uống, lọc chất lỏng cũng như ứng dụng trong nghiên cứu và kiểm soát chất lượng.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất khuôn (ví dụ, dựa vào đó MIP được tổng hợp) tạo ra khả năng hút thấm cao và độ chọn lọc cho MIP

đối với hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm). Hợp chất khuôn có thể được loại bỏ ra khỏi MIP sau khi tổng hợp MIP (ví dụ, nhờ đó “hoạt hóa” MIP và cho phép nó liên kết với và hấp phụ hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm)). Như vậy, sáng chế đề xuất quy trình (ví dụ, quy trình tổng hợp) và vật liệu mà cho phép sản xuất khuôn và MIP trên quy mô lớn, mà không chỉ kinh tế (ví dụ, cho phép sản xuất trên quy mô lớn, có thể thực hiện được theo cách có thể đạt được hiệu quả kinh tế), mà còn sử dụng các chất phản ứng dễ dàng hơn so với khuôn MIP được sử dụng trước đây. Sáng chế còn đề xuất, theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, hợp chất khuôn, monome, chất tạo liên kết ngang cũng như MIP) trung tính về mặt sinh học (ví dụ, không có hại với môi trường). Ví dụ, theo một số phương án, các monome và chất liên kết ngang theo sáng chế có khả năng tạo thành phức chất thuận nghịch, có ái lực cao, với khuôn (ví dụ, với nhóm chức của khuôn), nhờ đó tạo ra MIP với ái lực cao đối với hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm) và tạo ra tác dụng có lợi đối với môi trường (ví dụ, tính chất hút thấm nước cao nhờ đó MIP hấp phụ nước nhiều hơn đến 10 lần khối lượng của chúng nhờ đó hỗ trợ quá trình hút nước của đất bằng cách giữ lại nước). Tương tự, theo một số phương án, sáng chế đề xuất MIP có ái lực cao đối với hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm) mà tái sử dụng được (ví dụ, mà có thể tách ra khỏi hợp chất đích và được tái sử dụng).

#### I. Khuôn được sử dụng để tổng hợp polyme được tạo khuôn phân tử (MIP)

Sơ đồ chung để tổng hợp MIP bao gồm các bước polyme hoá và liên kết ngang các monome với nhau trong điều kiện có mặt phân tử khuôn mà định hướng việc tạo thành vị trí liên kết trong mạng lưới MIP. Tính đặc hiệu hình học được tạo ra cho vị trí liên kết MIP trong các bước tương tự với việc sử dụng các bản sao chạm khắc bằng sáp để tạo ra các khuôn trong kỹ thuật điêu khắc đúc sáp chảy. Sau khi mạng lưới MIP được tạo thành, khuôn được loại bỏ sao cho MIP không có mặt khuôn có sẵn để càng hóa hợp chất đích. Theo một số phương án, việc loại bỏ khuôn được thực hiện thông qua một loạt bước rửa (ví dụ, sử dụng các bước rửa được mô tả trong phần IV dưới đây).

Theo một số phương án, hợp chất đích được sử dụng làm khuôn. Tuy nhiên, điều này làm nảy sinh vấn đề tiềm ẩn là việc rò rỉ khuôn, hoặc rò rỉ dần khuôn còn dư vào mẫu. Trong các ứng dụng phân tích, việc việc rò rỉ khuôn làm cho giá trị nền cao, gây sai số nhiều, trong khi trong các ứng dụng không để phân tích (ví dụ, sự

càng hóa), việc rò rỉ khuôn có thể làm hỏng kết quả càng hóa do thực tế là phân tử đích đã được đưa vào mẫu. Ngoài ra, ví dụ khi tổng hợp MIP được định hướng theo đích có tính chất gây độc và/hoặc gây ung thư (ví dụ, độc tố nấm), thì việc sử dụng phân tử khuôn ít độc hại hơn trong quá trình tổng hợp MIP có thể được mong muốn xét theo quan điểm an toàn cho cá nhân sử dụng cũng như để giảm thiểu chất thải độc hại. Theo phương án ưu tiên, phân tử khuôn là chất không độc hại và/hoặc dễ phân hủy, và do vậy, không tạo ra nguy cơ đối với sức khỏe của đối tượng hoặc môi trường. Theo phương án ưu tiên, khuôn tái sử dụng được khi giải phóng khỏi MIP. Theo phương án ưu tiên, khuôn có thể được sản xuất với lượng lớn hơn và theo cách an toàn hơn so với độc tố nấm có thể được tạo ra.

Do vậy, theo một số phương án, khuôn được sử dụng để tổng hợp MIP có thể là hợp chất giống như hợp chất đích mong muốn. Theo một số phương án, khuôn được sử dụng để tổng hợp MIP có thể khác với hợp chất đích mong muốn. Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, hợp chất đích mong muốn là độc tố nấm. Ví dụ về độc tố nấm bao gồm nhưng không giới hạn ở Aflatoxin: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin và các họ phụ, aflatoxicol; Trichothexen: deoxynivalenol, diacetoxycirpenol, monoacetoxycirpenol, scirpenetriol, độc tố T-2, độc tố HT-2, T-2 tetraol, fusarenol X, fusarin C, axit fusaric, fusarochromanone, aurofusarin, fusaproliferin, neosoloniol, nivalenol và chất chuyển hóa và họ phụ cũng như các thể tiếp hợp; Fumonisin: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 và các họ phụ cũng như các thể tiếp hợp; Ocratoxin: ocratoxin A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$  và chất chuyển hóa; Zearalenone, zearalenol,  $\alpha$ - và  $\beta$ -zearalanone, zearalanol,  $\alpha$ - và  $\beta$ -zeranol và chất chuyển hóa cũng như các thể tiếp hợp; Patulin, axit mycophenolic, moniliformin, axit xyclopiazonic, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; gliotoxin, sporidesmin, hyalodendrin, sirodesmin, chaetomin, chaetocin, verticillin, leptosin, emestrin, và các họ phụ; axit penicillanic, độc tố PR, roquefortin A, B, rubratoxin và các họ phụ; alkaloid nấm cựa gà: ergotamin, ergocryptin, ergovalin, ergocristin, ergometrin, ergosin, ergonin, ergocornin, ergin, lysergol, axit lysergic, và epimeclavin alkaloid; Isofumigaclavin A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrem và các họ phụ; Phomopsis: Phomopsis A và các họ phụ; Verrucaridin A, verruculogen và các họ phụ; slaframin, swainsonin, axit tenuazonic, alternariol, và wortmannin. Theo phương án nhất định, hợp chất đích là OTA, sporidesmin và alkaloid nấm cựa gà.

Theo một số phương án, việc thiết kế và/hoặc xác định hợp chất khuôn không phải đích được thực hiện bằng cách phân tích cẩn thận cấu trúc của phân tử đích, đơn giản hóa cấu trúc, và xác định các đặc điểm về mặt cấu trúc và các nhóm chức quan trọng để tạo ra vị trí liên kết MIP hữu hiệu. Các phương pháp để đơn giản hóa cấu trúc đã được biết trong lĩnh vực (Ví dụ xem, Baggiani C., Giraudi G., and Vanni A., 2002. *Bioconjugation*, 10: 389-394; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, việc hiểu cơ chế là không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế nhưng cần xem xét các đặc điểm về mặt cấu trúc khi thiết kế khuôn bao gồm nhưng không giới hạn ở, tính không đối xứng, tính phẳng, việc loại bỏ các cấu trúc tạo ra các tính chất không mong muốn cho phân tử (ví dụ, loại bỏ các thành phần quyết định độc tính của phân tử), và/hoặc việc có sẵn bề mặt thích hợp để tiếp cận cho dung môi, bề mặt thế tĩnh điện, và/hoặc bề mặt ưa chất béo-ưa nước của phân tử khuôn và tương tác tiềm ẩn của nó với các monome và chất liên kết ngang cũng như tính đơn giản của quy trình tổng hợp khuôn. Theo một số phương án, kỹ thuật nhận biết hình dạng siêu nhanh được sử dụng để sàng lọc theo cách thông thường các hợp chất giống nhất với phân tử, không chỉ dựa theo cấu trúc hai chiều rõ nhất, mà ưu tiên một trong số mẫu có tính phân biệt rõ nhất, nghĩa là, hình dạng phân tử ba chiều (xem, ví dụ, Balletser P., and Richards W.G., 2007. *Proceedings of Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 463: 1307-1321).

Theo một ví dụ không giới hạn, khuôn cho Ocratoxin A là N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin, như thể hiện trên Fig.1.

Theo một ví dụ không giới hạn về phương pháp tổng hợp N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin, quá trình tổng hợp được bắt đầu bằng phản ứng của axit 3,5-diclosalixylic với anhydrit axetic để thu được axit 2-axetoxy-3,5-diclobenzoic, sau đó axit này được chuyển hóa thành clorua của axit nhờ hoạt động của oxalyl clorua. Sau đó, clorua của axit 2-axetoxy-3,5-diclobenzoic được phản ứng *in situ* với phenylalanin etyl este hydroclorua, trong điều kiện có mặt trietylamin, để tạo thành etyl este của N-(2-axetoxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin. Bước cuối cùng của phương pháp tổng hợp là thủy phân thêm và có đặc hiệu cao đối với cả hai chức este của etyl este của N-(2-axetoxy-3,5-diclo

benzoyl)-L-phenylalanin đã thu được khuôn OTA, N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin (I) với hiệu suất 98%. Phương pháp tổng hợp này được tóm tắt trên Fig.2.

Như vậy, sáng chế đề xuất quy trình và vật liệu để tổng hợp khuôn (ví dụ, khuôn OTA) mà có thể mở rộng quy mô đến số lượng lớn theo cách có thể đạt được tính kinh tế.

## II. Các monome và chất liên kết ngang được sử dụng để polyme hoá MIP

Việc lựa chọn các monome được sử dụng trong quá trình tổng hợp MIP có tính đến các đặc điểm cấu trúc của phân tử khuôn để đánh giá monome hoặc hỗn hợp của các monome nào là thích hợp nhất để tạo ra các tương tác (ví dụ, cộng hóa trị, không cộng hóa trị, ion, liên kết hydro, tương tác kỵ nước, tương tác Van der Waals) với khuôn. Theo một ví dụ không giới hạn, các đặc điểm cấu trúc quan trọng của khuôn OTA (I) được mô tả ở đây (ví dụ, N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin) bao gồm (i) hai nhóm chức axit (-OH và -CO<sub>2</sub>H); (ii) một nhóm peptit phân cực mạnh (-NHCO-); (iii) và một vài đoạn hydrocacbon có độ phân cực thấp của cấu trúc khuôn (ví dụ, các đoạn này đều có khả năng tạo thành phức chất với các monome và phân tử chất liên kết ngang). Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 10/181435, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn, mô tả các monome chức năng MIP và các phương pháp chọn monome sử dụng máy tính (xem, ví dụ, Baggiani et al., 2002. như được trích dẫn trên đây).

Nhóm monome và các monome đặc hiệu (ví dụ, được sử dụng trong phương pháp tổng hợp MIP theo sáng chế) bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các nhóm sau và dẫn xuất của chúng: axit acrylic và dẫn xuất (ví dụ, axit 2-bromacrylic, acryloyl clorua, N-acryloyl tyrosin, N-acryoyl pyrrolidinon, axit trans-2-(3-pyridyl)-acrylic), acrylat (ví dụ, alkyl acrylat, allyl acrylat, hydroxypropyl acrylat), axit metacrylic và dẫn xuất (ví dụ, axit itaconic, axit 2-(triflometyl) propenoic), metacrylat (ví dụ, methyl metacrylat, hydroxyetyl metacrylat, 2-hydroxyetyl metacrylat, muối natri 3-sulfopropyl metacrylat, etylen glycol monometacrylat), styren (ví dụ, (2, 3 và 4)-aminostyren, axit styren-4-sulfonic, 3-nitrostyren, 4-ethystyren), vinyl (ví dụ, vinyl clorofomat, axit 4-vinylbenzoic, 4-vinylbenzaldehyt, vinyl imidazol, 4-vinylphenol, 4-vinylamin, acrolein), vinylpyridin (ví dụ, (2, 3, và/hoặc 4)-vinylpyridin, 3-buten

1,2-diol), axit boronic (ví dụ, axit 4-vinylboronic), axit sulfonic (ví dụ, axit 4-vinylsulfonic, axit acrylamido-2-metyl-1-propan-sulphonic), chất tạo chelat kim loại (ví dụ, axit styren iminodiacetic), acrylamit và dẫn xuất (ví dụ, N-metyl acrylamit, metacrylamit và dẫn xuất (ví dụ, N,N-dimetyl acrylamit, N-(3-aminopropyl) metacrylamit), alken (ví dụ, axit 4-pentenoic, 3-clo-1-phenyl-1-propen) anhydrit của axit (meth)acrylic và dẫn xuất (ví dụ, anhydrit metacrylic), monome chứa silic (ví dụ, (3-metacryloxypropyl) trimetoxysilan, tetrametyldisiloxan), polyen (ví dụ, isopren, 3-hydroxy-3,7,11-trimetyl-1,6,10-dodexatrien), azit (ví dụ, axit 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic), thiol (ví dụ, allyl mercaptan). Urethan, cacbonat và epoxy có nhóm tận cùng là acrylat hoặc theo cách khác chưa no cũng có thể sử dụng trong các phương án theo sáng chế, các monome gốc silic cũng vậy.

Theo các phương án ưu tiên, các monome và chất liên kết ngang được sử dụng để tổng hợp MIP được định hướng theo khuôn cho OTA (tức là, N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin) gồm 2-vinylpyridin, 2-hydroxyetyl metacrylat và/hoặc etylen glycol dimetacrylat. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, 2-vinylpyridin tạo thành liên kết ion với nhóm axit của khuôn, và chứa liên kết vinyl ở gần nguyên tử nitơ bazơ của vòng pyridin. Tương tác của khuôn với 2-vinylpyridin thúc đẩy sự tạo thành polyme ở rất gần phân tử khuôn và cho phép MIP liên kết chặt chẽ với OTA trong MIP (ví dụ, sau khi hợp chất khuôn được lấy ra và MIP được để tương tác với phân tử OTA đích). Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, nhóm hydroxyl của monome 2-hydroxyetyl-metacrylat tạo thành liên kết hydro bổ sung cho liên kết peptit phân cực cao của khuôn. Chất phản ứng bổ sung là etylen glycol dimetacrylat. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, etylen glycol dimetacrylat được sử dụng theo một số phương án làm chất liên kết ngang (xem dưới đây), làm dieste chưa no mà tương tác với nhóm có độ phân cực thấp có mặt trong phân tử khuôn OTA. Theo một số phương án, các loại monome riêng rẽ được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với các loại monome khác.

Nếu được sử dụng, chất hoặc các chất liên kết ngang sẽ tốt hơn nếu là một hoặc một vài hợp chất dạng polyme hoặc oligome, hoặc hợp chất mà tạo ra sự phân cắt trong các điều kiện cụ thể. Chất liên kết ngang làm tăng độ cứng cho hợp chất dạng polyme là đã biết với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, acrylat hai, ba, bốn và năm chức, metacrylat, acrylamit, vinyl, allyl, và styren. Ví dụ cụ thể về chất liên kết ngang bao gồm nhưng không giới hạn ở p-divinylbenzen, etylen glycol dimetacrylat (được viết tắt là EGDMA), tetrametylen dimetacrylat (được viết tắt là TDMA), N,N'-metylen bisacrylamit (được viết tắt là MDAA), N,N'-1,3-phenylenbis(2-metyl-2-propenamit) (PDBMP), 2,6-bisacryloylamidopyridin, 1,4-diacryloyl piperazin (được viết tắt là DAP), 1,4-phenylen diacrylamit, và N,O-bisacryloyl-L-phenylalaninol. Ví dụ về chất liên kết ngang thuận nghịch, có khả năng phân cắt được bao gồm, nhưng không giới hạn ở, N,N'-bis-(acryloyl) xystamin, N,N-diallyltartardiamit, N,N-(1,2-dihydroxyetylen) bisacrylamit, N1-((E)-1-(4-vinylphenyl) metyliden)-4-vinylanilen, allyl disulfua, và bis(2-metacryloyloxyetyl))disulfua. Theo các phương án ưu tiên, etylen glycol dimetacrylat được sử dụng làm chất liên kết ngang. Mặc dù monome liên kết ngang được ưu tiên là etylen glycol dimetacrylat nhưng các phương án theo sáng chế không bị giới hạn ở chất này, và các monome liên kết ngang khác có thể được sử dụng, như, divinylbenzen và trimetylolpropan trimetacrylat (được viết tắt là TRIM).

Tỷ lệ bất kỳ của các monome đơn giản so với chất liên kết ngang có thể được sử dụng mà tạo ra cấu trúc MIP có tính nguyên vẹn thích hợp, ví dụ, mà có thể được sử dụng trong ứng dụng sau cùng (ví dụ, trong sản phẩm thức ăn hoặc thức ăn cho gia súc, trong nước được dự định dùng trong ứng dụng nuôi trồng thủy sản, *in vivo*, v.v.). Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn các tỷ lệ thích hợp của các monome để thu được độ nguyên vẹn cấu trúc mong muốn, mà có liên quan mật thiết với bản chất và cấu trúc của phân tử đích và bản chất và cấu trúc của khuôn sử dụng.

Trong trường hợp hợp chất dạng polyme hoặc oligome được sử dụng *in vivo* (ví dụ, để làm các chất trị liệu hoặc chẩn đoán, hoặc để làm các thành phần cang hóa có thể tiêu thụ được trong thức ăn cho động vật hoặc thực phẩm cho người), điều quan trọng là lựa chọn các monome không độc và ổn định và có độ hòa tan *in*

*vivo* thích hợp. Ví dụ được ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, acrylamit và metacrylat. Theo cách khác, polyme có thể được xử lý sau khi polyme hoá để tăng cường khả năng hòa tan của khuôn, ví dụ, bằng phản ứng với chất phản ứng vô cơ hoặc hữu cơ thích hợp.

Các phương pháp polyme hoá khác nhau có thể được sử dụng bao gồm polyme hoá gốc tự do, cation, và anion. Điều kiện polyme hóa được chọn và được nêu trong sáng chế không tác động bất lợi đến cấu dạng cho hoạt tính của hợp chất mà đối với nó hợp chất dạng polyme bổ sung được tạo ra. Trong các phương án được đặc biệt ưu tiên, phương pháp polyme hoá kết tủa gốc tự do được sử dụng (xem Phần III dưới đây).

Ngoài ra, quá trình polyme hoá MIP thường được bắt đầu bằng việc bổ sung chất khơi mào. Chất khơi mào bao gồm nhưng không giới hạn ở, azo-bisisobutyronitril (được viết tắt là AIBN), azo-bisdimethylvaleronitril (được viết tắt là ABDV), dimethylaxetal của benzil, benzoylperoxit (được viết tắt là BPO), và axit 4,4'-azo(4-xyanovaleic). Theo các phương án ưu tiên, chất khơi mào là azo-bisisobutyronitril.

Theo các phương án ưu tiên, các monome, chất liên kết ngang, và/hoặc MIP có độ an toàn cao và/hoặc các tính chất của môi trường như độc tính được làm giảm hoặc không có độc tính và khả năng hút ẩm và giữ nước cao. Theo các phương án ưu tiên, MIP có thể tái sử dụng được và có thể được tạo ra/ sản xuất một cách kinh tế.

### III. Các dung môi được sử dụng để tổng hợp MIP

Việc lựa chọn dung môi/ hỗn hợp dung môi để thực hiện phản ứng polyme hoá có ảnh hưởng lớn đến phạm vi hoạt động, độ chọn lọc và ái lực liên kết đặc hiệu của MIP đối với hợp chất đích của nó. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, độ xốp sẽ được tăng cường hoặc được tạo ra bằng dung môi tạo xốp hoặc hỗn hợp dung môi có các tính chất sau: hòa tan trong hỗn hợp monome, không tham gia phản ứng polyme hoá và không hòa tan polyme (MIP) được tạo thành. Dung môi tạo xốp thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hydrocacbon thơm, như toluen, xylen, etylbenzen và diethylbenzen; dung môi không phân cực,

như xyclohexan; các hydrocacbon no, như hexan, heptan, octan và decan; rượu, như rượu isopropylic và isoamylic; các hydrocacbon béo đã halogen hóa, như diclometan, dicloetan và tricloetan; este béo hoặc thơm, như etyl axetat, butyl axetat, dimethylphtalat. Theo các phương án ưu tiên, dung môi hydrocacbon thơm được sử dụng. Trong các phương án ưu tiên, toluen được sử dụng một mình. Theo một số phương án, hỗn hợp của toluen với dung môi khác được sử dụng. Theo một số phương án, toluen được sử dụng kết hợp với xyclohexan. Dung môi tạo xốp có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với hai hoặc nhiều dung môi. Lượng dung môi tạo xốp được bổ sung có thể thay đổi từ khoảng 10% đến 500% theo khối lượng dựa trên tổng lượng của các monome. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, và việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế, dung môi phân cực (ví dụ, nước, axetonitril) phá vỡ các phức chất khó phân cắt của các monome và khuôn, nhờ đó làm giảm tính đặc hiệu MIP để liên kết phân tử đích (ví dụ, như trong toluen, v.v.).

Dung môi hoặc hỗn hợp dung môi dùng làm môi trường để tổng hợp MIP cũng tác động đến tính chất trương nở của MIP và kích thước của các lỗ bên trong mạng lưới MIP ba chiều. Theo phương án nhất định, dung môi phân cực như axetonitril được sử dụng làm dung môi hoặc đồng dung môi để polyme hoá MIP khi mong muốn tăng sự trương nở MIP và tăng kích cỡ lỗ MIP; theo cách khác, dung môi này sẽ không được sử dụng nếu không muốn tăng mức độ trương nở của MIP và kích cỡ lỗ trong MIP (ví dụ, khi MIP được dự định để sử dụng làm cột sắc ký trong đó việc trương nở có thể làm tốc độ dòng và làm xáo trộn quá trình rửa giải các chất phân tích và khả năng thực hiện của thiết bị HPLC).

Việc lựa chọn đúng đắn hệ dung môi có thể ảnh hưởng trực tiếp đến kích thước lỗ trong MIP. Trong các ví dụ không giới hạn, trong quá trình tổng hợp MIP được định hướng đến khuôn của OTA, các hạt nhỏ nhất (1-20  $\mu\text{m}$ ) được tạo thành trong các dung môi có độ phân cực thấp như xyclohexan và/hoặc toluen, trong khi các hạt đồng nhất có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn (10-170  $\mu\text{m}$ ) được tạo thành trong dung môi phân cực như axetonitril hoặc nước. Ngoài ra, ở nồng độ cao của các monome, phản ứng polyme hoá tạo ra các cụm MIP lớn mà được phân tán một cách dễ dàng bằng cách nghiền, mà không tạo ra các hạt rất mịn như xuất hiện trong quá trình nghiền MIP nguyên khối (xem phần bàn luận chi tiết trong Phần IV dưới

đây). Các hạt rất mịn này có thể không được mong muốn trong các ứng dụng trong đó, ví dụ, MIP được dự định để sử dụng làm nhựa nhồi cột (trong đó các hạt mịn này có thể làm giảm tốc độ dòng) hoặc trong các ứng dụng mà sự có mặt của các hạt nhỏ này gây cản trở hoặc khiến cho việc thu gom MIP trong quá trình ly tâm hoặc lọc trở lên phức tạp hoặc làm xáo trộn quá trình giữ lại MIP thích hợp trong trường hợp lọc, mà vì vậy được chi phối bởi cỡ lỗ của thiết bị lọc lỗ thích hợp mà kết hợp MIP, nếu thiết bị lọc phải bảo toàn lượng MIP đã được bao kín. Các cụm MIP đã được phân tán có thể được sàng để tạo ra sản phẩm có kích thước đồng nhất, xác định. Do vậy, việc lựa chọn dung môi polyme hoá, nồng độ monome, và các phương pháp xử lý vật lý có thể được chọn để tạo ra hiệu suất tối ưu của MIP với cỡ lỗ và cỡ hạt mong muốn, trong khi tránh được sự tạo thành của các hạt mịn.

Việc lựa chọn hệ dung môi quy định dạng vật lý của MIP được tạo thành trong quá trình polyme hoá. Ví dụ, một số hệ dung môi (bao gồm nhưng không giới hạn ở dung môi có độ phân cực thấp như xyclohexan và/hoặc toluen) tạo ra, như nêu trên đây, các cụm MIP rắn trong quá trình được gọi là polyme hoá kết tủa. Các hệ dung môi khác (bao gồm nhưng không giới hạn ở dung môi phân cực như rượu polyvinyllic trong nước) thúc đẩy các quy trình đặc trưng về mặt động học được gọi là polyme hoá nhũ tương (Vivaldo-Lima E., Wood P.E., Hamielec A.E., 1997. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 36: 939-965). Nhìn chung, bản chất của quy trình polyme hoá ảnh hưởng đến cả dạng vật lý của mạng lưới MIP và sự dễ xử lý tiếp của mạng lưới này (ví dụ, nhu cầu nghiền; độ đồng đều của cỡ hạt; hiệu suất; dễ trao đổi chất đệm hoặc dung môi; độ ổn định). Các quy trình polyme hoá này được mô tả trong tài liệu: Yan H., and Ho Row K., 2006. *International Journal of Molecular Science*, 7: 155-178; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo các phương án ưu tiên, quá trình polyme hoá kết tủa được sử dụng. Theo phương án nhất định, quá trình polyme hoá kết tủa tạo ra sản phẩm MIP dưới dạng bột có cỡ hạt đồng đều và dễ xử lý. Để so sánh, các phương pháp polyme hoá khác bao gồm nhưng không giới hạn ở phương pháp polyme hoá khối có thể tạo ra khối MIP lớn mà cần phải được nghiền vụn trước khi xử lý hoặc sử dụng tiếp, và dẫn tới cỡ hạt không đều và do đó tạo ra hiệu quả thấp hơn.

