



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107709348 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201580081460.4

(22)申请日 2015.10.29

(30)优先权数据

62/159019 2015.05.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/044646 2015.10.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/182589 EN 2016.11.17

(71)申请人 沃特世科技公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72)发明人 X.王 J.刘 S.P.鲍威尔斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 张慧 罗文锋

(51)Int.Cl.

G07K 1/14(2006.01)

G07K 14/37(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

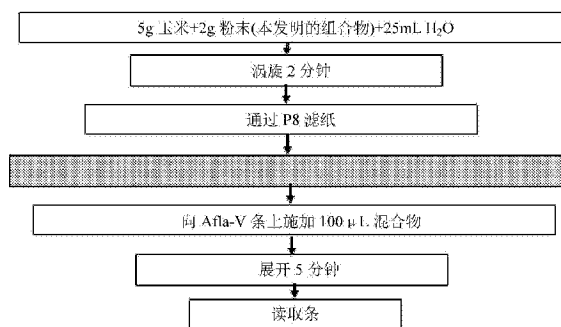
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

用于提取真菌毒素的组合物和方法

(57)摘要

公开了用于从食品样品中提取真菌毒素或黄曲霉毒素的组合物。还提供了使用该组合物来检测和分析黄曲霉毒素的方法。



1. 一种用于提取样品中的真菌毒素的液体浓缩物,其包含:
一种或更多种表面活性剂;和
一种或更多种缓冲盐。
2. 权利要求1所述的液体浓缩物,其中所述表面活性剂选自硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚山梨酯20和三甲基十六烷基氯化铵。
3. 权利要求1所述的组合物,其中所述缓冲盐是盐、酸式盐、碱式盐或其组合。
4. 权利要求1所述的液体浓缩物,其中所述缓冲盐是选自以下的一种或更多种:氯化钠、硫酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、溴化钠、碘化钠、氯化钾、乙酸钾、溴化钾和碘化钾、碳酸氢钠、硫氢化钠、硫酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸钙、碳酸钠、氰化钾和硫化钠。
5. 权利要求1所述的液体浓缩物,其中以约2.4至7.2 wt%的量包含所述表面活性剂。
6. 权利要求1所述的液体浓缩物,其中以约5至15体积%的量包含所述表面活性剂。
7. 权利要求5所述的液体浓缩物,其中基于所述组合物的总量计,以约6至18 wt %的量包含所述缓冲盐。
8. 权利要求6所述的液体浓缩物,其中基于所述组合物的总量计,以约1.4至4.2 wt %的量包含所述缓冲盐。
9. 一种检测样品中的真菌毒素的方法,其包括:
通过与权利要求1的第一液体浓缩物和权利要求1的第二液体浓缩物组合来制备所述样品;和
从制备的样品中提取所述真菌毒素。
10. 权利要求9所述的方法,其中所述第一液体浓缩物包含:基于所述组合物的总重量计约4.8 wt%量的十二烷基硫酸钠(SDS)。
11. 权利要求9所述的方法,其中所述第二液体浓缩物包含:基于所述组合物的总重量计约10体积%量的聚山梨酯20、12.4 wt %量的氯化钠和2.8 wt %量的磷酸氢二钠。
12. 权利要求9所述的方法,其中将所述样品制备为水溶液。
13. 权利要求9所述的方法,其中通过涡旋约2 min来实施所述提取。
14. 权利要求9所述的方法,其进一步包括过滤所述制备的样品。
15. 权利要求9所述的方法,其进一步包括分析来自所述样品的所述真菌毒素。
16. 权利要求15所述的方法,其中通过测试条来分析所述真菌毒素,所述测试条包括对所述真菌毒素具有特异性的亲和标记物。
17. 权利要求16所述的方法,其中所分析的真菌毒素是黄曲霉毒素。
18. 权利要求16所述的方法,其中所述测试条是AFLA-V[®]条。
19. 权利要求9所述的方法,其进一步包括确定来自所述样品的所述真菌毒素的量。
20. 权利要求19所述的方法,其中通过在单测定池荧光计中测量约454 nm波长处的荧光来确定所述真菌毒素的量。
21. 一种试剂盒,其包含权利要求1的第一液体浓缩物、权利要求1的第二液体浓缩物、亲和测试条和使用说明书。
22. 权利要求21所述的试剂盒,其中所述亲和测试条是AFLA-V[®]条。

用于提取真菌毒素的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请对美国临时专利申请2014年8月12日提交的第62/036,410号和2015年5月8日提交的第62/159,019号要求利益和优先权。前述申请的全部内容通过引用以其整体并入本文。

发明领域

[0002] 本发明提供用于从样品中提取真菌毒素的组合物以及使用该组合物提取真菌毒素的方法。特别地,使用本发明的组合物的方法在不使用有机溶剂的情况下提供例如黄曲霉毒素的真菌毒素的有效提取。

[0003] 发明背景

对人和动物通过人和其它动物经由食物、水和空气暴露于毒性物质的发生率和影响的认识对于我们的生存是极其重要的。

[0004] 黄曲霉毒素是希望筛选的化合物的典型实例。黄曲霉毒素是天然存在的次生真菌代谢物的毒素。这些真菌毒素由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 或寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 产生。在食品工业中,在农产品,例如花生、花生粕、棉籽粕、玉米、干辣椒等中也检测到黄曲