#### IV. Phương pháp loại bỏ khuôn ra khỏi MIP sau quá trình tổng hợp MIP và xử lý vật lý MIP

Kỹ thuật được sử dụng để loại bỏ khuôn ra khỏi MIP vừa tổng hợp thường được phân loại dựa vào bản chất của tương tác khuôn-MIP. Ví dụ, khi liên kết cộng hóa trị tạo ra giữa khuôn và mạng lưới MIP, thì cần phân cắt hóa học khuôn ra khỏi MIP. Trái lại, khi tương tác giữa khuôn và mạng lưới MIP là không cộng hóa trị, thì có thể chỉ cần chiết bằng dung môi là đã có thể loại bỏ được khuôn (xem, ví dụ, Yan H., and Ho Row K., 2006 như được trích dẫn trên đây và được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn; Sellergren B., 2001. The non-covalent approach to molecular imprinting. In: *Molecularly imprinted polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry*, (Sellergren B., ed.), *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 113-184). Việc xử lý MIP sau khi tổng hợp cũng có thể được gọi là quá trình hoạt hóa MIP. Theo các phương án ưu tiên, bước thứ nhất của quá trình hoạt hóa MIP bao gồm lắng gạn và sau đó, làm bay hơi (tái tuần hoàn) dung môi từ vật liệu MIP, trong điều kiện áp suất hơi giảm (ví dụ, sử dụng hệ thống cô quay). Bước thứ hai bao gồm bước nghiền các hạt MIP để tạo thành các hạt có cỡ hạt nhỏ hơn (ví dụ, sử dụng cối và chày hoặc thiết bị nghiền). Bước thứ ba bao gồm rửa nhiều lần các hạt MIP, ví dụ, bằng natri hydroxit 0,2 % khối lượng/thể tích. Theo các phương án trong đó OTA MIP được tổng hợp, mức độ kỹ lưỡng của việc rửa có thể được theo dõi cho đến khi thu được kết quả thử bằng dung dịch  $\text{FeCl}_3$  để phát hiện khuôn cho kết quả âm tính (xem Ví dụ 2 đến Ví dụ 4). Theo một số phương án, tiến hành một lần rửa bằng 1% axit axetic và một lần rửa bằng nước sau đó là làm khô sản phẩm MIP cuối cùng (ví dụ, ở nhiệt độ  $80^\circ\text{C}$  trong lò sấy trong khoảng thời gian 6-8 giờ) cho đến khi tất cả các vết của dung môi đều được loại bỏ. Cuối cùng, các hạt MIP có thể được sàng để tạo ra sản phẩm có cỡ hạt xác định. Theo các phương án ưu tiên, dạng vật lý của MIP không yêu cầu việc nghiền kỹ trước khi sử dụng, ví dụ, MIP không tạo thành các khối nguyên khối mà cần phải đập vụn hoặc nghiền để phân tán. Theo các phương án ưu tiên, phần lớn MIP tạo thành khối cầu mà sẽ tạo thành bột trong khi làm khô.

Theo các phương án ưu tiên, thông qua bước rửa ít nhất 95% phân tử khuôn được loại bỏ ra khỏi mạng lưới MIP. Theo các phương án được đặc biệt ưu tiên,

thông qua bước rửa được loại bỏ ít nhất 99% phân tử khuôn được loại bỏ ra khỏi mạng lưới MIP. Theo các phương án được ưu tiên nhất, thông qua bước rửa ít nhất 99,9% phân tử khuôn được loại bỏ ra khỏi mạng lưới MIP.

#### V. Ứng dụng chế phẩm MIP

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau bao gồm chế độ ăn uống, trị liệu, phòng bệnh, chế biến và sản xuất thực phẩm và đồ uống, cũng như ứng dụng trong nghiên cứu và kiểm soát chất lượng. Ví dụ, theo một số phương án, các khuôn tổng hợp (ví dụ, được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây) được sử dụng để tổng hợp MIP. Sáng chế không bị giới hạn ở khuôn tổng hợp cụ thể bất kỳ và/hoặc MIP được tổng hợp. Thực vậy, nhiều khuôn tổng hợp có thể được tạo ra và được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khuôn OTA (ví dụ, N-(3,5-diclo-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanin, xem Ví dụ 1), (các) khuôn đối với (các) aflatoxin, khuôn trichothecen (ví dụ, khuôn rượu sesquiterpen (ví dụ, deoxynivalenol (khuôn DON)), khuôn zearalenon, khuôn sporidesmin, khuôn sterigmatocystin, khuôn fumonisin, khuôn patulin, khuôn citrinin, và/hoặc khuôn nấm cựa gà có liên quan đến nội ký sinh thực vật. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp để sản xuất khuôn tổng hợp (ví dụ, để sử dụng trong tổng hợp MIP OTA) mà bao gồm các nhóm chức bên ngoài giống với độc tố nấm (ví dụ, trong đó khuôn được sử dụng để tạo ra MIP trong quy trình theo sáng chế và sau đó được loại bỏ ra khỏi đó, MIP thể hiện ái lực cao đối với độc tố nấm giống như các nhóm chức bên ngoài), trong đó độc tố nấm được chọn từ nhóm gồm axetoxycirpenediol, axetyldeoxynivalenol, axetylnivalenol, axetylneosolaniol, độc tố axetyl T-2, được mở rộng đến tất cả các aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 và G2, aflatrem, axit altenuic, alternariol, austdiol, austamit, austoxystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolit, brevianamit, butenolit, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, axit xyclopiazonic, deaxetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diaxetat, deoxynivalenol monoaxetat, diaxetoxycirpenol, destruxin B, emestrin, enniatin, được mở rộng đến tất cả các độc tố alkaloit nấm cựa gà và nội ký sinh thực vật như ergin, ergocornin, ergocristin, ergocryptin, ergometrin, ergonin, ergosin, ergotamin, ergovalin, lysergol, axit lysergic, và các epime có liên quan, fructigenin +1, fumagilin, fumonisin, fumonisin

A1, A2, B1 và B2 và B3, fusarenon X, fusarochromanon, axit fusaric, fusarin, gliotoxin, độc tố HT-2, hyalodendrin, ipomeanin, islanditoxin, isofumigaclavin A và B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzin, moniliformin, monoaxetoxycirpenol, axit mycophenolic, neosolaniol, nivalenol, độc tố NT-1, độc tố NT-2, được mở rộng đến tất cả các ocratoxin, oosporein, axit oxalic, paspalitrem A và B, patulin, axit penixillic, penitrem, phomopsin, độc tố PR, roridin E, roquefortin A và B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxin, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframin, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonin, độc tố T-1, độc tố T-2, axit tenuazoic, triaxetoxycirpendiol được mở rộng đến tất cả các trichothexen, trichodermin, trichothecin, trichoverrin, trichoverrol, tryptoquivalen, verrucarín, verruculogen, verticillin, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenol, zearalanon, zearalenon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zearalanon,  $\alpha$ ,  $\beta$ , zeranol và các họ phụ và/hoặc dẫn xuất của chúng, và/hoặc thể tiếp hợp. Theo phương án nhất định, hợp chất đích là OTA, sporidesmin, hoặc alkaloit nấm cựa gà.

Tương tự, nhiều MIP có thể được tạo ra và được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, MIP được tạo ra bằng cách sử dụng bất kỳ một trong số khuôn tổng hợp đã được đề cập trên đây hoặc phân tử hữu cơ bất kỳ khác làm khuôn (ví dụ, chất dinh dưỡng như vitamin, thuốc, chất kháng sinh, tạp chất, hormon, enzym, protein, v.v.).

MIP được mô tả ở đây được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau. Ví dụ, theo một số phương án, MIP được sử dụng để tinh chế các chất lỏng. Ví dụ, theo một số phương án, MIP được sử dụng để loại bỏ một cách có chọn lọc hợp chất đích (ví dụ, một hoặc nhiều độc tố nấm) ra khỏi chất lỏng. Sáng chế không bị giới hạn bởi hợp chất đích (ví dụ, một hoặc nhiều độc tố nấm) được loại ra khỏi chất lỏng. Thực vậy, nhiều hợp chất đích có thể được loại bỏ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, độc tố nấm được mô tả ở đây. Tương tự, sáng chế không bị giới hạn bởi loại chất lỏng từ đó hợp chất đích được loại ra. Thực vậy, nhiều dung dịch lỏng khác nhau có thể có một hoặc nhiều hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm) được loại bỏ ra khỏi đó (ví dụ, bằng cách sử dụng một hoặc nhiều loại MIP khác nhau cho dung dịch) bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồ uống (ví dụ, được tiêu dùng bởi con người (ví dụ, nước ép trái cây, rượu vang (ví dụ, rượu vang trắng, rượu vang đỏ, v.v.), nước, bia, chè,

cà phê, v.v.)), nước (ví dụ, được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, nước uống, v.v.), các chất lỏng được sử dụng để sản xuất thực phẩm (ví dụ, thực phẩm cho người, động vật), các dịch sinh học (ví dụ, máu, dịch dạ cỏ, dịch dạ dày, v.v.), v.v..

Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây tạo ra MIP mà loại bỏ một cách chọn lọc hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm) ra khỏi chất lỏng. Chất lỏng có thể là đồ uống, nước, mẫu sinh học, nguồn nước có thể uống được, máu, chất lỏng của dạ cỏ, hoặc loại chất lỏng khác có chứa hợp chất đích. Ngoài ra, hợp chất đích có thể được loại ra khỏi các loại chất lỏng khác. Theo một số phương án, MIP mô tả ở đây được tiếp xúc với (ví dụ, được trộn với) chất lỏng trong khoảng thời gian đủ dài mà cho phép MIP tiếp xúc với và liên kết với hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm). Mặc dù việc hiểu cơ chế không phải là điều kiện bắt buộc để có thể thực hiện sáng chế và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, theo một số phương án, sau khi chất lỏng được cho phép tương tác với MIP, các lỗ hổng tạo phức/liên kết được chứa trong MIP (ví dụ, các lỗ hổng vẫn còn sau khi phân tử khuôn loại ra khỏi MIP) liên kết hợp chất đích trong quá trình tiếp xúc, loại bỏ một cách hiệu quả hợp chất đích ra khỏi chất lỏng. Sau đó, chất lỏng có thể được xử lý tiếp, được đóng gói, hoặc được sản xuất sẵn để tiêu thụ (ví dụ, để người tiêu thụ, để động vật tiêu thụ, hoặc cho môi trường sống của động vật). Theo một số phương án, MIP được tạo ra và/hoặc được đề xuất theo sáng chế có cấu trúc cứng chống lại lực vật lý và hóa học có liên quan đến quy trình loại bỏ/càng hóa. Ví dụ, trong phương án ưu tiên, MIP được đề xuất theo sáng chế liên kết một cách có chọn lọc với hợp chất đích, nhờ đó loại bỏ hợp chất đích ra khỏi chất (ví dụ, chất lỏng, bề mặt chất rắn, dịch sinh học (ví dụ, máu, chất lỏng của dạ cỏ, v.v.), cần thiết để duy trì sự sống (ví dụ, không khí hoặc môi trường nuôi trồng thủy sản), v.v.), và vẫn giữ được sự kết hợp với hợp chất đích khi phức chất MIP-hợp chất đích được thu gom và/hoặc được loại ra khỏi chất (ví dụ, bơm chất lỏng qua thiết bị lọc, rót chất lỏng qua thiết bị lọc, nhúng thiết bị lọc vào chất lỏng, phủ MIP trên bề mặt của bộ phận chứa, ly tâm, phủ MIP trên bề mặt của thiết bị lọc, bài tiết qua phân của động vật, v.v.).

Theo một phương án, phương pháp loại bỏ hợp chất đích ra khỏi chất lỏng là có tính chọn lọc cao. Ví dụ, chất lỏng có thể chứa nhiều hợp chất đích trong đó MIP loại bỏ một cách chọn lọc chỉ một hợp chất đích cụ thể (ví dụ, độc tố nấm), trong đó

“một” chỉ loại hợp chất đích và không phải là số lượng hợp chất đích được loại bỏ. Theo một số phương án, nhiều MIP (ví dụ, nhiều cụm MIP khác nhau (ví dụ, trong đó một cụm MIP đặc hiệu đối với một loại độc tố nấm (ví dụ, ocratoxin) và quần thể thứ hai của MIP đặc hiệu đối với loại độc tố nấm thứ hai (ví dụ, aflatoxin) được sử dụng cho chất lỏng và được để tương tác trong khoảng thời gian đủ để loại bỏ một cách chọn lọc nhiều loại hợp chất đích khác nhau (ví dụ, độc tố nấm) ra khỏi chất lỏng. Sáng chế không bị giới hạn bởi số lượng các loại MIP khác nhau mà được sử dụng cho chất lỏng chứa nhiều loại hợp chất đích khác nhau (ví dụ, độc tố nấm). Theo một số phương án, chất lỏng bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 loại hợp chất đích khác nhau (ví dụ, độc tố nấm) hoặc nhiều hơn, sẽ được dùng chất lỏng này, chế phẩm gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, hoặc nhiều hơn các loại MIP khác nhau với tính đặc hiệu đối với một trong số nhiều hợp chất đích trong điều kiện sao cho MIP tương tác với và càng hóa hợp chất đích duy nhất. Theo một số phương án, MIP thể hiện ái lực đặc hiệu đối với một phân tử/hợp chất đích. Theo một số phương án, MIP thể hiện ái lực đặc hiệu đối với nhóm gồm các phân tử có chung tính chất hóa học hoặc vật lý. Theo một số phương án, MIP có nhiều lỗ hổng khác nhau để tạo phức/liên kết đối với các hợp chất đích khác nhau sao cho MIP có thể liên kết một cách có chọn lọc nhiều hợp chất đích, sau khi sử dụng nhiều phân tử/hợp chất đích khi xử lý MIP.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp loại bỏ hợp chất đích ra khỏi chất lỏng gồm nhiều loại hợp chất đích khác nhau (ví dụ, độc tố nấm hoặc các phân tử/hợp chất đích phân tử hữu cơ khác (ví dụ, chất dinh dưỡng như vitamin, thuốc, chất kháng sinh, tạp chất, hormon, enzym, protein, v.v.)). Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nhóm các loại MIP khác nhau được thiết kế để liên kết với các hợp chất đích khác nhau. Ví dụ, theo một số phương án, mẫu chất lỏng sẽ được cung cấp để thực hiện thử nghiệm để xác định sự có mặt của một hoặc nhiều hợp chất đích trong mẫu chất lỏng này. Sự có mặt của các độc tố nấm cụ thể có thể được phát hiện để xác định loại độc tố nấm có mặt. Trong quá trình xác định một hoặc nhiều loại hợp chất đích có mặt trong mẫu chất lỏng (ví dụ, trong đó mẫu chất lỏng có các đặc điểm đặc trưng của chất lỏng từ đó mẫu được lấy), một hoặc nhiều MIP được tạo ra (ví dụ, theo các phương pháp được mô tả ở đây) và/hoặc được kết hợp, và sau đó một hoặc nhiều MIP được sử dụng cho dung dịch

chất lỏng để loại bỏ hợp chất đích. Theo một số phương án, việc xác định một hoặc nhiều loại hợp chất đích gồm việc sử dụng các cột và/hoặc các bộ lọc gồm một hoặc nhiều MIP đặc hiệu đối với hợp chất đích. Theo một số phương án, ngay khi MIP được sử dụng để loại bỏ hợp chất đích ra khỏi mẫu (ví dụ, mẫu chất lỏng), hợp chất đích này sẽ được loại ra khỏi MIP và MIP được tái sử dụng. Theo một số phương án, MIP được loại bỏ theo cách thích hợp. Ví dụ, hợp chất đích có thể được loại ra khỏi MIP (ví dụ, tạo ra khả năng tái sử dụng MIP) thông qua việc rửa bằng dung môi và/hoặc dung dịch thích hợp, mà có thể được chọn từ các dung môi được sử dụng trong các phương pháp để phân ly MIP ra khỏi khuôn sau các phản ứng tổng hợp, và xử lý vật lý đối với MIP (ví dụ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, axetonitril, toluen, metanol, natri hydroxit, axit axetic, v.v.), hoặc dạng tương tự. MIP đã được tái chế sau đó được quay vòng để sử dụng.

Các phương pháp loại bỏ hợp chất đích ra khỏi chất lỏng có thể cho hiệu suất thu hồi cao nhờ khả năng chọn lọc tự nhiên của MIP. Theo một số phương án, phương pháp loại bỏ thu hồi được từ khoảng 25% đến khoảng 99% hợp chất đích có mặt trong chất lỏng. Theo một số phương án, phương pháp loại bỏ nêu trên thu hồi được từ khoảng 35% đến khoảng 99% hợp chất đích có mặt trong chất lỏng. Theo một số phương án, phương pháp loại bỏ thu hồi từ khoảng 50% đến khoảng 99% hợp chất đích có mặt trong chất lỏng. Theo một số phương án, phương pháp loại bỏ nêu trên thu hồi được từ khoảng 75% đến khoảng 99% hợp chất đích có mặt trong chất lỏng. Theo các phương án khác, phương pháp loại bỏ nêu trên làm giảm nồng độ hợp chất đích thu được trong chất lỏng đến mức tính theo phần tỷ (ppb) (ví dụ, đến nồng độ thích hợp cho người và/hoặc động vật tiêu thụ). Các phương pháp loại bỏ có thể được sử dụng để tạo ra mức nồng độ cụ thể như được phát hiện thấy trong chế độ điều chỉnh hiện nay và được đề xuất đã biết với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một số phương án, các phương pháp loại bỏ được thực hiện trên các chất lỏng với mức pH cụ thể. Ví dụ, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện trên các chất lỏng có độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 13.

Theo một số phương án, MIP được sử dụng để loại bỏ hợp chất đích ra khỏi bề mặt. Ví dụ, các phương án nhất định theo sáng chế đề xuất các phương pháp để làm giảm sự có mặt của hợp chất đích (ví dụ, độc tố nấm) trên bề mặt gồm cho bề mặt

tiếp xúc này với chế phẩm gồm MIP. Theo các phương án cụ thể, việc tiếp xúc được thực hiện trong khoảng thời gian đủ để MIP liên kết với và/hoặc càng hóa hợp chất đích. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp khử độc trên bề mặt môi trường chứa hợp chất đích. Theo một phương án như vậy, hợp chất đích được kết hợp với bề mặt môi trường và phương pháp này sẽ bao gồm việc cho bề mặt môi trường tiếp xúc với lượng chế phẩm (ví dụ, gồm MIP) đủ để khử độc bề mặt. Mặc dù có thể mong muốn loại bỏ hoàn toàn hợp chất đích, nhưng phương pháp khử độc nêu trên không nhất thiết phải cho hiệu quả loại bỏ hoàn toàn các hợp chất đích. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, gồm MIP) và phương pháp còn bao gồm việc sử dụng các chất tạo màu, sơn, và các hợp chất đánh dấu và nhận dạng khác để đảm bảo rằng bề mặt đã được xử lý được xử lý một cách đầy đủ bằng chế phẩm theo sáng chế.

Theo một số phương án, MIP được sử dụng để ngăn không cho hợp chất đích tiếp xúc với bề mặt hoặc hợp chất khác (ví dụ, đất). Ví dụ, các phương án nhất định theo sáng chế bao gồm các phương pháp để sản xuất chế phẩm nhờ đó MIP được kết hợp với các vật liệu khác (ví dụ, sản phẩm loại chất dẻo hoặc tinh bột) và được dùng cho thực vật (ví dụ, cây nông nghiệp đang sinh trưởng) để bảo vệ thực vật khỏi hợp chất bề mặt (ví dụ, độc tố nấm) trong quá trình phát triển và còn ngăn cho các hợp chất này không bị nhiễm tạp các hợp chất khác (ví dụ, đất).

Theo phương án nhất định, bề mặt (ví dụ, bề mặt bên trong hoặc bên ngoài) của đối tượng (ví dụ, người hoặc động vật) được xử lý (ví dụ, bên ngoài hoặc bên trong) bằng chế phẩm theo sáng chế. Theo các phương án khác, việc tiếp xúc được tạo ra thông qua việc sử dụng qua đường miệng, qua mũi, má, trực tràng, âm đạo hoặc tại chỗ. Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng dưới dạng dược phẩm, dự định rằng chế phẩm này còn gồm tá dược dược dụng, chất phụ gia, chất làm ổn định, chất pha loãng, và các chất tương tự. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm còn gồm các phân tử có hoạt tính sinh học dược dụng bổ sung (ví dụ, các kháng thể, chất kháng sinh, các phương tiện để chuyển nhiễm axit nucleic, vitamin, khoáng chất, các đồng yếu tố, các yếu tố có khả năng liên kết với và/hoặc càng hóa độc tố nấm (ví dụ, chất chiết thành tế bào nấm men (ví dụ, chất chiết thành tế bào nấm men được kết hợp với vật liệu đất sét, và/hoặc chất chiết thành tế bào nấm men chứa đất sét và/hoặc các hạt đất sét được kết hợp và/hoặc được trộn lẫn

vào thành tế bào nấm men), v.v.). Theo một số phương án, đối tượng được sử dụng chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, gồm MIP) để chữa trị bệnh hoặc tình trạng bệnh (ví dụ, nấm bàn chân). Theo các phương án khác, đối tượng được sử dụng chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, gồm MIP) để điều trị phòng bệnh (ví dụ, ngăn ngừa sự khởi phát của các dấu hiệu hoặc triệu chứng của) bệnh hoặc tình trạng bệnh (ví dụ, nấm bàn chân). Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, gồm MIP) và phương pháp được áp dụng cho loại diện tích hoặc bề mặt bất kỳ. Ví dụ, theo một số phương án, diện tích gồm bề mặt chất rắn (ví dụ, thiết bị y tế), dung dịch, bề mặt của sinh vật (ví dụ, phần bên trong hoặc bên ngoài của người) hoặc thực phẩm.

Sáng chế không bị giới hạn bởi lượng của một hoặc nhiều MIP được dùng cho (ví dụ, được trộn với) chất lỏng hoặc chất rắn (ví dụ, để loại bỏ hợp chất đích). Theo một số phương án, khoảng 0,10 mg, 0,50 mg, 1,0 mg, 2,0 mg, 5,0 mg, 10,0 mg, 20,0 mg, 50,0 mg, 100,0 mg, 500,0 mg MIP hoặc lớn hơn được sử dụng cho mỗi lít chất lỏng hoặc chất rắn.

Theo một số phương án, MIP theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp loại bỏ độc tố như lọc máu. Lọc máu là kỹ thuật xử lý trong đó một thể tích lớn máu của đối tượng được cho đi qua chất hấp phụ (ví dụ, MIP) để loại bỏ các chất độc ra khỏi máu.

Thông thường, chất hấp thụ được sử dụng phổ biến nhất trong lọc máu là nhựa và nhiều dạng khác nhau cacbon hoặc than hoạt tính. Tuy nhiên, tính liên kết đặc hiệu của các vật liệu này tương đối kém và đôi khi chúng hấp phụ cả các yếu tố máu quan trọng cũng như phân tử đích. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng MIP theo sáng chế làm chất hấp thụ ái lực cao và đặc hiệu hơn đối với phân tử đích.

Việc lọc máu được thực hiện bằng cách bơm máu đã hút qua ống thông động mạch vào cột hoặc hộp chứa vật liệu hấp thụ (ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng vật liệu hấp thụ được sử dụng là MIP được mô tả ở đây). Khi máu đi qua các hạt cacbon hoặc nhựa trong cột, các phân tử hoặc hạt gây độc được hút vào các bề mặt của các hạt hấp thụ và được giữ lại trong cột. Máu chảy ra đầu kia của cột và được đưa trở lại đối tượng thông qua ống được gắn vào ống thông tĩnh mạch. Kỹ thuật lọc máu có khả năng loại bỏ các độc tố ra khỏi một thể tích máu lớn

hơn so với thẩm tách máu hoặc các phương pháp lọc khác; ví dụ, nó có thể xử lý nhiều hơn 300ml máu cho mỗi phút.

MIP theo sáng chế có thể được sử dụng để lọc máu. Theo một số phương án, MIP theo sáng chế được sử dụng để loại bỏ một hoặc nhiều độc tố nằm ra khỏi máu của đối tượng sử dụng kỹ thuật lọc máu.

Chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng tối ưu mong muốn (ví dụ, đáp ứng chữa trị hoặc phòng ngừa). Ví dụ, một liều lớn của MIP có thể được sử dụng cho động vật, một vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều này có thể giảm hoặc tăng thích hợp theo mức độ cần thiết của ca bệnh cần chữa trị. Tốt hơn nếu bào chế các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và tạo nên các liều đều nhau. Liều của MIP theo sáng chế thường phụ thuộc vào (a) các đặc tính đáng chú ý của hoạt chất và tác dụng phòng ngừa hoặc chữa trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có của kỹ thuật phối trộn hoạt chất này để xử lý tính miễn cảm với độc tố nằm ở các cá thể. Liều được sử dụng tất nhiên sẽ thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố đã biết như các tính chất dược lực học của hợp chất cụ thể được dùng, và cách thức và đường dùng của chúng; độ tuổi, sức khỏe, và khối lượng của đối tượng nhận; bản chất và mức độ của triệu chứng, loại liệu pháp điều trị được thực hiện đồng thời, tần suất điều trị và tác dụng mong muốn.

MIP theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Ví dụ, dược phẩm có thể chứa MIP và chất mang dược dụng. Theo sáng chế, “chất mang dược dụng” bao gồm dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất làm đẳng trương và làm chậm sự hấp thụ, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý học. Ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều chất trong số nước, nước muối, nước muối được đệm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol và các chất tương tự, cũng như hỗn hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn nếu dược phẩm này bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua. Chất mang dược dụng còn có thể gồm lượng nhỏ các chất phụ trợ như chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà tăng cường thời hạn sử dụng hoặc hoạt lực của MIP.

Theo các phương án nhất định, MIP theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, ví dụ, cùng với chất pha loãng trợ hoặc chất mang ăn được và có thể đồng hóa được. Hợp chất (và các thành phần khác, nếu muốn) cũng có thể được bao gồm trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, được dập thành viên nén, hoặc được kết hợp trực tiếp vào thức ăn của đối tượng. Để sử dụng để chữa trị qua đường miệng, các hợp chất có thể được kết hợp với chất phụ gia và được sử dụng ở dạng viên nén có thể tiêu hóa được, viên nén dùng qua miệng má, thuốc viên, viên nang, còn ngọt, hỗn dịch, sirô, viên nhện, viên tròn, và các dạng tương tự. Để sử dụng hợp chất theo sáng chế bằng đường dùng khác đường dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể cần thiết phải bao hợp chất bằng, hoặc đồng sử dụng hợp chất này với, vật liệu để ngăn ngừa việc khử hoạt tính của nó.

Hoạt chất bổ sung cũng có thể được kết hợp vào chế phẩm. Theo các phương án nhất định, MIP theo sáng chế được cùng bào chế với và/hoặc được đồng sử dụng với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm “lượng hữu hiệu để trị liệu” hoặc “lượng hữu hiệu để phòng bệnh” của MIP theo sáng chế “Lượng hữu hiệu để trị liệu” chỉ lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu mong muốn. Lượng hữu hiệu để trị liệu có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và khối lượng của cá thể, và khả năng của của các hạt nano đã được tạo khuôn để tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu để trị liệu còn là lượng trong đó tác dụng có lợi về mặt trị liệu lớn hơn tác động gây độc hoặc gây hại bất kỳ của các hạt nano đã được tạo khuôn. “Lượng hữu hiệu để phòng bệnh” chỉ lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để tạo ra được kết quả phòng bệnh mong muốn. Thông thường, vì liều lượng phòng bệnh được sử dụng ở đối tượng trước hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, lượng hữu hiệu để phòng bệnh sẽ thấp hơn lượng hữu hiệu để trị liệu.

Theo một số phương án, khi được trộn với chất hữu cơ (ví dụ, thức ăn), và/hoặc chất lỏng (ví dụ, nước, rượu vang hoặc đồ uống khác) và/hoặc được cấp trực tiếp cho đối tượng, chế phẩm theo sáng chế làm giảm mức hấp thu hoặc mức hấp thụ của độc tố nắm bởi đối tượng (ví dụ, nhờ đó làm giảm nhẹ sự suy giảm tính năng, tăng cường sức khỏe và/hoặc giảm tỷ lệ mắc phải bệnh có liên quan đến độc

tổ nấm hoặc các đáp ứng bệnh học ở đối tượng) và làm giảm và/hoặc ngăn ngừa sự tích tụ của độc tố nấm hoặc chất chuyển hoá của chúng trong thịt, cá, trứng, sữa và các sản phẩm khác đi vào chuỗi thức ăn của người.

Theo một số phương án, sáng chế được sử dụng để tạo ra các thiết bị phân tách (ví dụ, thiết bị chiết pha rắn (được viết tắt là SPE)) mà được sử dụng để loại bỏ hợp chất rắn hoặc bán rắn ra khỏi hỗn hợp của các tạp chất dựa trên các tính chất vật lý và hóa học của chúng mà khác với các thiết bị phân tách thông thường sẵn có (ví dụ, chiết pha bình thường, pha đảo, hoặc pha rắn trao đổi ion). Theo một số phương án, thiết bị phân tách có thể được kết hợp trong hộp dùng để chiết và do đó tinh chế khuôn đặc hiệu tương ứng và các chất tương tự khuôn của MIP được tạo ra.

Theo một số phương án, sáng chế có thể được sử dụng để nhồi vào cột sắc ký được sử dụng với sắc ký lỏng và cho phép rửa giải đặc hiệu khuôn tương ứng và các chất tương tự khuôn của MIP được sử dụng. Cột MIP được sản xuất cho phép tạo ra các tương tác có tính đặc hiệu cao hơn so với các kỹ thuật và vật liệu có sẵn khác đã biết trong lĩnh vực (ví dụ, cột silic oxit pha bình thường, trao đổi ion, pha đảo gồm các mạch alkyl kỵ nước ( $-(CH_2)_n-CH_3$  với  $n$  bằng 4, 8, 18, nhưng không bị giới hạn ở) tương tác với peptit và phân tử nhỏ) có kích thước khác nhau, nhưng được định hướng đặc hiệu hơn đối với khuôn tương ứng và các chất tương tự khuôn của MIP được tạo ra. Theo một số phương án, nhiều loại MIP khác nhau mỗi loại riêng lẻ được thiết kế riêng cho độc tố nấm cụ thể hoặc nhóm các độc tố nấm có thể được sử dụng để đóng gói cột.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vật liệu để phân tách và định lượng độc tố nấm. Sau đó, sáng chế có thể được sử dụng để xác định khả năng truy xuất nguồn gốc của vật liệu trong thức ăn cho gia súc/thức ăn, hoặc nguồn chất lỏng nhằm mục đích xác định độc tố nấm có mặt trong mẫu và so sánh nó với hợp chất tham chiếu thường được chấp nhận (ví dụ, vật liệu chuẩn độc tố nấm được rửa giải bằng cách sử dụng HPLC được nối với bộ dò UV, phát huỳnh quang hoặc bộ dò phổ khối, v.v.).

Theo một số phương án, khả năng truy xuất nguồn gốc của một mức độ độc tố nấm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một loại MIP hoặc nhiều loại MIP khác nhau, mỗi loại được làm thích ứng đối với từng độc tố nấm cụ thể hoặc nhóm

các độc tố nấm, và được áp dụng để phát hiện trong vật liệu mẫu gồm mẫu thức ăn cho gia súc hoặc thức ăn (ví dụ, mẫu gồm các loại hạt (ví dụ, ngô, lúa mì, v.v.), trái cây (ví dụ, táo, lê, nho, v.v.), cà phê, chè, cacao, v.v.).

Theo một số phương án, khả năng truy xuất nguồn gốc của một mức độ độc tố nấm sử dụng một MIP hoặc nhiều loại MIP khác nhau mỗi loại được làm thích ứng để nhắm đích độc tố nấm cụ thể hoặc nhóm các độc tố nấm, được áp dụng để nghiên cứu phân tích (ví dụ, HPLC) để xác định xem độc tố nấm có mặt trong mẫu hay không và nếu có, (các) độc tố nấm nào có mặt và ở nồng độ bao nhiêu. Theo một số phương án, công cụ phân tích được sử dụng để phát hiện độc tố nấm (ví dụ, HPLC) có thể được sử dụng để dự đoán mức độ nguy hiểm khi thức ăn nhiễm độc tố nấm. Theo các phương án khác, công cụ phân tích được sử dụng để phát hiện độc tố nấm có thể được sử dụng để xác định xem MIP hoặc hỗn hợp của MIP nào là cần để sử dụng cho vật liệu lấy mẫu để làm giảm hoặc loại bỏ (các) độc tố nấm có mặt.

Theo một số phương án, khả năng truy xuất nguồn gốc của mức độ độc tố nấm sử dụng một MIP hoặc nhiều loại MIP khác nhau mỗi loại được thiết kế riêng cho độc tố nấm cụ thể hoặc nhóm các độc tố nấm, được sử dụng để phát hiện lượng độc tố nấm trong các chất lỏng được sử dụng trong hệ thống sản xuất động vật hoặc được sử dụng làm đồ uống cho động vật và người tiêu thụ (ví dụ, nước, sữa, thuốc nước, rượu vang, bia, v.v.).

Theo một số phương án, khả năng truy xuất nguồn gốc của một mức độ độc tố nấm có thể được sử dụng để xử lý thức ăn cho gia súc/thức ăn (xử lý thịt, xử lý sản xuất mới) để kiểm tra sự có mặt của độc tố nấm trong toàn bộ dòng sản xuất để xác định ở đâu vấn đề nhiễm tạp nảy sinh, và yêu cầu hủy bỏ. Mã vạch và các phương tiện theo dõi khác, toàn bộ sự di chuyển của sản phẩm và các bước trong quy trình sản xuất phải được tham chiếu một cách tương ứng để cho phép khả năng truy xuất nguồn gốc của mẫu được phân tích.

Theo một số phương án, khả năng truy xuất nguồn gốc của nồng độ độc tố nấm sử dụng một MIP hoặc nhiều loại MIP khác nhau mỗi loại được thiết kế riêng cho độc tố nấm cụ thể hoặc nhóm các độc tố nấm, được áp dụng để phát hiện nồng độ độc tố nấm của máu. Ví dụ, sáng chế có thể được sử dụng trong thực hành truyền máu, để hỗ trợ việc theo dõi kiểm tra liên tục để giải thích nơi cung cấp sản phẩm

máu và tình trạng xử lý, thử nghiệm, bảo quản, v.v. của các sản phẩm này ở tất cả các thời điểm tính từ thời điểm ban đầu lấy từ đối tượng cho cho đến thời điểm truyền máu cho đối tượng nhận hoặc bỏ đi đều thông qua khả năng truy xuất nguồn gốc từ mức độ tổ nấm.

Theo một số phương án, sáng chế sử dụng MIP được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều phương pháp và/hoặc vật liệu mô tả ở đây để sử dụng trong chế phẩm và/hoặc phương pháp làm giảm, loại bỏ và/hoặc loại trừ độc tố nấm (ví dụ, các phương pháp vật lý, trộn, hóa học, vi sinh vật học được mô tả ở đây (ví dụ, để hấp phụ và/hoặc cang hóa các độc tố)). Ví dụ, theo một số phương án, MIP được mô tả ở đây được sử dụng với một hoặc nhiều phương pháp vật lý, trộn, hóa học, hoặc vi sinh vật học để cang hóa độc tố nấm. Nhiều phương pháp vật lý có thể được sử dụng để làm giảm độc tố nấm có mặt như sự phân tách cơ học (xem, ví dụ, Dickens J.W., and Whitaker T.B., 1975. *Peanut Science*, 2: 45-50), sự phân tách theo tỷ trọng (xem, ví dụ, Huff W.E., and Hagler W.M., 1982. *Cereal Chemistry*, 59: 152-153), làm sạch hạt bằng cách rửa bằng nước hoặc natri cacbonat để làm giảm sự nhiễm bẩn ngô (ví dụ, nhiễm độc tố *Fusarium*), phân loại các loại hạt đã bị nhiễm độc tố (ví dụ, thông qua sự phân tách vật lý hoặc bằng phương pháp phát huỳnh quang để phát hiện sự có mặt của độc tố nấm), bất hoạt bằng nhiệt (xem, ví dụ, Lee L.S., 1989. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 66: 1398-1413), chiếu xạ bằng UV, chiếu xạ bằng tia X hoặc vi sóng (xem, ví dụ, CAST, 2003. *Mycotoxins: Risk in plant, animal, and human systems*. In: Task Force Report 139 (Niyo K. ed.), Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA: pp. 1-199), và chiết các độc tố bằng dung môi (xem, ví dụ, Scott P.M., 1998. *Review of Veterinary Medicine*, 149: 543-548). Nhiều hóa chất như axit, bazơ (ví dụ, amoniac, xút ăn da), chất oxy hóa (ví dụ, hydro peroxit, ozon), tác nhân khử (ví dụ, bisulphit), chất clo hóa và formaldehyt, đã được sử dụng để phân hủy chất độc tố nấm trong thức ăn cho gia súc đã bị nhiễm độc tố, đặc biệt là aflatoxin (xem, ví dụ, Hagler W.M., Jr., 1991. In *Mycotoxins, Cancer and Health*. (Bray G. and Ryan D. eds.) Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA, USA; Phillips T.D., Clement B.A., and 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. and Groopman J.D. eds.), Academic Press, New

York, NY, USA: pp. 383-406;). Các thiết bị lọc (ví dụ, cột lọc) và các thiết bị tương tự cũng có thể được sử dụng để loại bỏ độc tố nấm.

Sáng chế còn đề xuất hệ thống và phương pháp tạo ra các khía cạnh khác nhau của sản phẩm (ví dụ, sản phẩm và/hoặc thành phần của chúng theo sáng chế và/hoặc dịch vụ sử dụng theo sáng chế). Sáng chế còn đề xuất hệ thống và phương pháp cung cấp các sản phẩm của công ty đến bộ phận ở bên ngoài công ty, ví dụ, hệ thống và phương pháp để cung cấp cho khách hàng hoặc nhà phân phối sản phẩm sản phẩm của công ty như một hoặc nhiều MIP (ví dụ, MIP được nhắm đích độc tố nấm cụ thể). Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất hệ thống quản lý sản phẩm mà có thể độc lập hoặc kết hợp với hệ khả năng truy xuất nguồn gốc. Ví dụ, mẫu của vật liệu có thể được phân tích để xác định xem độc tố nấm có mặt hoặc không có mặt trong vật liệu hay không; nếu độc tố nấm có mặt, độc tố nấm cụ thể có thể được xác định. Thông tin này có thể được sử dụng cho khả năng truy xuất nguồn gốc (ví dụ, để chứng tỏ sự vắng mặt của tất cả hoặc một số độc tố nấm nhất định). Thông tin này cũng có thể được sử dụng để tạo ra hệ thống để quản lý sản phẩm MIP nhờ đó hỗn hợp cụ thể của MIP có thể được tạo ra và được kết hợp cùng với nhau để nhắm đích cụ thể độc tố nấm có mặt trong vật liệu mẫu.

Theo một số phương án, công ty nhận đầu vào (ví dụ, ở dạng đơn đặt hàng, thông tin, hoặc vật liệu (ví dụ, mẫu sinh học (ví dụ, mẫu chất lỏng nghi ngờ có hợp chất đích)) từ bộ phận ở bên ngoài công ty (ví dụ, nhà phân phối và/hoặc khách hàng) đến bộ phận đặt hàng; và cung cấp đầu ra (ví dụ, ở dạng sản phẩm được phân phối từ bộ phận chờ hàng (ví dụ, đến nhà phân phối và/hoặc khách hàng) hoặc ở dạng báo cáo số liệu (ví dụ, khả năng truy xuất nguồn gốc dưới dạng dịch vụ phân tích phòng thí nghiệm)). Theo một số phương án, hệ thống quản lý sản phẩm được sắp xếp để tối ưu hóa việc nhận đơn đặt hàng và phân phối (ví dụ, theo cách có hiệu quả về chi phí) sản phẩm (ví dụ, chế phẩm gồm một hoặc nhiều MIP (ví dụ, MIP đặc hiệu độc tố nấm)) đến bộ phận ở bên ngoài công ty; và để thu được số tiền trả cho sản phẩm này từ bộ phận này. Theo một số phương án, hệ thống quản lý sản phẩm được sắp xếp để tạo mã vạch cho mẫu hoặc vật liệu được đưa ra để phân tích và phân phối (ví dụ, theo cách có hiệu quả về chi phí) của báo cáo bảng số liệu (ví dụ, nồng độ của một vài độc tố nấm được phân tích thông qua việc sử dụng MIP-

SPE hoặc cột HPLC làm từ MIP (ví dụ, MIP đặc hiệu độc tố nấm)) đến bộ phận ở bên ngoài công ty; và để thu được số tiền trả cho dịch vụ này từ bộ phận này.

Theo một số phương án, công ty gồm bộ phận sản xuất và bộ phận quản lý. Chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra trong quá trình sản xuất và/hoặc bởi bên thứ ba, và có thể được bảo quản riêng rẽ tại đó như trong kho chứa vật liệu và/hoặc kho chứa các thành phần khác (ví dụ, kho chứa sản phẩm) và/hoặc có thể còn được tổng hợp (ví dụ, được kết hợp (ví dụ, một hoặc nhiều MIP có thể được kết hợp với một hoặc nhiều loại khác của MIP và/hoặc với các thành phần khác (ví dụ, chất mang và/hoặc các thành phần có hoạt tính sinh học khác được mô tả ở đây))) và được bảo quản (ví dụ, trong thiết bị và/hoặc kho chứa sản phẩm). Theo một số phương án, bộ phận quản lý bao gồm bộ phận quản lý đơn đặt hàng (ví dụ, nhận đầu vào ở dạng đơn đặt hàng cho sản phẩm từ khách hàng và/hoặc nhà phân phối). Bộ phận quản lý đơn đặt hàng sau đó có thể cung cấp đầu ra ở dạng các chỉ thị cho bộ phận chở hàng thực hiện đơn đặt hàng (tức là, chuyển sản phẩm như được yêu cầu đến khách hàng hoặc nhà phân phối). Theo một số phương án, bộ phận chở hàng, ngoài việc thực hiện đơn đặt hàng cho sản phẩm hoặc cho dịch vụ, cũng có thể cung cấp thông tin/số liệu cho bộ phận lập hóa đơn. Theo một số phương án, các thành phần khác của công ty có thể bao gồm bộ phận phục vụ khách hàng (ví dụ, mà có thể nhận đầu vào từ khách hàng và/hoặc cung cấp đầu ra ở dạng thông tin phản hồi hoặc thông tin đến khách hàng và/hoặc có thể nhận đầu vào hoặc cung cấp đầu ra đến thành phần bất kỳ khác của công ty). Ví dụ, bộ phận phục vụ khách hàng cũng có thể nhận đầu vào từ khách hàng ở dạng thông tin kỹ thuật được yêu cầu, ví dụ, để xác nhận rằng sản phẩm và các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng cho nhu cầu cụ thể của khách hàng, và có thể cung cấp đầu ra đến khách hàng ở dạng đáp ứng với thông tin kỹ thuật được yêu cầu.

Như vậy, theo một số phương án, các bộ phận của công ty được thiết kế một cách thích hợp để liên lạc với nhau để hỗ trợ việc vận chuyển vật liệu và các bộ phận, thiết bị, các thành phần khác, sản phẩm, bảng số liệu và thông tin bên trong và bên ngoài công ty. Ví dụ, con đường vật lý có thể được sử dụng để vận chuyển sản phẩm từ kho chứa sản phẩm đến bộ phận chở hàng trong khi nhận đầu vào thích hợp từ bộ phận quản lý đơn đặt hàng hoặc từ kho chứa mẫu đến bộ phận phân tích trong khi nhận yêu cầu phân tích gấp. Bộ phận quản lý đơn đặt hàng, để so sánh, có

thể được liên kết điện tử với các thành phần khác trong công ty, ví dụ, bởi mạng lưới liên lạc (ví dụ, mạng lưới (ví dụ, internet và/hoặc mạng nội bộ)), và có thể còn được thiết kế để nhận đầu vào, ví dụ, từ khách hàng bởi mạng lưới điện thoại, bằng thư từ hoặc dịch vụ vận tải khác, hoặc thông qua internet.

Theo một số phương án, hệ thống quản lý sản phẩm còn gồm một hoặc nhiều hệ thống thu gom số liệu.

Theo một số phương án, công ty có thể sử dụng nhiều phần mềm ứng dụng để cung cấp cho các bộ phận của công ty thông tin và/hoặc để cung cấp cho bộ phận bên ngoài công ty tiếp cận một hoặc nhiều bộ phận của công ty (ví dụ, tiếp cận với bộ phận quản lý đơn đặt hàng và/hoặc bộ phận phục vụ khách hàng và/hoặc thu gom/lưu giữ số liệu). Các phần mềm ứng dụng này có thể gồm mạng lưới liên lạc như Internet, mạng lưới cục bộ, hoặc mạng nội bộ. Ví dụ, trong ứng dụng dựa trên internet, khách hàng có thể tiếp cận trang web và/hoặc máy chủ mạng thích hợp mà hợp tác với bộ phận quản lý đơn đặt hàng sao cho khách hàng có thể tạo ra đầu vào dưới dạng đơn đặt hàng đến bộ phận quản lý đơn đặt hàng. Đáp lại, bộ phận quản lý đơn đặt hàng có thể liên lạc với khách hàng để xác nhận rằng đã nhận được đơn đặt hàng, và có thể liên lạc tiếp với bộ phận chở hàng, cung cấp đầu vào mà sản phẩm theo sáng chế (ví dụ, chế phẩm gồm một hoặc nhiều loại MIP khác nhau (ví dụ, MIP đặc hiệu độc tố nấm)) cần được chuyển đến khách hàng hoặc đến bộ phận phân tích, cung cấp đầu vào mà các phân tích sử dụng sản phẩm theo sáng chế (ví dụ, chế phẩm gồm một hoặc nhiều loại MIP khác nhau (ví dụ, MIP đặc hiệu độc tố nấm) được đóng gói dưới dạng các thiết bị riêng rẽ) cần được tiến hành. Như vậy, theo cách này, công việc kinh doanh của công ty có thể diễn ra theo cách có hiệu quả.

Như vậy, theo một số phương án, trong sự sắp xếp theo mạng lưới, các bộ phận phụ khác nhau của công ty (ví dụ, bộ phận lưu trữ, phân tích, lập hóa đơn và bộ phận chở hàng) có thể liên lạc với nhau theo cách của hệ thống máy tính tương ứng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp cung cấp các khía cạnh khác nhau của sản phẩm (ví dụ, sản phẩm và/hoặc các thành phần của chúng theo sáng chế), cũng như thông tin về các khía cạnh khác nhau của sản phẩm theo sáng chế (ví dụ, số liệu về tính năng, sự thống kê sử dụng, v.v.), đến các bên (ví dụ, khách hàng/người sử dụng, nhà phân phối, các bên thứ ba (ví dụ, các cơ quan của chính phủ (ví dụ, viện sức khỏe quốc gia và/hoặc trung tâm kiểm soát bệnh), v.v.).

Theo một số phương án, sản phẩm được lấy ra từ kho chứa sản phẩm, ví dụ, bởi bộ phận chở hàng, và được gửi đến bên yêu cầu như khách hàng hoặc nhà phân phối. Thông thường, việc chuyên chở này được tiến hành để đáp lại bên đặt đơn đặt hàng, mà sau đó được xử lý (ví dụ, được gửi đến bên thích hợp) trong cơ quan tổ chức và tạo ra sản phẩm đã được đặt hàng được gửi đến bên đặt hàng hoặc dịch vụ được cung cấp đến bên đặt hàng. Số liệu liên quan đến việc gửi sản phẩm hoặc bảng số liệu của dịch vụ phân tích đối với bên đặt hàng có thể được chuyển tiếp trong cơ quan tổ chức, ví dụ, từ bộ phận chở hàng hoặc bộ phận phân tích đến bộ phận lập hóa đơn, mà, đến lượt mình, có thể chuyển hóa đơn đến bên đặt hàng, với sản phẩm hoặc bảng số liệu, hoặc tại thời điểm sau khi sản phẩm hoặc bảng số liệu đã được gửi. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp cung cấp dịch vụ kỹ thuật đến các bên sử dụng sản phẩm và/hoặc các thành phần của chúng theo sáng chế. Mặc dù chức năng này có thể được thực hiện bởi các cá thể có liên quan trong quá trình nghiên cứu và phát triển sản phẩm, các câu hỏi có liên quan tới dịch vụ kỹ thuật nhìn chung có thể được xử lý, được giải đáp, và/hoặc được điều khiển bởi bộ phận quản lý của cơ quan tổ chức (ví dụ, bộ phận phục vụ khách hàng). Sự liên lạc dịch vụ kỹ thuật (ví dụ, giải quyết các vấn đề liên quan tới việc sử dụng sản phẩm hoặc các thành phần riêng lẻ của sản phẩm) có thể yêu cầu trao đổi thông tin giữa người sử dụng (ví dụ, khách hàng) và bộ phận phục vụ khách hàng.

Như nêu trên trên đây, số lượng bất kỳ của các biến số của quy trình tạo ra sản phẩm (ví dụ, sản phẩm và/hoặc các thành phần của chúng được mô tả ở đây) và/hoặc dịch vụ đến người sử dụng là có thể và nằm trong phạm vi của sáng chế Do đó, sáng chế bao gồm các phương pháp (ví dụ, các phương pháp kinh doanh) mà bao gồm (1) sản xuất sản phẩm (ví dụ, sản phẩm và/hoặc các thành phần của chúng được mô tả ở đây); (2) nhận đơn đặt hàng cho các sản phẩm này; (3) gửi sản phẩm đến các bên đặt đơn đặt hàng này; (4) gửi hóa đơn đến các bên có nhiệm vụ trả cho các sản phẩm được gửi đến như vậy; và/hoặc (5) nhận số tiền trả đối với các sản phẩm đã được gửi đến các bên đặt hàng. Ví dụ, các phương pháp được đề xuất gồm hai hoặc nhiều bước sau: (a) thu các phần, vật liệu, và/hoặc các thành phần từ nhà cung cấp; (b) điều chế một hoặc nhiều sản phẩm thứ nhất (ví dụ, một hoặc nhiều thành phần được mô tả ở đây (ví dụ, khuôn MIP được mô tả ở đây, và/hoặc một hoặc nhiều loại MIP khác nhau được tạo ra bằng cách sử dụng khuôn MIP)); (c) bảo

quản một hoặc nhiều sản phẩm thứ nhất của bước (b); (d) kết hợp một hoặc nhiều sản phẩm thứ nhất của bước (b) với một hoặc nhiều thành phần khác để tạo thành một hoặc nhiều sản phẩm thứ hai (ví dụ, chế phẩm gồm hai hoặc nhiều loại MIP khác nhau); (e) bảo quản một hoặc nhiều sản phẩm thứ nhất của bước (b) hoặc một hoặc nhiều sản phẩm thứ hai của bước (d); (f) thu đơn đặt hàng đối với sản phẩm thứ nhất của bước (b) hoặc sản phẩm thứ hai của bước (d); (g) chuyển sản phẩm thứ nhất của bước (b) hoặc sản phẩm thứ hai của bước (d) đến bên đặt đơn đặt hàng của bước (f); (h) theo dõi số liệu liên quan đến lượng tiền do bên thứ ba nợ đối với sản phẩm đã được chuyển ở bước (g); (i) gửi hóa đơn đến bên được chuyển sản phẩm ở bước (g); (j) thu số tiền trả cho sản phẩm đã được chuyển ở bước (g) (nói chung, nhưng không cần thiết, số tiền trả được thực hiện bởi bên được chuyển sản phẩm ở bước (g)); và (k) trao đổi thông tin kỹ thuật giữa cơ quan tổ chức và bên sở hữu sản phẩm đã được chuyển ở bước (d) (thông thường, bên được chuyển sản phẩm ở bước (g)).

Người mua có thể muốn mua một hoặc nhiều loại MIP khác nhau. Theo một số phương án, chế phẩm gồm nhiều loại MIP khác nhau được làm theo yêu cầu của người mua (ví dụ, dựa trên thông tin về sự có mặt của một hoặc nhiều loại hợp chất đích cần được loại bỏ/càng hóa). Ưu điểm của điều này là ở chỗ khách hàng có thể đặt hàng theo yêu cầu sản phẩm cụ thể theo nhu cầu của họ (ví dụ, mua chế phẩm gồm nhiều loại MIP khác nhau đặc hiệu đối với mỗi hợp chất đích, chứ không phải là mua riêng rẽ chế phẩm gồm chỉ một MIP, và sau đó sử dụng mỗi chế phẩm kết hợp với chế phẩm khác).

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp có liên quan đến việc thiết kế sản phẩm theo yêu cầu của khách hàng. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, (1) nhận đơn đặt hàng từ khách hàng đối với sản phẩm với các chi tiết phụ cụ thể và/hoặc phương pháp vận hành chúng, (2) điều chế sản phẩm với các chi tiết phụ cụ thể và/hoặc phương pháp vận hành chúng, (3) và cung cấp (ví dụ, chuyên chở) sản phẩm của bước (b) đến khách hàng.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm chứng minh và minh họa thêm một số phương án và khía cạnh ưu tiên nhất định theo sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

#### Ví dụ 1. Tổng hợp khuôn Ocratoxin A

Điều chế axit 2-axetoxy-3,5-diclobenzoic. Bình cầu ba cổ, đáy tròn, dung tích 1l được lắp: máy khuấy cơ học, nhiệt kế và phễu nhỏ giọt dung tích 125ml với thiết bị cân bằng áp suất được đặt trong bồn nước được giữ ở nhiệt độ 65°C. Các chất phản ứng sau lần lượt được nạp vào bình cầu có khuấy thích hợp: 250ml toluen khô, 2,5ml axit sulfuric đậm đặc và 207g axit 3,5-diclosalixylic rắn, được nghiền mịn, tạo thành thể huyền phù lưu động. Khi nhiệt độ của hỗn hợp được khuấy liên tục này đạt tới 60°C (với nhiệt độ bồn nước được duy trì ở 65°C) bắt đầu bổ sung từng giọt 108g (100 ml) anhydrit axetic và được hoàn tất trong thời gian 30 phút. Trong khi bổ sung anhydrit axetic, nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng không được thấp hơn 75°C. Sau khi hoàn tất việc bổ sung, hỗn hợp được khuấy và được gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C trong 4 giờ nữa. Sau thời gian này, dừng khuấy và hỗn hợp được để nguội qua đêm đến nhiệt độ trong phòng. Các tinh thể màu trắng tách ra từ hỗn hợp được lọc sạch, được rửa bằng 2x10 ml toluen lạnh đá và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được 206g axit 2-axetoxy-3,5-diclo benzoic (hiệu suất 82,7%). 30,6g (hiệu suất 12,3%) sản phẩm nữa được thu hồi bằng cách: cô phần dịch lọc đến thể tích bằng 1/2 thể tích ban đầu, làm nguội dung dịch trong bồn nước đá, lọc sạch sản phẩm ở dạng tinh thể và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C.

Khi điều chế *in situ* axit 2-axetoxy-3,5-diclobenzoic clorua và sử dụng nó để điều chế etyl este của N-(2-axetoxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin (để an toàn cho người vận hành, quy trình được tiến hành trong tủ hút khí độc).

Hệ thống sản xuất gồm thiết bị phản ứng dung tích 3l được lắp máy khuấy cơ học thích hợp (Ace Glass Inc, Louisville, KY, cat#13650-12/23) phễu nhỏ giọt dung tích 250ml, bộ phận ngưng tụ hồi lưu có ống làm khô CaCl<sub>2</sub> với cửa ra được gắn thiết bị hấp thụ hơi axit, cửa dẫn khí nitơ khô và nhiệt kế được đặt trong bồn nước ở nhiệt độ 22°C. Nạp 1 lít toluen khô, 5ml dimetylformamit và 103g axit 2-axetoxy-3,5-diclobenzoic vào thiết bị phản ứng trong khi khuấy. Bổ sung nhỏ giọt 217ml

(1,05 đương lượng) dung dịch oxalyl clorua 2M trong metylen diclorua vào hỗn hợp phản ứng trong khi khuấy trong thời gian 2,5 giờ. Một luồng hỗn hợp khí độc gồm: HCl, CO và CO<sub>2</sub>, mà được tạo ra trong phản ứng được hấp thụ trong 1l dung dịch natri hydroxit nồng độ 10% được đặt trong thiết bị thu hồi được làm nguội bằng nước vôi. Sau khi hoàn tất việc bổ sung oxalyl clorua bằng cách hòa tan hoàn toàn chất rắn, một luồng lớn khí nitơ khô được cho đi qua dung dịch trong thời gian 1 giờ để loại bỏ hầu hết khí axit (HCl, CO<sub>2</sub>) mà được tồn tại ở dạng hòa tan trong hỗn hợp phản ứng. Sau thời gian này, các chất trong bình cầu được làm nguội xuống nhiệt độ dưới 15°C trong bồn nước đá, và bổ sung 95g (1,0 đương lượng) L-phenylalanin etyl este hydroclorua dạng rắn vào hỗn hợp. Một phễu nhỏ giọt dung tích 500ml mới được lắp thay vào chỗ phễu dung tích 250ml và được nạp đầy bằng dung dịch chứa 145ml triethylamin (2,55 đương lượng) trong 350ml toluen. Sau đó, bổ sung dung dịch triethylamin trong khoảng thời gian 2 giờ vào hỗn hợp phản ứng được khuấy và được làm nguội bằng bồn nước đá. Trong thời gian bổ sung, duy trì nhiệt độ hỗn hợp dưới 25°C. Nhiệt độ này được duy trì trong thời gian 4 giờ sau khi hoàn tất việc bổ sung triethylamin và sau đó triethylamin hydroclorua được lọc sạch và bánh màu trắng tạo thành được rửa hai lần bằng 100ml toluen. Sau đó, phần dịch lọc được chuyển vào phễu chiết dung tích 3l và được rửa hai lần bằng 500ml nước và một lần bằng 500ml nước muối. Sau đó, lớp toluen được cô đến khi thể tích đạt 500ml và được để yên qua đêm trong tủ lạnh để kết tinh. Các tinh thể màu trắng được thu gom trên thiết bị lọc và được rửa một lần bằng 100ml toluen được làm lạnh trong nước đá, thu được 108,7g (hiệu suất 62%) etyl este của N-(2-axetoxi-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin.

<sup>1</sup>H NMR (clorofom được đơteri hóa (được viết tắt là CDCl<sub>3</sub>), ppm): 7,78 δ, J 2,8, 1H; 7,55 δ, J 2,4, 1H; 7,30-7,27 m, 3H; 7,11 rộng δ, J 8,0, 1H; 7,08 δq, J 8,0 và 1,6, 1H; 4,99 q, J 6,0, 1H; 4,24 q, J 7,0, 2H; 3,29 dd, J 5,6 và 14,4, 1H; 3,21 dd, J 9,2 và 14,0, 1H; 2,11 s, 3H; 1,31 t, J 7,2, 3H.

Điều chế N-(3,5-diclo-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanin (mẫu OTA). Hòa tan 108g etyl este của N-(2-axetoxi-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin trong 1l rượu etyl khan và được đặt trong bình cầu đáy tròn dung tích 2l được lắp thanh khuấy từ và được đặt trong bồn nước ở nhiệt độ môi trường. Bổ sung dung dịch chứa 33,33g natri hydroxit trong 37,2ml nước được vào một phần của hỗn hợp này và hỗn hợp

được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 17 giờ (qua đêm). Bổ sung một thể tích gồm 68,6ml axit clohydric đậm đặc trong điều kiện khuấy, được duy trì trong 2 giờ nữa. Natri clorua kết tủa được lọc sạch và phần dịch lọc được làm bay hơi cho đến khi khô ở nhiệt độ 60°C dưới áp suất 30 T. Phần còn lại gồm 88,9g (hiệu suất 98%) được hóa rắn sau khi làm nguội có dạng sản phẩm như thủy tinh không màu, tan tốt trong toluen hoặc axetonitril, nhờ đó tạo ra mẫu OTA (ví dụ, để sử dụng trong sản xuất MIP-OTA). MS:  $M^+$  354 và 356  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , ppm): 12,2 rất rộng s, 1H; 7,49 d, J 2,4, 1H; 7,35-7,28 m, 3H; 7,20 d, J 2,0, 1H; 7,18-7,16 m, 2H; 6,80 br d, J 6,4, 1H; 6,4 rất rộng s, 1H; 5,07 dd, 5,2 và 5,2, 1H; 3,34 dd, J 14,0 và 5,2, 1H; 3,27 dd, J 13,6 và 5,2, 1H.

#### Ví dụ 2. Tổng hợp MIP-OTA trong hỗn hợp toluen-xyclohexan

Nạp 500ml toluen, 35,42 g (0,1M) mẫu OTA, 16,18ml (0,15 M) 2-vinylpyridin, 12,13ml (0,1 M) 2-hydroxyetylmetacrylat, 235,75ml (1,25 M) etylen glycol dimetacrylat và 2,46g (15 mM) AIBN vào bình cầu bốn cổ dung tích 3l được lắp: máy khuấy cơ học, bộ phận ngưng tụ hồi lưu, nhiệt kế và cửa vào/cửa ra nitơ. Dung dịch trong suốt thu được được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và dòng nitơ liên tục được cho đi qua bình phản ứng (ví dụ, để loại bỏ oxy mà có thể ức chế quá trình polyme hoá). Sau đó, bình cầu được gia nhiệt đến 60°C và hỗn hợp được khuấy mạnh. Quá trình polyme hoá được diễn ra chừng nào nhiệt độ dung dịch tăng lên khoảng 55°C (ví dụ, quan sát bằng cách độ nhớt dung dịch tăng). 15 phút sau khi bắt đầu polyme hoá, bổ sung 600ml hỗn hợp xyclohexan/toluen (tỷ lệ 1:1) vào trong một phần hỗn hợp để thúc đẩy sự phân tách polyme hình cầu từ dung dịch. Tiếp tục khuấy mạnh hỗn hợp và bổ sung 500ml toluen trong thời gian 30 phút để tăng cường thể tích trộn để tăng thể tích của huyền phù MIP rắn trong thể tích dung môi tương đối thấp. Nhiệt độ hỗn hợp bằng 60°C và duy trì trạng thái khuấy trong 5 giờ nữa để các khối cầu MIP được lắng xuống. Phần dịch nổi được gạn, và viên tròn được đưa vào bình cầu bay hơi kiểu quay dung tích 2l để loại bỏ dung môi dư từ các khối cầu MIP, ở nhiệt độ 40°C và trong áp suất giảm còn 30 T. Các hạt hình cầu khô được nghiền đến khi có kích thước lỗ lưới bằng khoảng 140 và được rửa 5 lần, bằng cách khuấy với 1,5l dung dịch natri hydroxit 0,2% khối lượng/thể tích trong 30 phút và lắng gạn. Phần MIP-OTA hình cầu cuối cùng được trộn với 1,5l axit axetic 0,5% thể tích/thể tích, tiếp tục được lắng gạn bằng 1,5l nước

DI. MIP-OTA hình cầu ướ không chứa khuôn tạo thành (khoảng 1,0l thể tích) được làm khô trong lò sấy phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ, bằng cách sử dụng bốn khay thủy tinh. Thu được MIP-OTA như bột màu trắng cân nặng 248g (hiệu suất 93%). Các mẫu khác được xác định trong bảng 1 dưới đây được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp này.

Trong quy trình này và các quy trình tổng hợp tiếp theo, chất ức chế polyme hoá được lấy ra khỏi monome và chất tạo liên kết ngang bằng cách chưng cất chân không, trước khi được sử dụng trong quá trình polyme hoá, và dung môi được sử dụng trong quá trình polyme hoá là ACS tinh khiết. Nồng độ khuôn trong lần rửa tiếp theo thu được bằng cách so sánh cường độ màu đỏ cam của phức chất  $\text{Fe}^{3+}$  của khuôn ở bước sóng ở  $\lambda_{\text{tối đa}}$  385 nm với đường cong hiệu chuẩn được thiết lập cho nồng độ khuôn nằm trong khoảng từ 10  $\mu\text{g/ml}$  và 1 mg/ml.

Bảng 1. Nhận biết các mẫu được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-xyclohexan

| Số mẫu    | Toluen-xyclohexan (ml) | Rửa lần cuối cùng                         | Hình thái               |
|-----------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
| 523-29/30 | 45/15                  | Etanol                                    | Bột hình cầu màu trắng  |
| 523-31    | 65/15                  | Etanol                                    | Bột hình cầu màu trắng  |
| 523-34    | 65/35                  | Etanol/NaOH                               | Bột hình cầu, màu trắng |
| 523-35    | 55/22                  | Etanol/ $\text{NEt}_3/\text{H}_2\text{O}$ | Trắng bột, cụm          |
| 523-36    | 90/30                  | NaOH/ $\text{H}_2\text{O}$                | Trắng cụm               |

#### Ví dụ 3. Tổng hợp OTA MIP trong axetonitril

Nạp 500ml axetonitril, 17,71g (50 mM) mẫu OTA, 8,1ml (75 mM) 2-vinylpyridin, 6,1ml (50 mM) 2-hydroxyethylmetacrylat, 117,9ml (625 mM) etylen glycol dimetacrylat và 1,23g (15 mM) AIBN vào bình cầu bốn cổ dung tích 3l được lắp: máy khuấy cơ học, phễu nhỏ giọt dung tích 500ml với thiết bị cân bằng áp suất, nhiệt kế và đầu vào/đầu ra nitơ và được gia nhiệt bằng bộ gia nhiệt bằng điện. Dung dịch trong suốt thu được được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và dòng nitơ liên tục được cho đi qua bình phản ứng (ví dụ, để loại bỏ oxy mà có thể gây ức chế polyme hoá). Sau đó, bình cầu được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C và hỗn hợp được khuấy mạnh. Quá trình polyme hoá được diễn ra chừng nào nhiệt độ tăng lên đến khoảng 55°C (ví dụ, được quan sát thấy bởi độ nhớt của dung dịch tăng).

30 phút sau khi bắt đầu polyme hoá (ví dụ, quan sát thấy tạo thành gel), bổ sung nhanh 1,5l axetonitril (được gia nhiệt từ trước đến nhiệt độ 55°C và được rửa bằng nitơ để loại bỏ oxy) trong ba phần bằng phần nhỏ giọt dung tích 500ml để tránh phong bế quá trình tạo thành polyme và để thúc đẩy việc phân tách polyme hình cầu từ dung dịch. Tiếp tục khuấy mạnh và gia nhiệt cho hỗn hợp trong 17 giờ nữa (qua đêm). Sau đó, gia nhiệt và khuấy được ngừng lại và các hạt hình cầu MIP được lắng xuống. Phần dịch nổi được gạn, và viên tròn được chuyển vào bình cầu bay hơi kiểu quay dung tích 2l và phần còn lại của dung môi được loại ra khỏi các hạt hình cầu MIP ở nhiệt độ 40°C, trong áp suất giảm còn 30 T. Các hạt hình cầu khô được nghiền đến kích thước lỗ lưới khoảng 140 và được rửa 5 lần, bằng cách khuấy với 1,5l dung dịch natri hydroxit 0,2% khối lượng/thể tích trong 30 phút và lắng gạn. Phần MIP-OTA hình cầu cuối cùng được trộn với 1,5l axit axetic nồng độ 0,5% thể tích/thể tích, đã được lắng gạn bằng 1,5l nước DI. MIP-OTA hình cầu ướt không chứa khuôn tạo thành (khoảng 1,2l thể tích) được làm khô trong lò sấy phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ, bằng cách sử dụng 4 khay thủy tinh. Bột trắng như MIP-OTA có khối lượng bằng 115g (hiệu suất 86,2%). Các mẫu khác nhau được xác định trong Bảng 2 dưới đây được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp này.

Bảng 2. Nhận biết các mẫu được tổng hợp trong axetonitril

| Số mẫu | Axetonitril (ml)    | Rửa lần cuối* | Hình thái                     |
|--------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| 523-48 | 100 (+ toluen 50ml) | NaOH          | Hình cầu/cụm, màu vàng        |
| 523-49 | 50 (+ nước 150ml)   | NaOH          | Hình cầu, màu vàng/màu da cam |
| 523-59 | 225ml               | NaOH          | Hình cầu, trắng               |
| 523-60 | 190ml               | NaOH          | Hình cầu, trắng               |

\*sau khi rửa 4 lần bằng NaOH 0,2%, 1 lần bằng AcOH 1% sau đó rửa 1 lần bằng nước.

#### Ví dụ 4. Điều chế MIP-OTA trong toluen ở quy mô lớn

Quá trình điều chế được thực hiện trong thiết bị phản ứng dung tích 3l với bốn cổ có nắp, được lắp máy khuấy cơ học với hai cánh khuấy được lắp ở đáy và ở thân thiết bị, bộ gia nhiệt bằng điện, nhiệt kế, phần nhỏ giọt dung tích 1,5l với thiết bị cân bằng không khí và đầu dẫn nitơ, và bộ phận ngưng tụ hồi lưu được lắp thiết bị

đếm bọt để kiểm soát dòng nitơ. Các chất phản ứng sau được nạp vào thiết bị phản ứng: 54,54 g (154 mM) N-(3,5-diclo-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanin (mẫu OTA), 25ml (231 mM) 2-vinylpyridin, 18,7ml (154,0 mM) etylen glycol monometacrylat, 363 g (1,925 M) etylen glycol dimetacrylat, 770ml toluen và 5,0g (30,8 mM) AIBN. Bỏ sung 1,5l toluen qua phễu nhỏ giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh và khí hòa tan được loại bỏ bằng cách cho đi qua dòng nitơ mạnh ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 45 phút và khi cho đi qua toluen lần thứ nhất được đặt trong phễu nhỏ giọt, và sau đó cho qua thể tích trống của thiết bị phản ứng. Dòng nitơ nhẹ được duy trì trong thời gian polyme hoá. Quá trình polyme hoá được khơi mào bằng cách gia nhiệt hỗn hợp phản ứng lên tới nhiệt độ 55°C. Sau 15 phút, độ nhớt của hỗn hợp tăng lên và việc khuấy trở nên kém hiệu quả. Ở thời điểm này, bỏ sung thêm một thể tích toluen (ở nhiệt độ môi trường xung quanh) qua phễu nhỏ giọt. Việc bỏ sung được thực hiện với tốc độ đủ nhanh để ngăn ngừa việc gia nhiệt quá mức cho hỗn hợp do tính chất tỏa nhiệt của phản ứng và giữ cho độ nhớt của hỗn hợp phản ứng đủ thấp để việc khuấy đạt hiệu quả trong thời gian tạo thành và phân tách các khối cầu polyme. Duy trì nhiệt độ hỗn hợp nằm trong khoảng từ 60°C đến 70°C và tiếp tục khuấy trong 5 giờ nữa và sau đó hỗn hợp được để yên mà không cần khuấy ở nhiệt độ môi trường cho đến ngày tiếp theo. Sau đó, 1,75l lớp toluen được lắng gạn, từ các hạt MIP và các hạt MIP toluen ướt được nghiền và chuyển tới bình cầu bay hơi kiểu quay dung tích 2,0l. Phần lớn toluen (khoảng 0,45l) mà được giữ bên trong các hạt MIP được chưng cất hoàn toàn từ các khối cầu MIP dưới áp suất giảm nhẹ và ở nhiệt độ dưới 70°C. Ở thời điểm kết thúc việc loại bỏ toluen, sản phẩm dạng bột tạo thành có xu hướng tạo ra bụi. Ở thời điểm này, ngừng cho bay hơi và các hạt MIP được rửa bằng 2 phần etanol, mỗi phần với thể tích 500ml. Sau đó, khoảng 0,75l etanol được lắng gạn từ chất rắn và được làm bay hơi để tạo thành 30g (55%) mẫu OTA được thu hồi và 700ml etanol được thu hồi. Sau đó, chất rắn mịn màu trắng được rửa 4 lần bằng 0,5l NaOH có nồng độ 0,2% khối lượng/thể tích sau đó rửa một lần bằng 500ml axit axetic có nồng độ 1% thể tích/thể tích và một lần bằng 500ml nước DI. Sau đó, OTA-MIP “ướt” tạo thành được làm khô trong 24 giờ trong lò sấy phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 80°C. Thu được 411,4g (hiệu suất 96,6%) sản phẩm dạng bột màu trắng và phân loại bằng cách sử dụng sàng chuẩn. Phương pháp này có thể được sử dụng để tổng hợp các

mẫu khác nhau được xác định trong bảng 3. Chi tiết về sự phân phối kích thước được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 3. Nhận biết các mẫu được tổng hợp trong toluen hoặc rượu polyvinyllic (được viết tắt là PVA)

| Số mẫu    | Toluen hoặc PVA(ml)  | Rửa lần cuối | Hình thái                 |
|-----------|----------------------|--------------|---------------------------|
| 514-37/39 | 150ml Toluen         | NaOH*        | Hình cầu/cụm, trắng       |
| 523-40    | 5 ml PVA +100ml nước | NaOH*        | Hình cầu/cụm, trắng       |
| 514-41    | 5ml PVA+ 50ml nước   | NaOH*        | Hình cầu/cụm, xanh lá cây |
| 514-42/44 | 388+776ml toluen     | NaOH*        | Hình cầu/cụm, trắng       |

\* rửa 4 lần bằng với NaOH 0,2% sau đó rửa 1 lần bằng AcOH 1% và 1 lần bằng nước.

Bảng 4. Sự phân bố kích thước của MIP-OTA được tạo thành

| Phân loại thích cỡ                  | Phân đoạn khối lượng (g) | % khối lượng MIP-OTA |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| >106 $\mu\text{m}$                  | 212,81                   | 51,8                 |
| 45 $\mu\text{m}$ -106 $\mu\text{m}$ | 127,72                   | 31,1                 |
| 20 $\mu\text{m}$ -45 $\mu\text{m}$  | 56,97                    | 13,9                 |
| <20 $\mu\text{m}$                   | 13,28                    | 3,2                  |

Ví dụ 5. Quá trình tổng hợp/polyme hóa MIP-OTA và NIP được khơi mào bằng UV và nhiệt độ thấp

Thiết lập phản ứng quang hóa. Giếng đo UV quang hóa, bằng thạch anh (Ace Glass, Catalogue 7856-10) được lắp trong đèn UV 450 Oat (ACE Glass, Catalogue 7825-34) và nguồn cung cấp điện năng 450 Oat (ACE Glass, Catalogue 7830-58) được gắn vào bể làm lạnh tuần hoàn WKL 230 LAUDA (do Brinkmann Instruments, Inc. cung cấp), và làm lạnh nước xuống nhiệt độ 4°C thực hiện qua lớp phủ lỗ khi bật đèn UV.

Quá trình polyme hoá (Bảng 5) Các monome, khuôn, chất khơi mào (IABN) và chất liên kết ngang được đặt vào chai polyetylen trong mờ, (kiểu Nalgene® 2105) và dòng Argon được cho đi qua hỗn hợp trong 15 phút để loại bỏ hoàn toàn oxy, mà được biết là để ức chế việc polyme hoá gốc tự do. Sau đó, chai được nút

kín và được cho vào giếng đo, ở vị trí trung tâm của đèn UV, và ngâm, cùng với thiết lập phản ứng quang hóa, trong bồn nước đá. Nước lạnh được cho đi qua chụp đèn, khi đèn đã được bật, và duy trì việc chiếu tia hỗn hợp phản ứng trong 4 giờ (thủy tinh an toàn với tia UV được yêu cầu trong thời gian đèn UV được bật). Nước đá được bổ sung thêm, và lượng nước dư được rút ra từ bồn trong quá trình polyme hoá UV, để bồn nước được duy trì ở nhiệt độ 4°C. Sau khi hoàn tất quá trình polyme hoá, chai được mở ra, polyme được ép và được nghiền thành các mẫu nhỏ được rửa: một lần bằng ethanol, mười lần bằng natri hydroxit 0,2%, một lần bằng axit axetic 1% và ba lần bằng ethanol, để loại bỏ khuôn từ polyme và đảm bảo tối đa hoạt tính của MIP mà cuối cùng là được làm khô trong lò sấy phòng thí nghiệm để loại bỏ ethanol dư. Hiệu suất của MIP-OTA lần lượt bằng 56,7% và 49% đối với #555-54A và 555-54B.

Bảng 5. Nhận biết các mẫu MIP-OTA được tổng hợp bằng cách khơi mào phản ứng bằng nhiệt độ thấp và tia UV

| MIP-OTA | Styren (mM) | 2-Vinyl-Pyridin (mM) | Etylenglycol Monometacrylat (mM) | Etylenglycol Dimetacrylat (mM) | IABN (mM) | Khuôn OTA (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           |

Ví dụ 6. Khả năng cang hóa của MIP đối với độc tố nấm – được áp dụng cho OTA

Các polyme MIP được tạo ra trong toluen-xyclohexan, axetonitril hoặc toluen được thử nghiệm đối với độc tố nấm OTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) để loại bỏ độc tố nấm OTA ra khỏi môi trường lỏng hoặc bán lỏng thông qua các tương tác hóa học. MIP được tạo ra được sử dụng theo sáng chế để biểu thị sự khác biệt về ái lực cang hóa của độc tố nấm OTA và để đánh giá tính đặc hiệu của vật liệu. Bổ sung 12,5mg MIP vào thiết bị lọc siêu ly tâm Amicon (5000 Da). Tiến hành điều chế cùng với mẫu trống không chứa vật liệu MIP và mẫu đối chứng dương chỉ chứa độc tố OTA được thử nghiệm. Thử nghiệm cang hóa được tiến hành trong chất đệm xitrat 50mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu được ủ trong thời gian 90 phút trên máy lắc kiểu quay quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) có vận tốc 150 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Ba nồng độ OTA cuối cùng

bằng 50, 100, 250 phần tỷ (ppb) được thử nghiệm với hệ trong thể tích cuối cùng bằng 12,5ml. Sau khi ủ, các ống vi ly tâm được ly tâm ở vận tốc 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom trong lọ nhỏ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, để ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm với lọ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu bộ dò diot dãy phát huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa) theo các phương pháp chuẩn (xem, ví dụ, Entwistle A.C., Sēiams A.C., Mann P.J., Slack P.T., Gilbert J., 1995. Liquid chromatography method with immunoaffinity column cleanup for determination of ocratoxin A in barley: Collaborative study. Journal of AOAC, 83: 1377-1383).

Các kết quả (xem Bảng 5) cho thấy cả MIP được điều chế bằng khuôn OTA và không cần có khuôn (NIP) ở nồng độ bằng 1,00g/l có ái lực rất cao đối với phân tử độc tố nấm OTA ở độ pH 4,0. Theo phương pháp điều chế, MIP được tạo ra sau khi polyme hoá kết tủa (được xác định là #523-31 được tổng hợp trong toluen; #523-34, -35, -36 được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-xyclohexan; và #523-48 được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-axetonitril) có hiệu quả cang hóa trên 98,8% trong khi đó MIP được tạo ra sau quá trình polyme hoá nhũ tương (được xác định là #523-40 và -41 được tổng hợp trong nước và rượu polyvinyllic; và 49 được tổng hợp trong axetonitril) có ái lực thấp hơn dưới 63%. Phân tử NIP cũng có thể ảnh hưởng đến 98,8% hiệu quả cang hóa. Ở giai đoạn này, nhóm polyme hoá kết tủa không có sự khác biệt đáng kể giữa các NIP và các MIP trong khi đó nhóm polyme hoá nhũ tương có sự khác biệt đáng kể giữa MIP và NIP và cả giữa các MIP.

Hai bước rửa liên tiếp trong dung dịch 15% etanol/natri hydroxit, axit axetic 1% được sử dụng để đánh giá khả năng của hai nhóm MIP trong việc duy trì sự tương tác và để tính toán độ bền của sự cang hóa (xem Bảng 6). Nhóm polyme hoá nhũ tương thể hiện việc giải phóng mạnh OTA từ MIP cũng như việc giải phóng khuôn còn dư được tách rửa đồng thời với độc tố nấm OTA được hấp phụ với tỷ lệ % âm. Do đó, sáng chế đề xuất rằng phương pháp polyme hoá nhũ tương là không thích hợp để tạo ra độ hấp phụ thích hợp đối với phân tử OTA. Sáng chế còn đề xuất rằng nhóm polyme hoá kết tủa có ái lực cao đáng kể đối với OTA cho phép sự giải hấp tối đa chỉ bằng 26,3% của phân tử OTA đối với MIP được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-axetonitril mà không bị ảnh hưởng của lượng chất khuôn dư.

Bảng 6. Hoạt tính càngh hóa của MIP và NIP được tổng hợp trong toluen, axetonitril và hỗn hợp toluen-xyclohexan đối với ocratoxin A và khả năng ổn định của sự tương tác sau hai lần rửa liên tiếp bằng etanol/natri hydroxit 15%

| Số mẫu                  | Giá trị vẫn được hấp phụ trung bình (%) |           |           | Giá trị giải hấp trung bình (%) |           |           |
|-------------------------|-----------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|-----------|-----------|
|                         | Ban đầu                                 | Rửa lần 1 | Rửa lần 2 | Ban đầu                         | Rửa lần 1 | Rửa lần 2 |
| NIP 523-31 <sup>#</sup> | 98,84                                   | 92,52     | 86,66     | 1,162                           | 7,478     | 13,342    |
| MIP 523-34 <sup>#</sup> | 98,95                                   | 93,05     | 89,50     | 1,048                           | 6,955     | 10,500    |
| MIP 523-35 <sup>#</sup> | 99,04                                   | 90,60     | 86,09     | 0,963                           | 9,397     | 13,915    |
| MIP 523-36 <sup>#</sup> | 99,00                                   | 86,76     | 82,83     | 1000                            | 13,238    | 17,175    |
| MIP 523-48 <sup>#</sup> | 99,73                                   | 85,76     | 73,71     | 0,273                           | 14,242    | 26,293    |

<sup>#</sup> kết tủa polyme hoá

#### Ví dụ 7. Chuẩn độ lượng MIP để càngh hóa ocratoxin A

Tiến hành thử nghiệm chuẩn độ để đánh giá tỷ lệ kết hợp của MIP, từ 0,01g/l đến 1,00g/l (hoặc tỷ lệ kết hợp từ 0,001 đến 0,1%). Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống không chứa vật liệu MIP và mẫu đối chứng dương chứa chỉ độc tố OTA được thử nghiệm. Thử nghiệm sự càngh hóa được tiến hành trong chất đệm xitrat nồng độ 50mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu được ủ trong 90 phút trên máy lắc kiểu quay theo quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) ở 150 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Ba nồng độ OTA cuối cùng là 50, 100, 250 ppb được thử nghiệm với hệ trong thể tích cuối cùng bằng 12,5ml. Sau khi ủ, ống vi ly tâm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom trong lọ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, để ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm với lọ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu bộ dò và dây diot phát huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được càngh hóa) theo các phương pháp chuẩn (xem, ví dụ, Entwistle et al., 2000 như đã được nêu trên đây).

Như thể hiện trên Fig.3, ở nồng độ 0,05g/l giá trị càngh hóa đạt hiệu quả tối ưu trên 80% và sự càngh hóa có giá trị trung bình bằng  $86,4 \pm 1,5\%$ . Mức độ ảnh hưởng

bao gồm các hợp chất MIP được đánh giá bằng cách thử nghiệm hoạt tính cang hóa ở nồng độ 0,010, 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,50, và 1,00g/l của MIP #523-34 (tổng hợp trong hỗn hợp toluen-xyclohexan) và #523-60 (tổng hợp trong axetonitril) trên 50, 100, 200 ppb OTA trong điều kiện đệm axit (pH 4,0). Kích thước MIP được điều chỉnh có đường kính cỡ hạt nằm trong khoảng từ 45 đến 106  $\mu\text{m}$  do phân đoạn này có kết quả cang hóa tốt nhất và có tỷ lệ cao nhất của các hạt kích thước trong tổng sản phẩm MIP được tổng hợp.

Mỗi MIP, #523-34 và #523-60 có thể hấp phụ  $91,53 \pm 10,86$  và  $81,75 \pm 23,67\%$  OTA, lần lượt là giá trị trung bình của tổng mức độ cang hóa độc lập từ mức bao gồm. Điểm đổi hướng được tìm thấy trên đường cong cang hóa của mức độ bao gồm MIP là 0,05 và 0,10 g/l tương ứng đối với mẫu #523-34 và #523-60. Giá trị trung bình của ái lực cang hóa đối với mức bao gồm nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1,00 và nằm trong khoảng từ 0,10 đến 1,00g/l đối với #523-34 lần lượt bằng  $96,31 \pm 2,23$  và  $97,39 \pm 0,70\%$ . Giá trị trung bình của ái lực cang hóa đối với mức bao gồm nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1,00 g/l và nằm trong khoảng từ 0,10 đến 1,00 g/l đối với #523-60 lần lượt bằng  $94,51 \pm 6,54$  và  $97,76 \pm 0,91\%$ . Do đó, sáng chế đề xuất rằng MIP được tổng hợp trong hỗn hợp toluen-xyclohexan là có lợi đối với tỷ lệ ái lực cao hơn đối với sự cang hóa OTA ở mức bao gồm 0,01g/l với  $72,42 \pm 2,58\%$  của tỷ lệ ái lực trong khi đó mẫu được sản xuất với axetonitril ít hữu hiệu hơn với tỷ lệ ái lực bằng  $47,40 \pm 6,08$  và  $84,77 \pm 1,96$  lần lượt ở mức bao gồm 0,01 và 0,05g/l của sản phẩm.

Ví dụ 8. Ái lực của MIP và NIP khác nhau và xác định đặc điểm tính đặc hiệu đối với ocratoxin A

Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án theo sáng chế để đánh giá ái lực của các NIP/MIP khác nhau được tổng hợp trong axetonitril hoặc toluen làm dung môi được sử dụng để polyme hoá. Các mẫu #523-31 (toluen) và #523-59 (axetonitril) được tổng hợp mà không có khuôn OTA bất kỳ (được định nghĩa là Non Imprinted Polymer); các mẫu #523-34 (hỗn hợp của toluen-xyclohexan) và #523-60 (axetonitril) được polyme hóa xung quanh khuôn tương tự OTA. Sau đó, các mẫu được cho qua sàng sử dụng các sàng có kích thước cắt khác nhau. Kích thước của dây hạt được thử nghiệm là như được nêu trong Ví dụ 4. Sự

sản xuất MIP chủ yếu tạo ra các hạt kích thước đường kính nằm trong khoảng từ khoảng 45 và 106  $\mu\text{m}$  (như được thể hiện trên Fig.4). Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống chứa vật liệu MIP và đối chứng dương chỉ chứa độc tố OTA cần được thử nghiệm. Thử nghiệm sự cang hóa được tiến hành trong chất đệm xitrat 50 mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu đều được ủ trong 90 phút trên máy lắc quay theo quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) ở 150 vòng/phút được giữ ở nhiệt độ 37°C. Ba nồng độ OTA cuối cùng là 50, 100, 250 ppb được kiểm tra với hệ, trong thể tích cuối cùng là 12,5ml. Sau khi ủ, ống vi ly tâm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom trong các lọ nhỏ HPLC màu hồ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tính hiệu của bộ dò dãy diot và đo huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa).

Sự so sánh ái lực OTA cho thấy chỉ có sự khác nhau hạn chế được đánh giá trên một chu trình cang hóa mà không có các bước rửa liên tiếp trên 3 nồng độ độc tố khác nhau (50, 100, 250 ppb). Chỉ có mẫu #523-59 được làm từ NIP mà không sàng có khả năng cang hóa thấp hơn ở từng nồng độ pH của OTA. Giá trị cang hóa thấp hơn cũng được phát hiện thấy đối với mẫu MIP #523-34 đối với các giá trị nồng độ 50 ppb của OTA đặc biệt là đối với các kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 45 và đường kính nhỏ hơn kéo dài từ 45 đến 106  $\mu\text{m}$ . Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng kích thước của các hạt MIP được sản xuất theo các phương pháp theo sáng chế có ít tác động đến ái lực hấp phụ tổng cộng đối với OTA, với ái lực dao động trong trường hợp xấu nhất nằm trong khoảng từ 78 đến 99% của tốc độ cang hóa. NIP có tính chất cang hóa ít hữu hiệu hơn so với MIP giải thích tính đặc hiệu của MIP để tương tác với độc tố nấm OTA.

Ví dụ 9. Bắt giữ OTA được pha trong rượu vang sử dụng MIP và lọc trực tiếp ocratoxin A đã được pha trong rượu vang sử dụng thiết bị lọc giống như chiết pha rắn (SPE) MIP

Quy trình chiết chuẩn trên mẫu rượu vang trắng (Chardonnay 2005 – California) sử dụng cột ái lực miễn dịch được thử nghiệm. Tiến hành chiết trên mẫu rượu vang tinh khiết cũng như trên mẫu rượu vang được pha với 5, 10, 20 ppb tinh

thể OTA tinh khiết. Giá trị trung bình nồng độ ban đầu của rượu vang là  $1,676 \pm 0,269$  ppb OTA (ví dụ, như được xác định theo quy trình chiết chuẩn). Việc thu hồi 5 ppb mẫu được pha là 100% và xung quanh 77,7% đối với 10 ppb.

Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống không chứa vật liệu MIP và đối chứng dương chỉ chứa độc tố OTA cần được kiểm tra. Thử nghiệm cang hóa được thực hiện trong chất đệm xitrat 50 mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu đều được ủ trong 90 phút trên máy lắc quay theo quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) ở tốc độ 150 vòng/phút được giữ ở nhiệt độ 37°C. Ba nồng độ OTA cuối cùng là 50, 100, 250 ppb được kiểm tra với hệ trong thể tích cuối cùng là 12,5ml. Sau khi ủ, ống vi ly tâm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom trong các lọ nhỏ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dãy diot và đo huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa).

Sự cang hóa của OTA từ rượu được đánh giá bằng cách sử dụng quy trình chuẩn để cang hóa độc tố nấm trên MIP thực hiện tốt nhất ban đầu #523-34 (hỗn hợp phenol-xyclohexan). Sự cang hóa thay đổi từ  $43,29 \pm 4,08$  đến  $67,15 \pm 4,94$  đến  $91,75 \pm 1,59$  đến  $95,612 \pm 1,201\%$  tính trung bình đối với mức bao gồm 0,05, 0,10, 0,50, và 1,00 g/l, một cách tương ứng. Sự chuẩn độ MIP xác định ái lực tối ưu khi được sử dụng ở mức bao gồm 0,5 và 1,0 mg/ml (xem Fig.5).

Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp sử dụng chúng để giữ/hấp phụ độc tố nấm (ví dụ, OTA) từ rượu vang (ví dụ, các hạt MIP mà được sử dụng (ví dụ, trong điều kiện lắc) để liên kết một cách có hiệu quả với và hấp phụ độc tố nấm từ rượu vang).

Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất MIP (ví dụ, được tạo ra theo phương pháp được mô tả ở đây) để giữ và/hoặc hấp phụ độc tố nấm (ví dụ, một hoặc nhiều loại độc tố nấm khác nhau (ví dụ, có mặt trong môi trường lỏng hoặc dung dịch chiết từ chất nền phức tạp (ví dụ, thức ăn cho gia súc, thức ăn, thực vật, động vật, v.v.)).

Thiết bị lọc giống như chiết pha rắn (như SPE) được tạo ra đối với lượng bao hàm tương đương 0,1 g/l của MIP. Lọ thủy tinh được silan hóa được yêu cầu để đảm bảo khả năng ổn định của OTA trong dung môi gốc nước và để ngăn ngừa sự tương tác không đặc hiệu bất kỳ giữa OTA và lọ thủy tinh. Phương pháp silan hóa được áp dụng cho các bộ lọc và ống ni lông và PTFE/PE dựa trên các phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Entwistle et al., 2000 như được trích dẫn trên đây). Các lọ nhỏ và các bộ lọc được điều chế bằng cách làm đầy chúng hoặc ngâm chúng với chất phản ứng silan hóa (SURFASIL). Sau 1 phút, chúng được rửa ngay bằng toluen sau đó hai lần bằng metanol sau đó ba lần bằng nước và làm khô. Sự silan hóa được tiến hành và tạo ra sự giảm sâu sắc tương tác của vật liệu với phân tử OTA như được tiến hành trong lĩnh vực. Ví dụ, sự nhiễu ít hơn 5% được quan sát (ví dụ, trái lại từ khoảng 16 đến 26% sự nhiễu mà không silan hóa trước vật liệu khi các bộ lọc PE/PTFE được sử dụng). Ni lông không thích hợp cho việc silan hóa. Toàn bộ các ống polypropylen được thay thế bằng các ống thủy tinh được silan hóa.

Thiết bị lọc giống như SPE được tạo ra để bắt giữ OTA từ rượu vang sau khi lọc trực tiếp mẫu qua cột. Công hiệu của MIP được kiểm tra đối với sự thanh thải OTA từ rượu vang (Chardonnay 2005 – California) được pha 5 và 10 ppb OTA. Các kết quả đã chứng tỏ đối với 5 và 10 ppb OTA được pha,  $55,41 \pm 5,542$  và  $56,937 \pm 5,739\%$  sự giảm ngay nồng độ OTA của rượu vang, một cách tương ứng. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất MIP đặc hiệu độc tố nấm (ví dụ, được tạo ra theo các phương pháp được mô tả ở đây) mà được sử dụng với thiết bị lọc SPE hoặc giống như SPE để loại bỏ độc tố nấm ra khỏi chất lỏng (ví dụ, rượu vang) chứa độc tố nấm.

Ví dụ 10. Bắt giữ ocratoxin A sử dụng thiết bị lọc giống như chiết pha rắn (SPE) MIP được khơi mào bằng UV nhiệt độ thấp và được khơi mào bằng nhiệt và đánh giá độ chọn lọc đối với các thành phần quan trọng của rượu vang

Thiết bị lọc giống như chiết pha rắn (như SPE) được tạo ra đối với lượng bao hàm tương đương 0,1 g/l của MIP. Lọ thủy tinh được silan hóa được yêu cầu để đảm bảo khả năng ổn định của OTA trong dung môi gốc nước và để ngăn ngừa sự tương tác không đặc hiệu bất kỳ giữa OTA và lọ thủy tinh. Phương pháp silan hóa được áp dụng cho các bộ lọc và ống bằng ni lông và PTFE/PE dựa trên các phương

pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Entwistle et al., 2000 như được trích dẫn trên đây). Các lọ nhỏ và các bộ lọc được điều chế bằng các làm đầy chúng hoặc ngâm chúng với chất phản ứng silan hóa (SURFASIL). Sau 1 phút, chúng được rửa ngay bằng toluen sau đó hai lần bằng metanol sau đó ba lần bằng nước và làm khô. Sự silan hóa được tiến hành và tạo ra sự giảm sâu sắc sự tương tác của vật liệu với phân tử OTA như được tiến hành trong lĩnh vực. Ví dụ, quan sát thấy sự nhiễu ít hơn 5% (ví dụ, trái lại từ khoảng 16 đến 26% sự nhiễu mà không silan hóa trước vật liệu khi sử dụng các bộ lọc PE/PTFE). Ni lông không thích hợp cho việc silan hóa. Tất cả các ống polypropylen đều được thay thế bằng các ống thủy tinh được silan hóa.

Dung dịch gốc chứa mười hai hợp chất gồm polyphenol: axit caffeic (Caf A), catechin hydrat (CH), epicatechin (ECH), axit ferulic (Fer), axit trans-3-hydroxyxinnamic (3-HCA), axit 2-hydroxyxinnamic (2-HCA), malvidin-3-galactosid clorua (Mal), myricetin (Myr), quercetin dehydrat (QH), trans-resveratrol (Res), rutin trihydrat (Rut) và axit indol-3-axetic (IAA) (Sigma, St Louis, MO, USA) được điều chế bằng cách hòa tan trong metanol (mức HPLC) và bổ sung nước và 85% axit o-phosphoric để làm giảm độ pH đến khoảng 3,0. Phần dịch nổi được thu gom trong các lọ nhỏ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của chất phân tích với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dây điện và đo huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa). Sử dụng cột ODS Spherisorb HPLC pha đảo C18 5  $\mu$ m, 4,6  $\mu$ m x 250 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA) được điều nhiệt ở nhiệt độ 30°C. Bước sóng kích thích và phát xạ được điều chỉnh ở 225 nm và 365 nm, một cách tương ứng. Bộ dò dây điện quang-UV được điều chỉnh đến kiểu quét đầy đủ từ bước sóng từ 210 đến 799 nm. Pha động gồm nước/axit phosphoric (99,5%:0,5%; thể tích/thể tích) và (B) axetonitril (mức HPLC) /nước/axit phosphoric (50%/49,5%/0,5%; thể tích/thể tích/thể tích).

Tất cả các MIP đều thể hiện sự hấp phụ tốt của OTA trong dung dịch chất đậm, tất cả đều có sự hấp phụ trên 80%. MIP 555-52 thể hiện sự hấp phụ tốt nhất, gần 100%. Ngạc nhiên là, OTA giữ được sự hấp phụ trong quá trình rửa bằng chất đậm của tất cả các MIP, nhưng bị giải hấp trong quá trình rửa metanol đặc biệt từ

MIP #555-52 và #523-34 được khơi mào bằng nhiệt và đáng kể ở nồng độ OTA cao nhất. OTA giữ được sự hấp phụ đối với MIP #555-54A và #555-54B được khơi mào bằng UV và nhiệt độ thấp trong lần rửa metanol tốt hơn so với MIP được khơi mào bằng nhiệt, với sự hấp phụ trên 50% tính trung bình đối với MIP được khơi mào bằng UV được giữ lại qua lần rửa bằng metanol (xem Fig.6).

Các lợi ích sức khỏe của hợp chất polyphenol chống oxy hóa trong rượu vang đã được chứng tỏ rõ bằng tài liệu. Trong phương pháp lọc độc tố nấm trong chất lỏng (ví dụ, rượu vang) như OTA, cũng cần bản đề đánh giá tác động của vật liệu càng hóa đến một số hợp chất có lợi như polyphenol. Theo một số phương án và như được chứng tỏ bằng tài liệu ở đây (Ví dụ xem, Ví dụ 6 đến Ví dụ 9) sự polyme hóa được khơi mào bằng nhiệt tạo ra MIP #555-52 và #523-34 có thể tương tác một cách có hiệu quả với độc tố nấm OTA có mặt trong môi trường chất lỏng, với nồng độ hấp phụ lớn hơn 95% trong khi đó sự polyme hoá được khơi mào bằng UV và nhiệt độ thấp tạo ra MIP #555-54 và #555-54X tạo ra hiệu quả hấp phụ nằm trong khoảng từ 80 đến 92% của hiệu quả càng hóa (Fig.6).

Theo một số phương án, chế phẩm MIP được khơi mào bằng UV và nhiệt độ thấp theo sáng chế thể hiện tính đặc hiệu đối với OTA khi được đánh giá với hỗn hợp của các polyphenol khác nhau, anthoxyanin, và axit indol-3-axetic. Trong trường hợp này, MIP #555-54A và #555-54B thể hiện sự hấp phụ cao của OTA (lớn hơn 80%) và ngăn ngừa tại cùng thời điểm sự hấp phụ của polyphenol hoặc axit indol-3-axetic (ví dụ, mà tạo ra các đặc tính chống oxy hóa và khả năng nhận cảm (ví dụ, của rượu vang)). Trong quá trình nghiên cứu MIP được khơi mào bằng UV, thời gian ủ được loại bỏ và các mẫu rượu vang và các dung dịch rửa được đẩy qua MIP hoặc lọc ngay lập tức. Quan sát thấy sự hấp phụ rất ít (Fig.7). Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất MIP mà thể hiện tính đặc hiệu đối với độc tố nấm (ví dụ, OTA) trong khi đồng thời thể hiện sự liên kết ít hoặc không liên kết với (ví dụ, sự hấp phụ của) các hợp chất có lợi (ví dụ, polyphenol và/hoặc axit indol-3-axetic). Sự định lượng myricetin, resveratrol và rutin dễ thiên về sự không chắc chắn do sự có mặt của chúng ở nồng độ rất thấp gần với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của thiết bị phân tích HPLC dẫn đến kết quả là độ lệch chuẩn và giá trị âm lớn. Theo sáng chế, MIP được khơi mào bằng UV do đó có hiệu quả trong

việc bắt giữ OTA và không làm giảm nồng độ polyphenol của môi trường rượu vang lỏng chứng tỏ tính đặc hiệu của vật liệu MIP được tạo ra.

Ví dụ 11. Phủ MIP trên lưới sợi thủy tinh để ứng dụng làm thiết bị lọc

Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án theo sáng chế để kiểm tra sự phủ lưới sợi thủy tinh với MIP-OTA (xem Fig.8). Nhiều nồng độ của OTA được sử dụng để xác định ái lực của mỗi chế phẩm. Các MIP khác nhau được tạo ra được tóm tắt trong Bảng 7 dưới đây. Ba sàng lưới được phủ bằng MIP với các nồng độ khác nhau của chất phản ứng liên kết ngang, mà ảnh hưởng đến độ giòn. (các dung dịch monome 1, 2, 3 và 1H). Lưới được điều chế từ MIP đã được phủ được cắt dựa trên khối lượng trước khi và sau khi phủ MIP để tạo ra 50, 100 và 200 mg MIP được đánh giá bằng cách cân vi sai. Thử nghiệm càng hóa được tiến hành với lưới được phủ MIP được nhúng vào ống falcon dung tích 20 ml, với sự xác định các đặc tính càng hóa đối với OTA trong môi trường rượu vang sau 90 phút ủ sử dụng máy lắc quay. Một ml từ ống chứa dung dịch rượu được pha với ba nồng độ OTA khác nhau được xác định trước và sau khi ủ với bộ lọc lưới MIP-OTA. Mẫu được thu gom trong các lọ nhỏ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm với lọ nhỏ, và được tính toán với HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dây diot và đo huỳnh quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được càng hóa).

Bảng 7. Điều kiện polyme hóa đối với chất bao của MIP trên lưới sợi thủy tinh

| Các thông số                    | Chức năng                      | Dung dịch monome |          |          |               |
|---------------------------------|--------------------------------|------------------|----------|----------|---------------|
|                                 |                                | 1                | 2        | 3        | 1H            |
| Chất tương tự ocratoxin A (mg)  | Khuôn                          | 1000             | 500      | 250      | 1000          |
| 2-Vinyl pyridin (μl)            | Bazơ để tạo thành muối với OTA | 1000             | 500      | 250      | 1000          |
| Etylen glycol Dimetacrylat (ml) | Chất liên kết ngang            | 5                | 5        | 5        | 5             |
| 2-Hydroxy etyl metacrylat (μl)  | Phân tử liên kết               | 800              | 400      | 200      | 800           |
| Azobisisobutyronitril (mg)      | Chất khơi mào polyme hoá       | 66               | 55       | 50       | 66            |
| Sự lưu hóa (lò)                 | Để làm khô lưới                | 65°C             | 65°C     | 65°C     | 80-90°C       |
| Dung môi                        | Hòa tan chất rắn               | Không có         | Không có | Không có | 500 μl toluen |

Các kết quả cho thấy rằng sự càng hóa tối đa chống lại OTA phụ thuộc vào mức bao gồm MIP. Thu được sự càng hóa tối đa với 500 mg khuôn, 250 mg vinyl-pyridin và 200 mg hydroxyl etyl metacrylat tạo ra MIP mà hấp phụ lên đến 46,5% OTA có nồng độ 100 ppb trong rượu vang (xem Fig.9). Ngược lại, cùng thử nghiệm được tiến hành với polyme NIP được xử lý tương tự được phủ trên sợi thủy tinh cho thấy ít hơn 15% (giảm xuống 1%) hiệu quả càng hóa phụ thuộc vào quy trình điều chế (xem Fig.10) nhờ đó minh họa cho tính đặc hiệu của vật liệu MIP-OTA đối với OTA.

#### Ví dụ 12. Khả năng lưu giữ sắc ký của MIP

MIP #523-34 (được tổng hợp với hỗn hợp toluen-xyclohexan) được sử dụng pha tĩnh của cột HPLC 4,6 × 150 mm sau khi đóng gói vật liệu sử dụng nghiền siêu âm trong bồn nước và sau đó áp dụng tốc độ chảy liên tục qua đêm là 5,0ml/phút axetonitril chạy qua cột (MIP sử dụng bơm hai thành phần HPLC Waters Alliance (Waters Corp, Milford, MA, USA)). Áp suất cột được xác định là khoảng 400 psi và có thể so sánh được với các điều kiện HPLC khác được mô tả trong các tài liệu khác (xem, ví dụ, Baggiani et al., 2002 như được trích dẫn trên đây; Jodlbauer J.,

Maier N.M., and Lindner W. *Journal of Chromatography A*, 945: 45-63; Maier N.M., Buttinger G., Welhartizki S., Gavioli E., Lindner W., 2004. *Journal of Chromatography B*, 804: 103-111). Cột được làm ổn định dưới tốc độ dòng axetonitril ở 1,0ml/phút trong 48 giờ và được rửa kỹ bằng metanol 99% và tetraethylamin 1% để loại bỏ khuôn OTA vẫn còn ra khỏi cột. Sự xác định đặc điểm của phân tích HPLC-PDA-FID trước của OTA sử dụng cột MIP được tiến hành.

Sự tồn tại của cột được đánh giá trong các điều kiện pha động khác nhau và trong các thiết lập gradien khác nhau chạy qua cột được giữ ở nhiệt độ không đổi 30°C. Một vài gradien được kiểm tra bao gồm 100% nước và chuyển tiếp đến 100% axetonitril hoặc 100% metanol và ngược lại; và còn sử dụng tetraethylamin 1% trong metanol đến metanol 100% trong 60 phút. Cột tồn tại mà không có sự biến đổi bất kỳ trong pha tĩnh sau khi tăng áp suất lên đến 1600 psi giải thích sự tồn tại của cột ở áp suất cao. Sử dụng sự phun axeton để đánh giá thể tích trống của cột với sự rửa giải chất phân tích trong thời gian 2 phút. Sự rửa giải OTA được đánh giá bằng cách sử dụng cùng điều kiện đã được sử dụng cho profin rửa giải ODS C18 thông thường (85% axetonitril). Sự lưu giữ của OTA được đánh giá tại thời điểm 5 phút với cột MIP dưới gradien đẳng dung ly. Để làm tăng thời gian lưu của OTA, gradien được thực hiện mà cho phép sự lưu giữ của OTA để tăng đến 19,5 phút.

Điều kiện cuối cùng được chọn được thể hiện trên Fig.11 và điều kiện gradien được mô tả chi tiết trong bảng liên quan. Hai đỉnh được quan sát thấy, đỉnh chính của OTA rửa giải giữa 17 và 22 phút (ở 63% của axetonitril) và đỉnh thứ hai có liên quan đến phân đoạn OTA được liên kết cao còn lại được giải phóng do bổ sung tetraethylamin 1% vào cột.

#### Ví dụ 13. Tổng hợp khuôn sporidesmin

Điều chế N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyanilin từ axit 2,3-dimethoxybenzoic. Ba trăm ml rượu tert-butyl khan, 50,0 g (274 mM) axit 2,3-dimethoxybenzoic và 28,33 g (280 mM, 39ml) trietylammin khan được nạp vào bình cầu hai cổ, đáy tròn, dung tích 1 L, được lắp phễu nhỏ giọt dung tích 120ml với thiết bị cân bằng áp suất và thiết bị đếm bọt khí, thanh khuấy từ nặng và nhiệt kế. Các chất của bình cầu được khuấy từ và được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong bể dầu. Lượng bằng 77,04 g (280 mM, 60,5ml) của diphenyl phosphorazidat được

bổ sung từng giọt vào hỗn hợp với tốc độ đủ chậm để kiểm soát sự tiến triển của được duy trì qua đêm. Các thành phần dễ bay hơi của hỗn hợp sau đó được làm bay hơi dạng quay trong chân không 30 T và ở nhiệt độ dưới 55°C. Sản phẩm dầu được chuyển vào phễu chiết 1 L và được hòa tan trong hỗn hợp của 500ml xyclohexan và 200ml etyl axetat. Dung dịch được rửa ba lần bằng 200ml nước DI và một lần bằng 200ml natri clorua bão hòa trong nước và được làm khô trên natri sulphat khan trong 15 phút, được lọc và được cô trong thiết bị làm bay hơi dạng quay trong chân không 30 T ở nhiệt độ 80°C. N-tert-butoxycacbonyl-2,3-dimetoxyanilin 67,88 g (hiệu suất 98%) thu được dưới dạng dầu không màu.

TLC, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:xyclohexan (được viết tắt là c-Hex) (1:2); R<sub>f</sub>=0,66 UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng màu vàng tươi.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3319, 2941, 1669, 1601, 1529, 1477, 1459, 1416, 1369 1296, 1258, 1090, 998, 978, 780, 737.

<sup>1</sup>H NMR, (400MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 1,53 s, 9H; 3,86 s, 3H; 3,862 s, 3H; 6,593 dd, J=8,4&1,6 Hz, 1H; 7,004 t, J=8,4&8,0, 1H; 7,135 br s, 1H; 7,725 d, J=8,0 Hz.

Điều chế 2,3-dimetoxyanilin từ N-tert-butoxycacbonyl-2,3-dimetoxyanilin. Thể tích metanol bằng 580ml, 67,88 g (268 mM) N-tert-butoxycacbonyl-2,3-dimetoxyanilin và 66,45ml HCl nồng độ 12,1 M được nạp vào bình cầu dung tích 1 L được lắp thanh khuấy từ và được đặt trong bồn nước có nhiệt độ 50°C. Duy trì gia nhiệt và khuấy trong 2 giờ và sau đó được để với khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Sau đó, sau khi làm nguội dung dịch trong bể đá, thể tích bằng 130,5ml natri hydroxit nồng độ 6,16 M được bổ sung có khuấy.

Metanol được làm bay hơi từ hỗn hợp sử dụng thiết bị làm bay hơi dạng quay ở nhiệt độ thấp hơn 40°C và trong áp suất chân không 30 T. Phần cặn bán rắn được pha loãng bằng 180ml toluen và được lọc. Chất kết tủa được rửa hai lần nữa bằng các phần 180ml của toluen và các dịch lọc được đưa vào phễu chiết 1 L. Lớp bên trên được thu gom và được làm khô bằng natri sulphat, được cô và được chưng cất chân không. Khối lượng bằng 34,6 g 2,3-dimetoxyanilin (hiệu suất 94,0%) được thu gom ở nhiệt độ 105-107°C ở 8 T ở dạng dầu kết tinh, không màu.

TLC, SiO<sub>2</sub>, c-Hex:Tetrahydrofuran (được viết tắt là THF) (6:1); R<sub>f</sub>=0,35 UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng/ màu nâu-xanh lá cây.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3463, 3368, 2939, 1609, 1497, 1475, 1319, 1262, 1226, 1129, 1085, 1050, 999, 773, 729, 694.

<sup>1</sup>H NMR, (400MHz), CDCl<sub>3</sub>, (ppm): 3,75 br s, 2H; 3,83 s, 3H; 3,84 s 3H; 6,34 d, J=8,1 Hz, 1H; 6,38 d, J=8,1Hz, 1H; 6,84 t, J=8,1Hz, 1H.

Tổng hợp ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indol-3-carboxylat từ 2,3-dimethoxyanilin và diethylketomalonat. Dung dịch chứa 69,33 g (398,1mM) diethylketomalonat trong 250 ml toluen được đặt trong bình cầu đáy tròn dung tích 1 L được lắp trong phễu nhỏ giọt với thiết bị cân bằng không khí và que khuấy từ được đặt trong bồn nước đá. Dung dịch chứa 56,769 g (370,6 mM) 2,3-dimethoxyanilin trong 200 ml toluen được nạp vào phễu nhỏ giọt. Bắt đầu khuấy và dung dịch 2,3-dimethoxyanilin được bổ sung từ từ vào bình cầu, với sự làm nguội liên tục và khuấy từ hỗn hợp phản ứng. Sự bổ sung được hoàn tất trong thời gian 4 giờ và hỗn hợp được để làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được để khuấy qua đêm trong thời gian tổng cộng 22 giờ. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 2 giờ và sau đó tăng nhiệt độ của hỗn hợp đến 100°C. Thử tích bằng 25ml sản phẩm chưng cất được thu gom. Thử tích bằng 25ml sản phẩm chưng cất được thu gom, bao gồm 4ml nước và 21ml toluen. TLC SiO<sub>2</sub> (PhMe:THF/6:1, UV, KMnO<sub>4</sub> nóng biểu thị sự có mặt của: diethylketomalonat R<sub>f</sub> 0,86; 2,3-dimethoxyanilin của monoethylketomalonat R<sub>f</sub> 0,66; 2,3-dimethoxyanilin R<sub>f</sub> 0,43; diethylketomalonat monohydrat R<sub>f</sub> 0,30 và sản phẩm mong muốn, ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indol-3-carboxylat R<sub>f</sub> 0,20. Tiếp tục gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C trong 24 giờ, sau thời gian này chất kết tủa màu trắng được tạo thành trong bình cầu. Các chất của bình cầu sau đó được khuấy và được gia nhiệt ở nhiệt độ 80-90°C trong 48 giờ tiếp theo. Sau thời gian này, nó được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và chất kết tủa được lọc ra và được rửa bằng 50 ml toluen. Sau khi làm khô, thu được 16,1 g ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indol-3-carboxylat (hiệu suất 24,0%). Phần dịch lọc được cô trong thiết bị làm bay hơi dạng quay và được cho qua LC trên SiO<sub>2</sub> sử dụng hỗn hợp c-Hex:THF với nồng độ THF nằm trong khoảng từ 7,5 đến 20%. 12,2 g (hiệu suất 18,2%) của sản phẩm khá tinh khiết bổ sung được thu gom.

Mp 150-151°C.

TLC, SiO<sub>2</sub>, Toluen (được viết tắt là PhMe):THF (6:1), R<sub>f</sub>=0,12 UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng/màu vàng nhạt.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3293, 2937, 1728, 1726, 1636, 1505, 1466, 1336, 1236, 1234, 1164, 1084, 1016, 1192, 729.

<sup>1</sup>H NMR, (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 1,191 t, J=7,2Hz, 3H; 3,892 s, 3H; 3,898 s, 3H; 4,152-4,319 m, 16 đường, dqx2, tất cả J=7,2 Hz với các tâm vạch bốn ở: 4,179, 4,205, 4,265, 4,292, 2H; 4,346 br s, 1H; 6,575 d, J=8,4 Hz, 1H, 6,961 dd, J=8,4&0,4 Hz, 1H; 7,744 br s, 1H.

Tổng hợp 6,7-dimetoxyisatin từ etyl 3-hydroxy-6,7-dimetoxy-2-indolon-3-cacboxylat. Dung dịch chứa 10,67 g (40,2 mM) etyl 3-hydroxy-6,7-dimetoxy-2-indolon-3-cacboxylat trong 100ml etanol được khuấy trong bồn nước có nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch chứa 4,828 g (120,7 mM) natri hydroxit trong 25ml nước được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp này. Dòng không khí, không có CO<sub>2</sub>, được đi qua hỗn hợp phản ứng mà được khuấy mạnh. Sự đi qua của không khí và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ môi trường được duy trì qua đêm. Hỗn hợp đã được thu hồi có màu nâu đỏ chói. Dung dịch được trung hòa bằng cách bổ sung 5ml axit clohydric. Chất kết tủa màu trắng của muối vô cơ tạo thành được lọc ra và phần dịch lọc được cô trong thiết bị làm bay hơi dạng quay đến thể tích 20ml và được để kết tinh trong tủ lạnh. Tinh thể màu vàng-cam được thu gom và được làm khô bằng không khí. Thu được lượng bằng 2,24 g (hiệu suất 26,9%) 6,7-dimetoxyisatin tinh khiết. 0,54 g nữa (hiệu suất 6,5%) của sản phẩm được tách ra khỏi phần dịch lọc bởi sắc ký lỏng sử dụng SiO<sub>2</sub> và hỗn hợp PhMe:THF (4:1).

Mp 209-210°C.

TLC, SiO<sub>2</sub>, PhMe:THF (6:1), R<sub>f</sub>=0,18 chấm màu vàng, UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng/màu vàng nhạt.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3218, 1747, 1707, 1623, 1507, 1452, 1442, 1337, 1286, 1240, 1184, 1082, 1041, 973, 949, 794, 685, 702, 662.

<sup>1</sup>H NMR, (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ(ppm): 3,91 s 3H; 3,98 s 3H; 6,60 d, J=8,4 Hz, 1H; 7,42 d, J=8,4Hz, 1H; 7,74 br s, 1H.

Tổng hợp 6,7-dimethoxy-1-methylisatin từ 6,7-dimethoxyisatin. Dung dịch chứa 2,255 g (20,1 mM) kali tert-butanolat trong 20ml THF khan được bổ sung từ ống tiêm bởi vách ngăn cao su, với khuấy từ và làm nguội trong bồn nước-nước đá, vào bình cầu đáy tròn dung tích 50 ml chứa dung dịch chứa 2,78 g (13,4 mM) 6,7-dimethoxyisatin trong 15ml THF khan. 3,8ml (8,65 g, 60 mM) methyl iodua được bổ sung bằng ống tiêm vào hỗn hợp này và hỗn hợp với chất kết tủa lớn mà tạo thành ngay lập tức được khuấy qua đêm ở nhiệt độ 35°C. TLC (SiO<sub>2</sub>, PhMe:THF (6:1)) xác nhận sự chuyển hóa hoàn toàn của cơ chất (6,7-dimethoxyisatin) R<sub>f</sub> = 0,18 vào 6,7-dimethoxy-1-methylisatin R<sub>f</sub> = 0,34. Chất kết tủa được lọc ra và được rửa bằng ba phần dung tích 20ml của THF khan. Phần dịch lọc kết hợp được làm bay hơi cho đến khi khô và sản phẩm được thu gom dưới dạng phân đoạn màu đỏ tươi từ sắc ký nhanh. SiO<sub>2</sub> và hỗn hợp của PhMe:THF (9:1) được sử dụng. Sau khi làm bay hơi cho đến khi khô, dung môi rửa giải màu đỏ, 2,517 g (hiệu suất 84,8%) tinh thể màu vàng tươi được thu gom.

Mp 190-191°C.

TLC, SiO<sub>2</sub>, PhMe:THF (6:1), R<sub>f</sub> = 0,34 chấm màu đỏ-cam, UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng/ màu vàng nhạt.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 2955, 1724, 1614, 1497, 1450, 1373, 1264, 1205, 1168, 1131, 1086, 1044, 1028, 979, 975, 828, 800, 775, 654.

<sup>1</sup>H NMR, (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 3,490 s, 3H; 3,877 s, 3H; 3,982 s, 3H; 6,575 d, J=8,4 Hz, 1H; 7,416 d, J=8,4Hz, 1H.

Tổng hợp 5-clo-6,7-dimethoxy-1-methylisatin. Lượng bằng 2,517 g (11,38 mM) của 6,7-dimethoxy-1-methylisatin và 1,823 g (13,65 mM) của N-closucxinimit và 30ml DMF được đặt trong bình cầu đáy tròn 100ml được lắp thanh khuấy từ và phễu nhỏ giọt dung tích 10ml với thiết bị cân bằng không khí và được đặt trong bồn nước đá. 10ml dung dịch chứa 1,125ml (13,6 mM) axit clohydric đặc trong DMF được nạp vào phễu nhỏ giọt và được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp phản ứng đã được khuấy và làm nguội. Sau khi bổ sung xong, dung dịch được trộn ở nhiệt độ môi trường trong 2 giờ nữa. Sau đó, dung môi được làm bay hơi dạng quay trong chân không 8 T và ở nhiệt độ 50°C và phần cặn được cho qua sắc ký nhanh trên SiO<sub>2</sub> sử dụng hỗn hợp PhMe:THF (19:1). Dung môi rửa giải chứa dải màu đỏ gạch

của sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi dạng quay cho đến khi khô tạo ra 1,83 g (hiệu suất 62,9%) tinh thể màu đỏ gạch của 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin.

Mp 140-142°C.

TLC, SiO<sub>2</sub>, PhMe:THF (6:1), R<sub>f</sub> = 0,51 red spot, UV phát hiện, 5% KMnO<sub>4</sub> nóng/màu vàng nhạt.

UV/VIS (nm) c.-0,143 mg/ml trong Etanol: 318, e 2,75, 433, e 0,70.

Màng FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 2951, 1726, 1602, 1457, 1442, 1423, 1404, 1359, 1292, 1263, 1232, 1093, 1046, 1005, 979, 941, 897, 881, 797, 766, 668.

<sup>1</sup>H NMR, (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 3,475 s, 3H; 3,935 s, 3H; 4,027 s, 3H; 7,434 s, 1H.

Cấu trúc phân tử của sporidesmin và khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin có thể tìm thấy trên Fig.12. Con đường tổng hợp được tóm tắt trên Fig.13.

Ví dụ 14. Tổng hợp sporidesmin MIP và NIP (với axit metacrylic)

Dung dịch chứa 1,8 g (7,04 mM) 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin, 1,194ml (1,212 g, 14,08 mM) axit metacrylic, 3,415ml (3,664 g, 28,16 mM) 2-hydroxyetylmetylacrylat, 39,83ml (41,86 g, 211,2 mM) etylen glycol dimetylacrylat và 1,0 g (6,09 mM) AIBN trong 100ml toluen được đặt trong 500ml, bình cầu đáy tròn bốn cổ được lắp phễu nhỏ giọt dung tích 120ml với thiết bị làm cân bằng khí, máy khuấy cơ học, bộ phận ngưng tụ hồi lưu với thiết bị đếm bọt và nhiệt kế. Thể tích toluen bằng 120ml được đặt trong phễu nhỏ giọt, máy khuấy được bắt đầu và nito được đi qua toluen (trong phễu nhỏ giọt) và trên bề mặt của hỗn hợp trong bình cầu và được giải phóng ra bên ngoài qua thiết bị đếm bọt. Sau 30 phút khuấy và thổi nito, tốc độ dòng khí được giới hạn ở các bọt bong bóng đơn và nhiệt độ trong bình cầu tăng đến 65°C bằng cách ngâm bình cầu trong bồn nước có nhiệt độ 70°C. Trong 15 phút, sự polyme hoá bắt đầu và dung dịch trở nên càng nhớt hơn. Khi khó duy trì sự khuấy mạnh, toluen từ phễu nhỏ giọt được bổ sung càng nhanh càng tốt, để pha loãng hỗn hợp. Khuấy mạnh và gia nhiệt được duy trì trong 4 giờ. Trong thời gian này, các khối cầu nhỏ của MIP được tạo thành. Hỗn hợp được để không cần khuấy hoặc gia nhiệt qua đêm. Vào buổi sáng, khối cầu MIP được lọc ra và được

rửa 13 lần mỗi lần bằng 150 ml etanol. Phần dịch lọc màu đỏ cam được thu gom, được cô đặc dạng quay. 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin (khuôn sporidesmin) được thu hồi bằng sắc ký nhanh sử dụng PhMe:THF (98:2) và thu gom dải màu đỏ gạch của khuôn. Làm bay hơi dạng quay tạo ra 1,572 g (hiệu suất thu hồi 87,3%) tinh thể 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin rất tinh khiết. Các khối cầu của MIP được làm khô bằng không khí qua đêm ở nhiệt độ môi trường và một giờ nữa ở nhiệt độ 80°C trong lò sấy của phòng thí nghiệm.

Lượng 45,362 g sporidesmin MIP (axit metacrylic) thu được ở dạng nhỏ các khối cầu màu trắng hình vỏ trứng nhỏ và được xác định là MIP #519-98.

Sporidesmin NIP (axit metacrylic) 45,883 g ở dạng các khối cầu màu trắng tuyệt, được thu bởi cùng quy trình tuy nhiên không có khuôn sporidesmin được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và chỉ tiến hành ba lần rửa bằng etanol (mỗi lần 150ml). Polyme được xác định là MIP #555-99.

Cả MIP và NIP đều dễ lọc và rửa trên thiết bị lọc thủy tinh đóng cục.

Ví dụ 15. Tổng hợp sporidesmin MIP và NIP (với 2-vinylpyridin)

Dung dịch chứa 1,5 g (5,86 mM) 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin, 1,260ml (1,232 g, 11,72 mM) 2-vinylpyridin, 2,845ml (3,053 g, 23,46 mM) 2-hydroxyethyl-metacrylat, 33,191ml (34,833 g, 176 mM) etylen glycol dimetacrylat và 0,833 g (5,07 mM) AIBN trong 80ml toluen được đặt trong bình cầu đáy tròn bốn cổ dung tích 500ml được lắp phễu nhỏ giọt dung tích 100ml với thiết bị làm cân bằng khí, máy khuấy cơ học, bộ phận ngưng tụ hồi lưu với thiết bị đếm bọt và nhiệt kế. Thể tích bằng 120ml toluen được đặt trong phễu nhỏ giọt, máy khuấy được bắt đầu và nitơ được đi qua toluen (trong phễu nhỏ giọt) và trên bề mặt của hỗn hợp trong bình cầu và được giải phóng ra bên ngoài qua thiết bị đếm bọt. Sau 30 phút khuấy và thổi nitơ tốc độ dòng khí được giới hạn ở các bọt bong bóng đơn và nhiệt độ trong bình cầu tăng đến 65°C bằng cách ngâm bình cầu trong bồn nước có nhiệt độ 70°C. Trong 15 phút, sự polyme hoá bắt đầu và dung dịch trở nên ngày càng nhớt. Khi khó duy trì khuấy mạnh, toluen từ phễu nhỏ giọt được bổ sung càng nhanh càng tốt, để pha loãng hỗn hợp. Khuấy mạnh và gia nhiệt được duy trì trong 4 giờ. Trong thời gian này, các khối cầu nhỏ của MIP được tạo thành. Hỗn hợp được để không cần khuấy hoặc gia nhiệt qua đêm. Sau đó, các khối cầu MIP được lọc ra và được rửa

13 lần mỗi lần bằng 150ml etanol. Tất cả các phần dịch lọc từ việc rửa MIP được thu gom và được làm bay hơi dạng quay cho đến khi khô. Phần cặn màu đỏ được hòa tan trong 20ml toluen và được áp dụng vào phần trên của cột sắc ký lỏng (24 mm x 50 cm) đã được đổ đầy 200ml SiO<sub>2</sub> trong toluen. Dải màu đỏ được rửa bằng PhMe:THF (5:1). Làm bay hơi dạng quay tạo ra 1,489 g (hiệu suất thu hồi 99,2%) tinh thể 5-clo-6,7-dimethoxy-1-metylisatin. Các khối cầu của MIP được làm khô bằng không khí qua đêm ở nhiệt độ môi trường và đối với hai nhiều giờ ở 80°C trong lò sấy của phòng thí nghiệm. Thu được 37,936 g sporidesmin MIP (2-vinylpyridin) ở dạng các khối cầu màu trắng dạng vỏ trứng nhỏ và được xác định là MIP #519-101.

Sporidesmin NIP (2-vinylpyridin). Thu được lượng 39,2 g ở dạng các khối cầu màu trắng tuyệt theo cùng quy trình, tuy nhiên không có khuôn sporidesmin được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và chỉ tiến hành ba lần rửa bằng etanol (mỗi lần 150 ml). Polyme được xác định là MIP #555-102.

Ví dụ 16. Quy trình polyme hóa/tổng hợp sporidesmin MIP ở nhiệt độ thấp được khơi mào bằng UV.

Thiết lập phản ứng quang hóa. Giếng đo UV quang hóa, bằng thạch anh (Ace Glass, Catalogue# 7856-10) được lắp trong đèn UV công suất 450 W (ACE Glass, Catalogue# 7825-34) và bộ nguồn cấp điện hình hộp công suất 450 W (ACE Glass, Catalogue#7830-58) được gắn vào máy làm lạnh tuần hoàn WKL 230 LAUDA (được cung cấp bởi Brinkmann Instruments, Inc.), và nước làm nguội nhiệt độ 4°C được chạy qua lớp phủ lỗ tại thời điểm khi đèn UV bật.

Quy trình polyme hoá. Hỗn hợp của các monome: axit metacrylic 1,2g (13,95 mM) và etylen glycol monometacrylat 3,631 g (13,95 mM), khuôn sporidesmin 1,783 g (6,97 mM), chất khơi mào (IABN) 0,991 g (6,03 mM) và chất liên kết ngang, etylen glycol dimetacrylat 41,444 g (209,1 mM) được đặt trong chai polyetylen, trong mờ (loại Nalgene® 2105) và dòng Argon được đi qua hỗn hợp trong 15 phút để loại bỏ toàn bộ oxy, mà được biết là ức chế sự polyme hóa gốc tự do. Sau đó, chai được đóng kín và được gắn vào giếng đo, ở vị trí trung tâm của đèn UV, và được ngâm, cùng với sự thiết lập phản ứng quang hóa, trong bồn nước đá. Nước làm nguội được chạy qua chụp đèn, khi đèn được bật, và sự chiếu xạ hỗn hợp

phản ứng được duy trì trong 3,5 giờ (kính an toàn với UV được yêu cầu tại thời điểm khi đèn UV bật). Nước đá bổ sung được cung cấp, và lượng nước dư được tháo ra khỏi bể trong quá trình polyme hoá UV, để duy trì nhiệt độ bể làm nguội ở 4°C. Sau khi hoàn thành polyme hoá, chai được mở, polyme được tán vụn và được nghiền thành các miếng nhỏ được rửa: ba lần bằng etanol, hai lần bằng hỗn hợp nước-etanol theo tỷ lệ 1:1, sáu lần bằng hỗn hợp nước-etanol theo tỷ lệ 3:1 và một lần nữa bằng etanol, để loại bỏ khuôn ra khỏi polyme và đảm bảo hoạt tính tối đa của MIP mà cuối cùng được làm khô trong lò sấy của phòng thí nghiệm, để loại bỏ phần cặn etanol tạo ra 41,1 g (hiệu suất 89%) sản phẩm.

Ví dụ 17. Khả năng cang hóa của MIP đối với độc tố nấm – được áp dụng cho chất tương tự sporidesmin

Polyme MIP và NIP được tạo ra bởi quy trình polyme hóa kết tủa được khơi mào bằng nhiệt sử dụng axit metacrylic hoặc monome 2-vinylpyridin trong toluen (Ví dụ xem, Ví dụ 14 và Ví dụ 15) được kiểm tra đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin (Ví dụ xem, Ví dụ 13) và gliotoxin, chất tương tự với phân tử sporidesmin chứa hệ vòng piperazindion được liên kết cầu disulphua tương tự (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) để loại bỏ khuôn và độc tố nấm gliotoxin ra khỏi môi trường lỏng hoặc bán lỏng thông qua tương tác hóa học. MIP và NIP tạo ra được sử dụng ở đây để mô tả sự khác nhau về ái lực cang hóa. Thử nghiệm cang hóa được tiến hành bằng cách cân 400 mg vật liệu MIP/NIP vào chai Schott màu hổ phách và bổ sung 100ml dung dịch tác dụng của chất phân tích được nghiên cứu để thu được tỷ lệ kết hợp 0,4 g/l của tác nhân cang hóa trong môi trường. Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống chứa vật liệu MIP và đối chứng dương chứa 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin hoặc gliotoxin. Thử nghiệm cang hóa được thực hiện trong chất đệm xitrat 50 mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu đều được ủ trong 90 phút trên máy lắc quay theo quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) ở tốc độ 150 vòng/phút được giữ ở nhiệt độ 37°C. Năm nồng độ cuối cùng của khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin hoặc gliotoxin được thử nghiệm với hệ - 500; 1000; 1500; 2000; 2500 phần tỷ (ppb) hoặc 1000; 2000; 3000; 4000; 5000. Sau khi ủ, chế phẩm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phân dịch nổi được thu gom vào lọ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm hoặc khuôn với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC

(Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dây diot quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa) theo các phương pháp chuẩn. Tiến hành phân tích HPLC đối với gliotoxin sử dụng hỗn hợp của axetonitril/axit axetic/axit trifloaxetic (34,9:65:0,1, thể tích/thể tích) làm pha động. Phương pháp HPLC để phát hiện khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin chọn theo các thông số rửa giải chuẩn đối với phân tích sporidesmin gồm hỗn hợp của axetonitril/nước/metanol (45:45:10, thể tích/thể tích). Sự phát hiện được tiến hành trên dây diot quang UV với quét bước sóng đầy đủ (268,1 nm tạo ra tín hiệu tối ưu đối với gliotoxin; 258,8 nm tạo ra tín hiệu tối ưu đối với khuôn).

Các kết quả cho thấy rằng MIP #519-98 và #519-101 và NIP #519-99 và #519-10X có thể tương tác với hơn 90,8% gliotoxin được kiểm tra nằm trong khoảng từ 500 đến 2500 ppb đối với mức bao gồm 0,4% của chất hấp phụ ở độ pH 4,0 (xem Bảng 8). Sự hấp phụ của khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin cũng được nghiên cứu tạo ra ái lực hơn 94,9% đối với MIP #519-98 và #519-101 và NIP #519-99 và #519-10X đối với nồng độ khuôn nằm trong khoảng từ 1000 đến 5000 ppb của phân tử khuôn có mặt trong môi trường ở độ pH 4,0 đối với mức bao gồm 0,4% của chất hấp phụ (Bảng 8). Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng MIP được tổng hợp trong toluen có triển vọng đối với sự hấp phụ của các chất tương tự sporidesmin (ví dụ, gliotoxin và khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin) với ưu điểm không đáng kể đối với MIP #519-101 được tổng hợp bằng cách sử dụng các monome 2-vinylpyridin khi được bổ sung ở tốc độ bao gồm 4 g/l trong điều kiện pH 4,0 với ái lực để cang hóa lên tới  $97,82 \pm 4,25\%$  tỷ lệ ái lực và  $95,85 \pm 1,25\%$  lần lượt đối với gliotoxin và khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin. Sự sai khác giữa MIP và NIP là tối thiểu đối với bất kỳ trong số chế phẩm được điều chế.

Bảng 8. Ái lực hấp phụ trung bình được biểu thị dưới dạng % đối với 2 MIP và 2 NIP đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxi-1-metylisatin và gliotoxin được đánh giá ở độ pH 4,0 và mức bao gồm 0,4% của chất hấp phụ

| Số mẫu      | Sự hấp phụ trung bình |              |
|-------------|-----------------------|--------------|
|             | Gliotoxin (%)         | Khuôn (%)    |
| 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 |

Ví dụ 18. Chuẩn độ lượng MIP để cang hóa chất tương tự sporidesmin

Thử nghiệm chuẩn độ được tiến hành để nghiên cứu tỷ lệ kết hợp của MIP, từ 0,1 g/l đến 1,00 g/l (hoặc tỷ lệ kết hợp từ 0,01 đến 0,1%). Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống không chứa vật liệu MIP và đối chứng dương chỉ chứa khuôn 5-clo-6,7-dimetoxi-1-metylisatin hoặc gliotoxin cần được kiểm tra. Thử nghiệm cang hóa được thực hiện trong chất đệm xitrat 50 mM đã được điều chỉnh tới độ pH 4,0. Tất cả các mẫu đều được ủ trong 90 phút trên máy lắc quay theo quỹ đạo (Brunswick, Champaign, IL, USA) ở tốc độ 150 vòng/phút được giữ ở nhiệt độ 37°C. Năm nồng độ cuối cùng của khuôn 5-clo-6,7-dimetoxi-1-metylisatin hoặc gliotoxin là 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 ppb được kiểm tra với hệ trong thể tích cuối cùng là 100ml. Sau khi ủ, ống vi ly tâm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom vào lọ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của chất phân tích với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dãy diot theo các phương pháp chuẩn (Ví dụ xem, Ví dụ 17).

Bảng 9. Ái lực hấp phụ trung bình được biểu thị dưới dạng % trong 2 MIP và 3 NIP đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin được đánh giá ở độ pH 4,0 và 4 mức bao gồm của chất hấp phụ

| Số mẫu      | % bao gồm | Hấp phụ (%)         |       |       |       |       |                    |
|-------------|-----------|---------------------|-------|-------|-------|-------|--------------------|
|             |           | Nồng độ khuôn (ppb) |       |       |       |       | Giá trị trung bình |
|             |           | 1000                | 2000  | 3000  | 4000  | 5000  |                    |
| 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              |

Như được thể hiện trên Fig.14, Bảng 9 và Bảng 10,, theo một số phương án, ví dụ, ở mức bao gồm 0,05 g/l của chất hấp phụ, sáng chế cho thấy hiệu quả tối ưu trên 70% giá trị cang hóa và đạt tới gần như 90% sự cang hóa ở 0,10 g/l. Như vậy, theo

một số phương án, sáng chế đề xuất rằng MIP/NIP được tổng hợp với axit metacrylic có triển vọng hơn so với MIP/NIP được tổng hợp bằng cách sử dụng 2-vinylpyridin đối với sự hấp phụ chất tương tự sporidesmin (ví dụ, gliotoxin và khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin (ví dụ, khi được bổ sung ở tỷ lệ kết hợp nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 g/l trong điều kiện pH 4,0)). Tuy nhiên, sự khác biệt giữa MIP và NIP là tối thiểu đối với bất kỳ trong số chế phẩm được điều chế chỉ khác là NIP được tổng hợp ở nhiệt độ thấp và polyme hóa được khơi mào bằng UV với các giá trị hấp phụ tăng theo mức bao gồm của chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 10 đến 15%.

Bảng 10. Đặc tính hấp phụ đẳng nhiệt *in vitro* của NIP và MIP ở bốn tỷ lệ kết hợp khác nhau đối với khuôn sporidesmin trong môi trường chất đệm xitrat có độ pH bằng 4

| Tỷ lệ kết hợp (%) | 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 |

Ví dụ 19. Ái lực của MIP và NIP khác nhau và xác định đặc điểm tính đặc hiệu đối với chất tương tự sporidesmin

Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án theo sáng chế để đánh giá ái lực của các NIP/MIP khác nhau được tổng hợp trong toluen làm dung môi được sử dụng để polyme hoá kết hợp được khơi mào bằng nhiệt. MIP tạo ra được sử dụng ở đây để mô tả sự khác nhau trong ái lực của sự cang hóa của chất tương tự sporidesmin (ví dụ, gliotoxin và khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin) và để đánh giá tính đặc hiệu của vật liệu. Lượng MIP bằng 30 mg được đặt vào cột SEP-PAK được nhồi nguyên liệu hũ tinh chiết pha rắn polyetylen được silan hóa. Lọ thủy tinh được silan hóa được sử dụng để đảm bảo khả năng ổn định của chất

phân tích trong dung môi gốc nước và để ngăn ngừa bất kỳ sự tương tác không đặc hiệu giữa chất phân tích và lọ thủy tinh. Phương pháp silan hóa được áp dụng cho các bộ lọc và ống ni lông và PTFE/PE dựa trên các phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực. Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống không chứa vật liệu MIP và đối chứng dương chứa khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin hoặc gliotoxin. Thiết bị lọc giống như chiết pha rắn (như SPE) được tạo ra đối với lượng bao gồm tương đương bằng 0,1 g/l của MIP bằng cách lọc qua 30 mg vật liệu 1ml dung dịch chứa khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin hoặc gliotoxin. Các lọ nhỏ và các bộ lọc điều chế bằng làm đầy chúng hoặc ngâm chúng với chất phản ứng silan hóa (SURFASIL, Ví dụ xem, Ví dụ 9). Thiết bị lọc giống như SPE được nạp 1ml dung dịch chứa khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin hoặc gliotoxin được sử dụng ở một nồng độ bằng 2000 ppb. Dọc theo mẫu, dung dịch tác dụng đối chứng được duy trì. Cả mẫu và đối chứng đều được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 phút với lắc gián đoạn. Sau giai đoạn ủ, mẫu được đẩy qua ống tiêm và được thu gom trong ống ly tâm dung tích 15ml ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom vào lọ HPLC màu hổ phách và được silan hóa và được phân tích. Để đánh giá tính đặc hiệu của sự giải hấp đối với phân tử đích, sáu bước rửa được tiến hành trên vật liệu chứa polyme MIP. Mỗi lần rửa được thu gom trong ống ly tâm dung tích 15 ml và ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút trước khi phân tích bằng HPLC. Sáu lần rửa được tiến hành với nồng độ tăng dần của dung môi hữu cơ, gồm lần rửa thứ nhất với dung dịch rửa là chất đệm xitrat nồng độ 50 mM và năm lần rửa liên tiếp bằng 20, 40, 60, 80, 100% metanol trong nước (thể tích/thể tích), lần lượt. Thử nghiệm sử dụng MIP được polyme hóa kết tủa được khơi mào bằng nhiệt trên đây #519-98 và #519-101 và NIP #519-99 và #519-10X (dạng bột) cùng với dạng tinh thể của MIP và NIP được xác định là #519-47 và #519-47X mà được tạo ra trong điều kiện polyme hoá UV và nhiệt độ thấp (Ví dụ xem, Ví dụ 5). Phần dịch nổi được thu gom vào lọ HPLC màu hổ phách và được silan hóa, ngăn ngừa sự tương tác bất kỳ của độc tố nấm hoặc khuôn với lọ nhỏ, và được tính toán từ HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) được kết hợp với tín hiệu của bộ dò dây diot quang (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa) theo các phương pháp chuẩn. Phân tích HPLC đối với gliotoxin được tiến hành bằng cách sử dụng hỗn hợp của axetonitril/axit axetic/axit trifloaxetic (34,9:65:0,1,

thể tích/thể tích) làm pha động. Phương pháp HPLC để phát hiện khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin được chọn theo các thông số rửa giải chuẩn đối với phân tích sporidesmin gồm hỗn hợp của axetonitril/nước/metanol (45:45:10, thể tích/thể tích). Sự phát hiện được tiến hành trên dây diot quang UV với quét bước sóng đầy đủ (268,1 nm tạo ra tín hiệu tối ưu đối với gliotoxin; 258,8 nm tạo ra tín hiệu tối ưu đối với khuôn).

Các kết quả cho thấy (xem Fig.15 và Bảng 11) rằng MIP #519-101 và #519-98 có giá trị giải hấp thấp hơn khi được rửa bằng 40% metanol so với NIP #519-10X và #519-99 tương ứng của chúng đối với sự hấp phụ của gliotoxin. Các dung dịch rửa chứa hơn 60% metanol tuy nhiên có khả năng loại bỏ gần như toàn bộ lượng gliotoxin được càng hóa. Theo một số phương án, MIP #519-101 được tổng hợp bằng cách sử dụng các monome của 2-vinylpyridin có tính đặc hiệu cao hơn so với NIP #519-10X và NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X và MIP 519-47 tương ứng khi tiến hành rửa hệ bằng cách sử dụng 20% metanol. Polyme 519-47X và 519-47 không thể hấp phụ hơn 25% gliotoxin. Việc sử dụng dung dịch đậm rửa có thể loại bỏ gliotoxin bất kỳ đã được hấp phụ.

Các kết quả cho thấy (xem Fig.16 và Bảng 11) rằng MIP #519-101 có giá trị giải hấp thấp hơn khi được rửa bằng 20 và 40% metanol so với NIP #519-10X tương ứng của nó. Tuy nhiên, tính đặc hiệu của MIP #519-98 và NIP #519-99 là có thể so sánh được mà không có sự sai khác về tính đặc hiệu đối với sự hấp phụ của khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin. Tuy nhiên, các dung dịch rửa chứa hơn 60% metanol có thể loại bỏ gần như toàn bộ lượng khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin được càng hóa. Theo một số phương án và như được phát hiện thấy với gliotoxin, MIP #519-101 được tổng hợp bằng cách sử dụng các monome của 2-vinylpyridin có tính đặc hiệu cao hơn so với NIP #519-10X và NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X và MIP 519-47 tương ứng khi tiến hành rửa hệ bằng cách sử dụng 20 và 40% metanol. Các polyme 519-47X và 519-47 có sự khác nhau về tính đặc hiệu của sự càng hóa thiên về hợp chất MIP. Tuy nhiên, mặc dù sự hấp phụ của khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin là dưới 50 %, nó thể hiện ái lực tốt hơn so với ái lực được tìm thấy với gliotoxin thể hiện tính đặc hiệu tốt hơn của MIP đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin.

Bảng 11. Tính chất hấp phụ của 3 MIP, 3NIP, đối với khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin và gliotoxin ở độ pH 4,0 trong cấu hình SPE ở mức bao gồm 0,1% của chất hấp phụ và sự tồn tại đối với dung dịch rửa metanol đã được chuẩn độ với hỗn hợp của chất đệm xitrat (dung dịch A) và metanol (dung dịch B)

| Chất hấp phụ                                       | Mức độ hấp phụ trung bình tính theo % |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Điều kiện                                          | Ban đầu                               | A: 100%<br>B: 0% | A: 80%<br>B: 20% | A: 60%<br>B: 40% | A: 40%<br>B: 60% | A: 20%<br>B: 80% | A: 0%<br>B: 100% |
| Gliotoxin (% hấp phụ)                              |                                       |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| NIP 519-10X                                        | 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       |
| MIP 519-101                                        | 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       |
| NIP 519-99                                         | 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       |
| MIP 519-98                                         | 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       |
| NIP 555-47X                                        | 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      |
| MIP 519-47                                         | 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      |
| Khuôn 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin (% hấp phụ) |                                       |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| NIP 519-10X                                        | 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      |
| MIP 519-101                                        | 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      |
| NIP 555-99                                         | 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       |
| MIP 519-98                                         | 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       |
| NIP 555-47X                                        | 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      |
| MIP 519-47                                         | 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      |

Ví dụ 20. Khả năng cang hóa của MIP đối với độc tố nấm – được áp dụng cho sporidesmin

Polyme MIP được sản xuất bằng cách sử dụng các monome 2-vinylpyridin trong toluen (Ví dụ xem, Ví dụ 15) được thử nghiệm đối với sporidesmin (AgResearch Limited, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand) đối với việc loại bỏ độc tố nấm sporidesmin (A 93%; B, D, E từ 2 đến 17%) ra khỏi môi trường lỏng hoặc bán lỏng thông qua sự tương tác hóa học. MIP được sản xuất được sử dụng để xác định đặc điểm ái lực cang hóa và để đánh giá tính đặc hiệu của vật liệu. Thử nghiệm cang hóa được tiến hành bằng cách cân 50 và 400 mg vật liệu MIP vào các lọ Schott và bổ sung 100ml dung dịch tác dụng chứa hỗn hợp sporidesmin được đưa tỷ lệ kết hợp 0,5 và 4,0 g/l của chất hấp phụ trong môi trường. Chế phẩm được sản xuất cùng với mẫu trống chứa vật liệu MIP và đối

chứng dương chỉ chứa sporidesmin. Thử nghiệm cang hóa được thực hiện trong chất đệm succinat 50 mM đã điều chỉnh tới độ pH 6,0 để đáp ứng các điều kiện sinh lý của ngăn dạ dày dạ cỏ. Tất cả các mẫu đều được ủ trong 90 phút trên máy lắc quay theo quỹ đạo ở tốc độ 150 vòng/phút được giữ ở nhiệt độ 37°C. Ba nồng độ cuối cùng của sporidesmin là 500; 1000; 2000 ppb được thử nghiệm với hệ. Sau khi ủ, chế phẩm được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu gom vào lọ HPLC, và được tính toán từ HPLC được kết hợp với tín hiệu của bộ dò UV (ví dụ, để phát hiện lượng độc tố nấm và độc tố nấm được cang hóa) theo các phương pháp chuẩn. Phương pháp HPLC để phát hiện sporidesmin sử dụng hỗn hợp của axetonitril/nước/metanol (45:45:10, thể tích/thể tích) để tiến hành rửa giải chất phân tích và cột C18 (4,6 mm × 25 cm). Sự phát hiện được tiến hành trên bộ dò UV (280 nm tạo ra tín hiệu tối ưu đối với sporidesmin).

Sản phẩm MIP #519-98 hấp phụ từ 80,5 đến 85,7% đối với tỷ lệ kết hợp 0,5 g/l và hơn 98,5% khi được sử dụng ở tỷ lệ kết hợp 4 g/l của sporidesmin có mặt ở 500; 1000 và 2000 ppb (Ví dụ xem, Bảng 12). Sự biến đổi giữa các lần lặp lại được ước tính là ít hơn 1% của sự hấp phụ. Tác dụng bão hòa không đáng kể có thể quan sát thấy ở tỷ lệ kết hợp 0,5 g/l với sự giảm giá trị hấp phụ thu được trong toàn bộ khoảng sporidesmin được nghiên cứu.

Bảng 12. Hiệu quả hấp phụ của MIP #519-98 ở tỷ lệ kết hợp 0,5 và 4,0 g/l đối với 3 nồng độ của sporidesmin

| Tỷ lệ kết hợp (%) | Phần trăm hấp phụ trung bình (%) đối với các nồng độ sporidesmin: |              |              |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
|                   | 500 ppb                                                           | 1000 ppb     | 2000 ppb     |
| 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 |

Tất cả các tài liệu công bố và patent được đề cập theo sáng chế đều được đưa vào bằng cách viện dẫn. Các cải biến và biến đổi khác nhau của chế phẩm và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả sẽ rõ ràng với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không đi lệch khỏi phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Mặc dù sáng chế đã được bộc lộ liên quan đến các phương án được ưu tiên cụ thể, nhưng cần phải hiểu rằng, sáng chế được yêu cầu bảo hộ sẽ không bị

giới hạn bởi các phương án cụ thể này. Thực tế, nhiều cải biến khác nhau cũng như các cách thức thực hiện sáng chế đã được mô tả mà rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và dự định là đều thuộc phạm vi của sáng chế.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cang hóa độc tố nấm ra khỏi vật liệu, bao gồm các bước:

a) cung cấp:

i) vật liệu chứa độc tố nấm; và

ii) polyme được tạo khuôn phân tử được tạo ra thông qua sự polyme hóa của một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang trong điều kiện có mặt khuôn độc tố nấm được chọn từ nhóm bao gồm: N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin; 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin; etyl 3-hydroxy-6,7-dimetoxy-2-indolon-3-carboxylat; 6,7-dimetoxyisatin; và 6,7-dimetoxy-1-metylisatin; và

b) cho polyme được tạo khuôn phân tử nêu trên tiếp xúc với vật liệu chứa độc tố nấm nêu trên trong điều kiện cho phép polyme được tạo khuôn phân tử liên kết với độc tố nấm này.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ocratoxin A được cang hóa ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sporidesmin được cang hóa ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vật liệu chứa độc tố nấm được chọn từ nhóm bao gồm đồ uống, thực phẩm, thức ăn cho động vật, dược phẩm, hợp phần dưỡng dược, hợp phần mỹ phẩm, và chất cần thiết để duy trì sự sống.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất cần thiết để duy trì sự sống nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm môi trường để sử dụng trong nuôi trồng thủy sản và mẫu khí chứa oxy.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử đã được liên kết với độc tố nấm không được tách ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước c) phân tách độc tố nấm đã được liên kết ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước phân tách bao gồm việc chiết, cô hoặc tách độc tố nấm ra khỏi vật liệu nêu trên và ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử nêu trên.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước phân tách xảy ra trong cột hoặc hộp sắc ký hoặc phân tách.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó sau khi phân tách, độc tố nấm đã được liên kết với polyme được tạo khuôn phân tử được loại ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử bằng cách rửa.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó độc tố nấm được phân tích định tính và định lượng sau khi loại bỏ ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phân tích định lượng và định tính được sử dụng để truy xuất nguồn gốc.
13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử đã được loại bỏ độc tố nấm được tái sử dụng để càng hóa độc tố nấm ra khỏi vật liệu chứa độc tố nấm.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử hấp phụ nước nhiều hơn từ 1 đến 10 lần so với khối lượng của nó.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử hấp phụ nước nhiều hơn từ 1 đến 5 lần so với khối lượng của nó.
16. Phương pháp theo điểm 14, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử hấp phụ nước nhiều hơn từ 1 đến 2 lần so với khối lượng của nó.
17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hai hoặc nhiều polyme được tạo khuôn phân tử khác nhau được tiếp xúc với vật liệu chứa độc tố nấm để càng hóa hai hoặc nhiều loại độc tố nấm khác nhau ra khỏi vật liệu này.
18. Phương pháp sản xuất polyme được tạo khuôn phân tử bao gồm các bước: a) cung cấp: i) khuôn độc tố nấm được chọn từ nhóm bao gồm: N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin; 5-clo-6,7-dimetoxy-1 metylisatin; etyl 3-hydroxy-6,7-dimetoxy-2-indolon-3-carboxylat; 6,7-dimetoxyisatin; và 6,7-dimetoxy-1-metylisatin; và ii) một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang; và b) cho khuôn độc tố nấm tiếp xúc với một hoặc nhiều monome và một hoặc

nhiều chất liên kết ngang nêu trên trong điều kiện cho phép polyme hóa một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang trong điều kiện có mặt khuôn độc tổ nấm.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó khuôn độc tổ nấm là N-(2-hydroxy-3,5-diclobenzoyl)-L-phenylalanin.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó khuôn độc tổ nấm là 5-clo-6,7-dimetoxy-1-metylisatin.

21. Phương pháp theo điểm 18, trong đó một hoặc nhiều monome được chọn từ nhóm bao gồm 2-vinylpyridin, 2-hydroxyetylmetylacrylat và axit metacrylic.

22. Phương pháp theo điểm 18, trong đó một hoặc nhiều chất liên kết ngang bao gồm etylen glycol dimetylacrylat.

23. Phương pháp theo điểm 18, trong đó sự polyme hóa được bắt đầu ở nhiệt độ thấp bởi ánh sáng UV.

24. Phương pháp theo điểm 18, trong đó sự polyme hóa được bắt đầu bằng cách tạo thành các gốc tự do trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 110 độ Celsius.

25. Phương pháp theo điểm 24, trong đó các gốc tự do được tạo thành bởi sự phân hủy azoisobutyronitril (AIBN) được khơi mào bằng nhiệt.

26. Phương pháp theo điểm 24, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm toluen, xyclohexan, axetonitril, dung dịch rượu polyvinyllic (PVA)/nước, và hỗn hợp của hai hoặc nhiều trong số toluen, xyclohexan, axetonitril, và dung dịch PVA/nước.

27. Phương pháp theo điểm 24, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 75 độ Celsius.

28. Phương pháp theo điểm 7, trong đó khuôn độc tổ nấm được loại bỏ ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử sau sự polyme hóa của một hoặc nhiều monome và một hoặc nhiều chất liên kết ngang.

29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó sử dụng một hoặc nhiều lần rửa bằng dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm dung môi hữu cơ, chất đệm, nước và hỗn hợp của chúng để loại bỏ khuôn độc tổ nấm ra khỏi polyme được tạo khuôn phân tử.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm rượu etylic, rượu metylic, axetonitril, toluen, và hỗn hợp của chúng.

31. Phương pháp theo điểm 29, trong đó chất đệm là chất đệm được điều chế bằng cách cho phản ứng natri hydroxit, axit xitric, axit succinic và axit axetic.
32. Phương pháp theo điểm 29, trong đó polyme được tạo khuôn phân tử được làm khô sau một hoặc nhiều lần rửa.

FIG.1

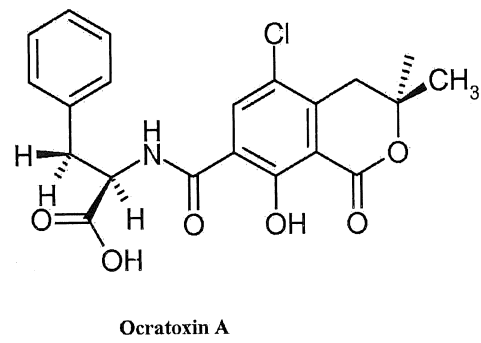
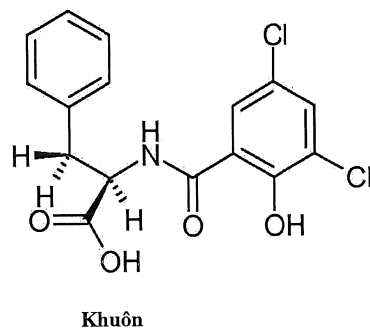


FIG.2

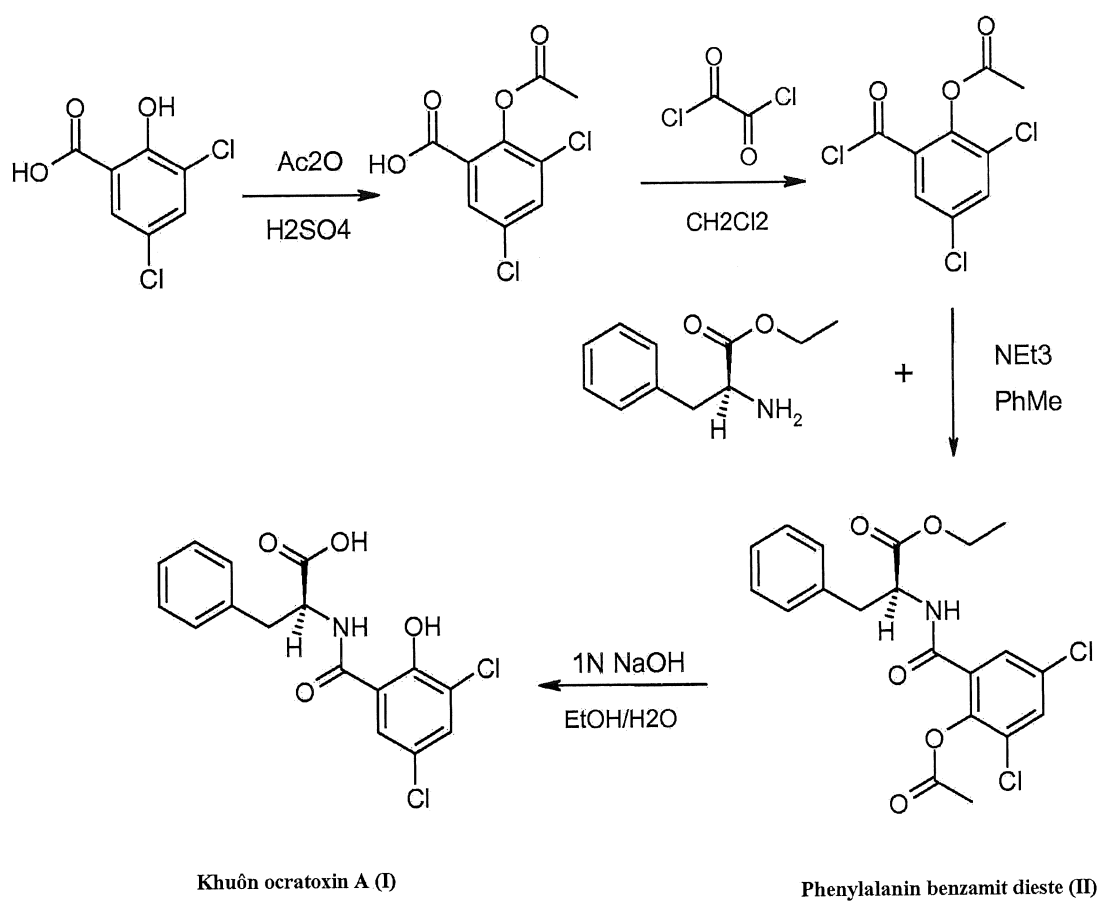


FIG.3

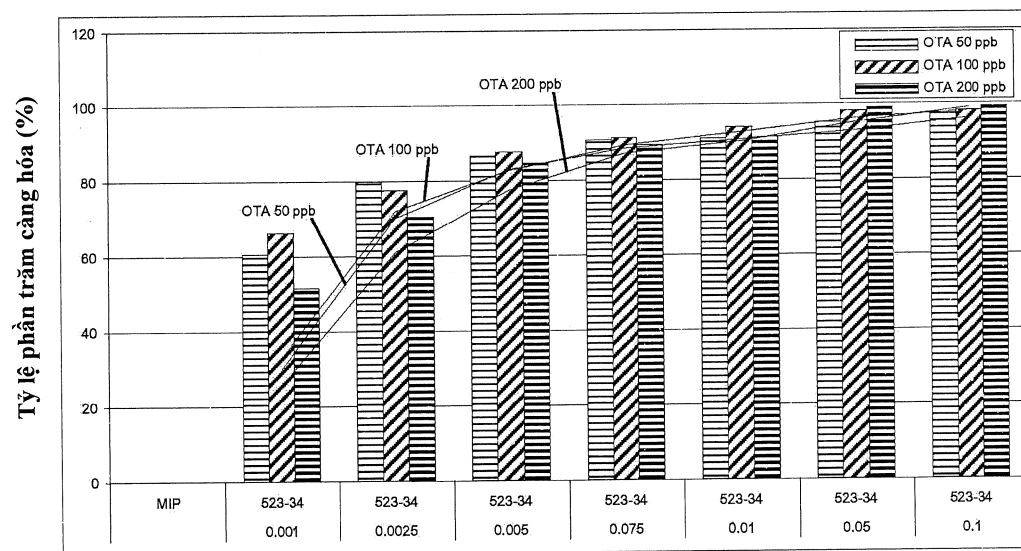


FIG.4

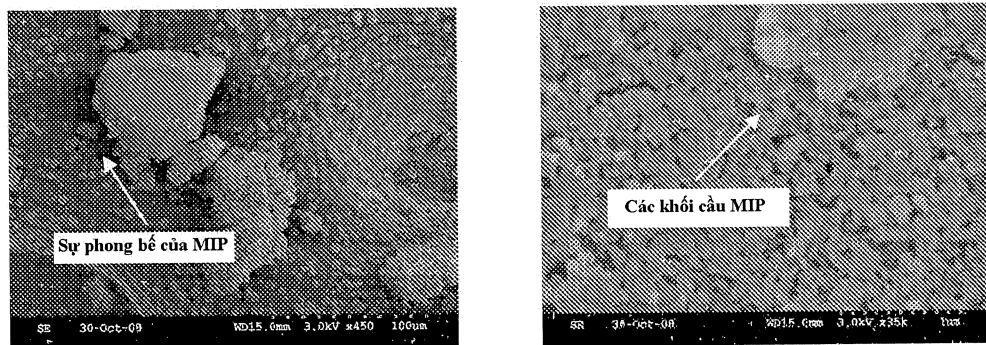


FIG.5

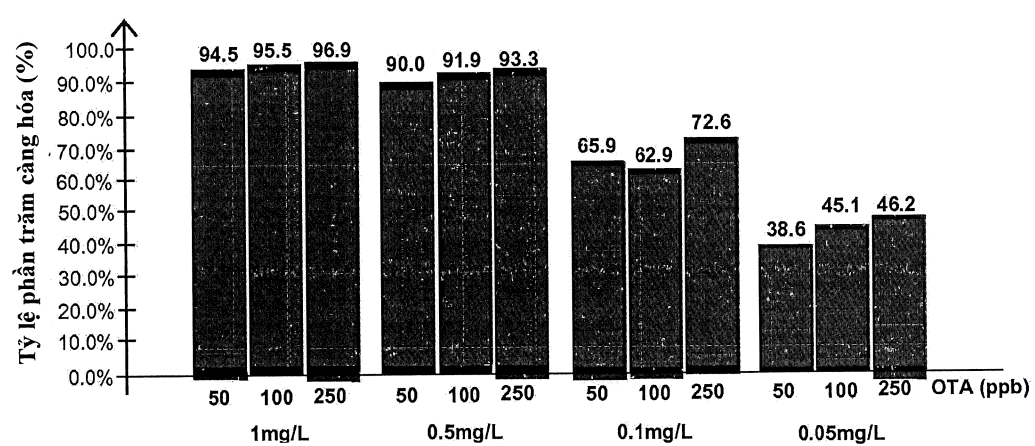


FIG.6

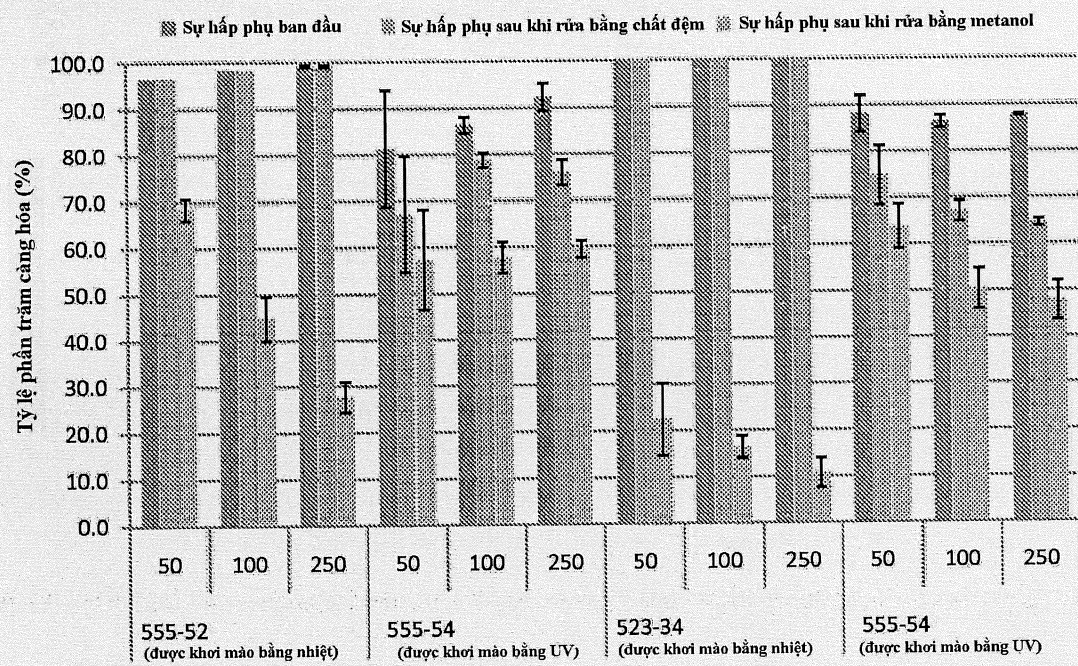


FIG.7

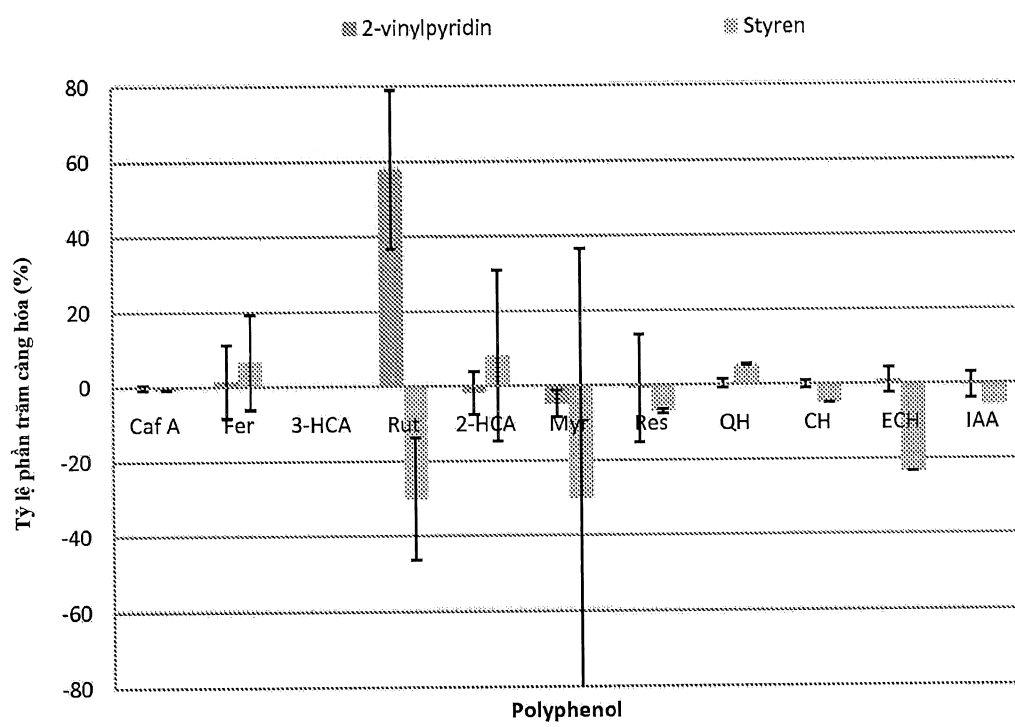


FIG.8

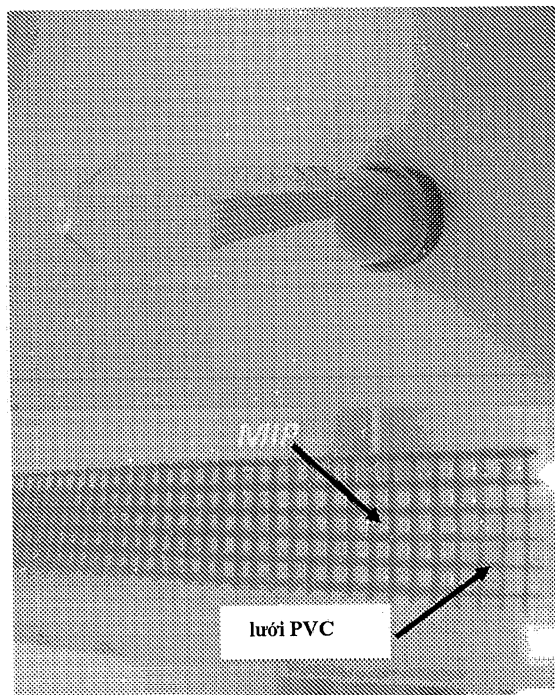


FIG.9

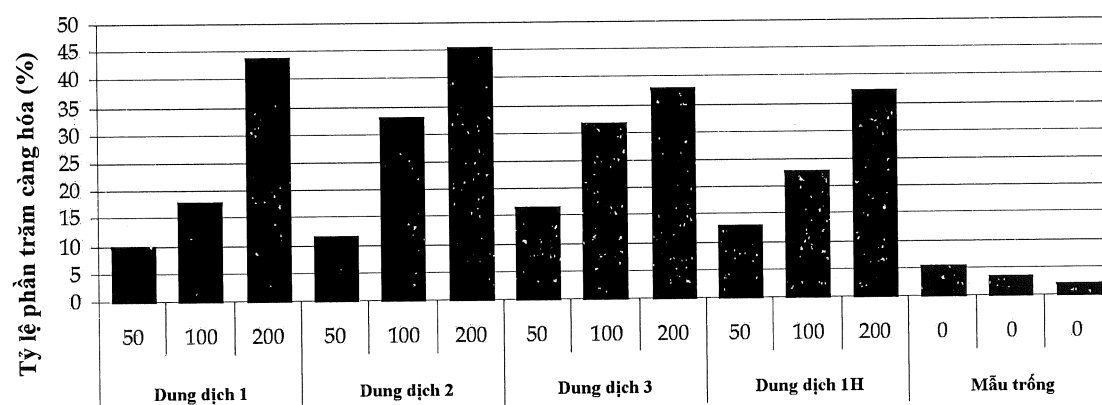


FIG.10

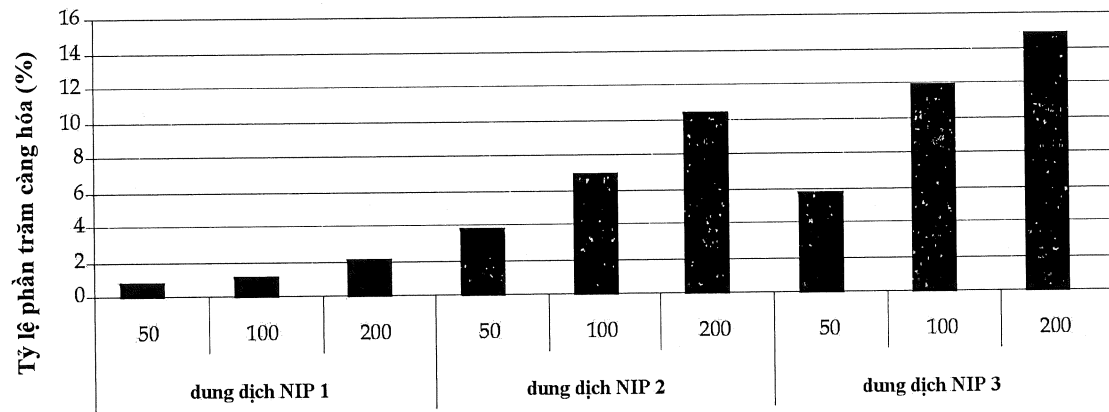
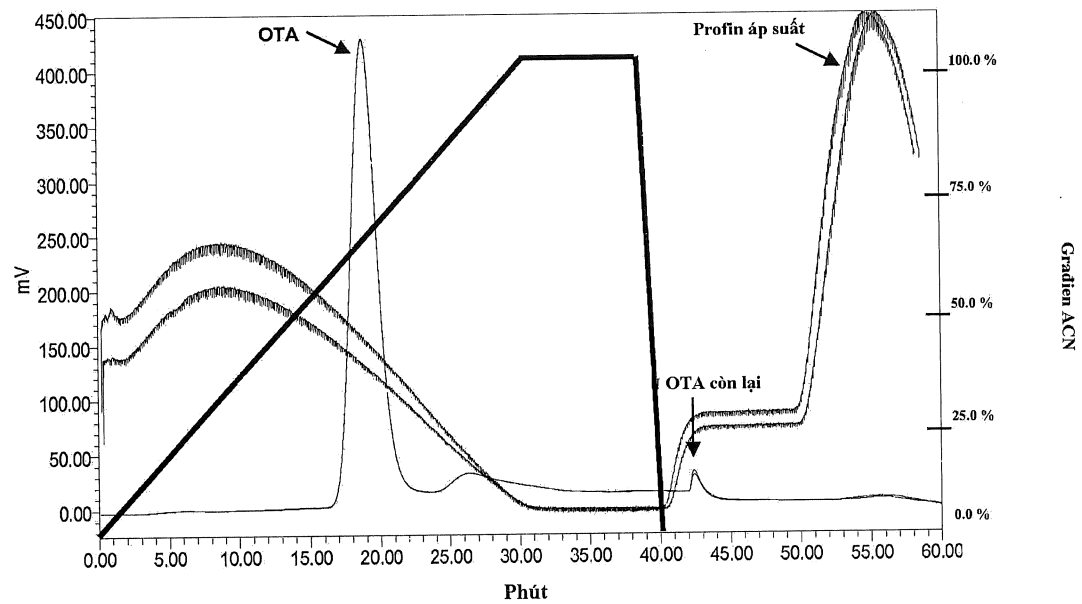
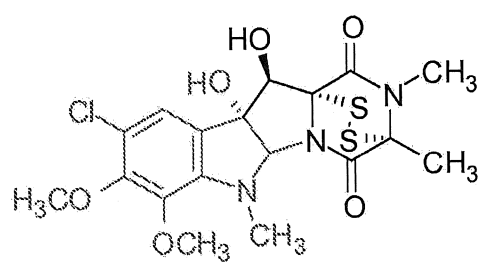


FIG.11



|   | Thời gian | Dòng chảy | %<br>1% tetraethylamoni trong metanol | %<br>Axetonitril | %<br>H <sub>2</sub> O |
|---|-----------|-----------|---------------------------------------|------------------|-----------------------|
| 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                 |

FIG.12



Độc tố nấm - Spirodesmin A

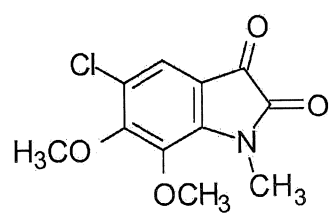
5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatin  
Khuôn spirodesmin A

FIG.13

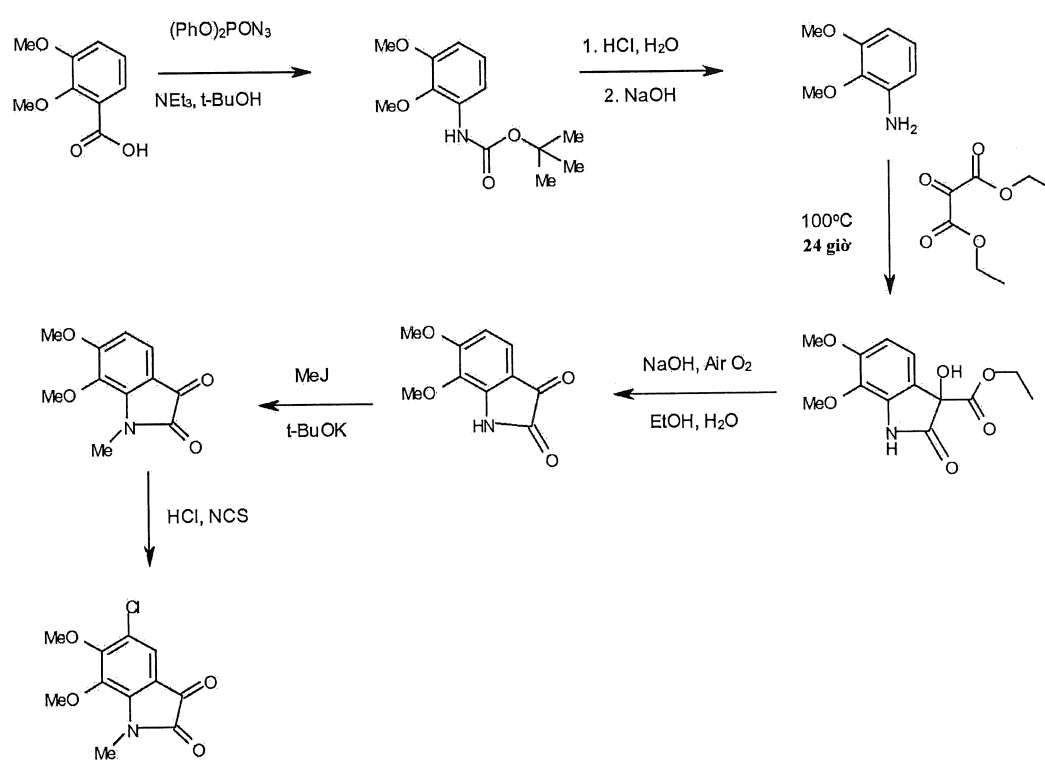


FIG.14

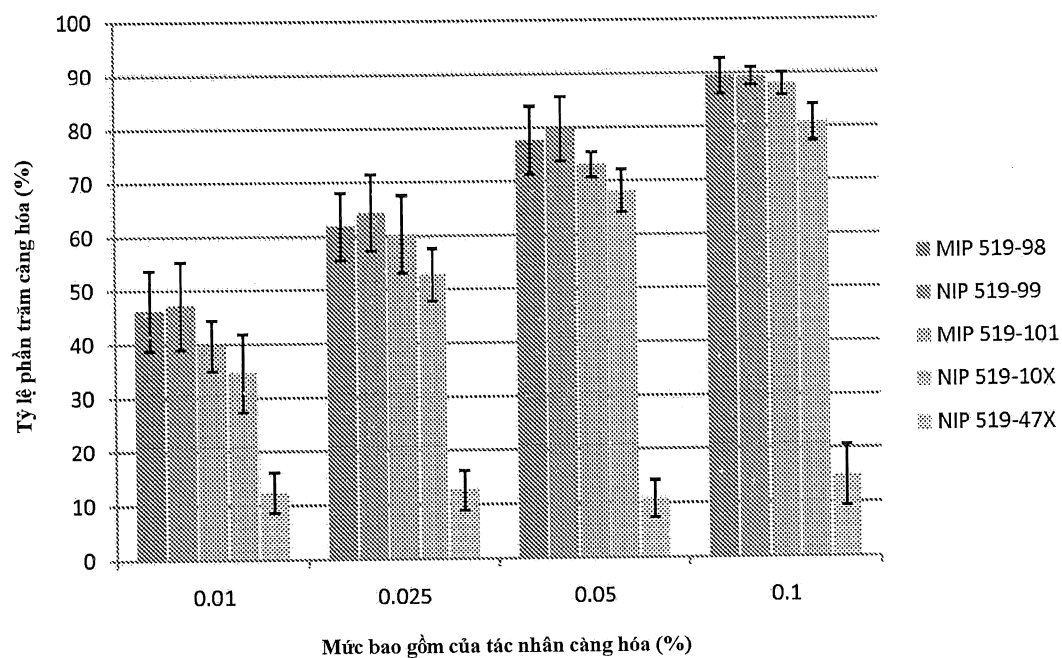


FIG.15

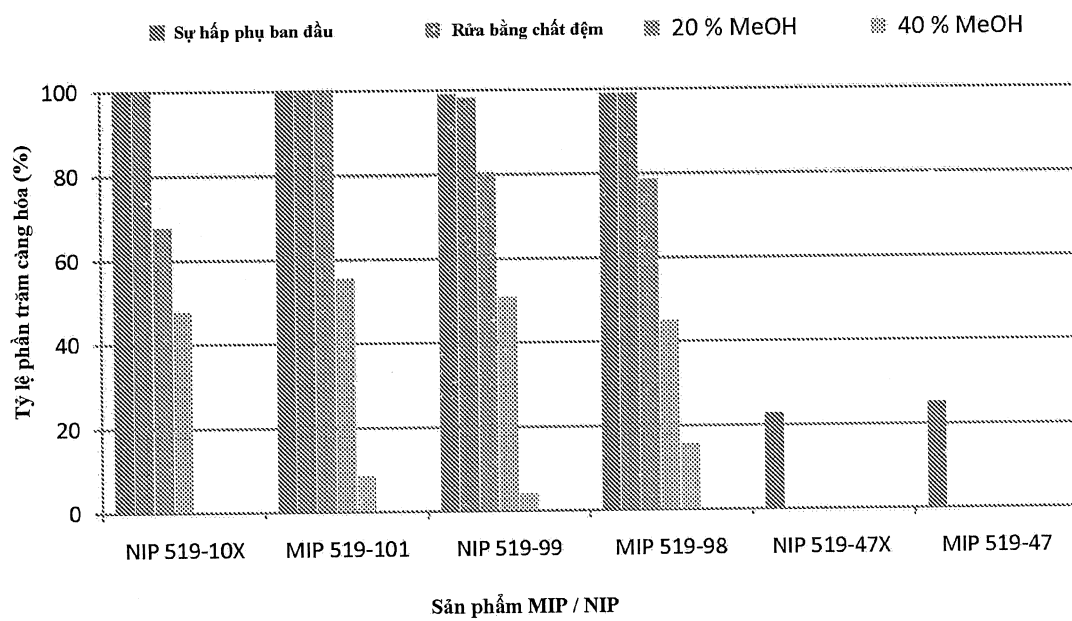


FIG.16

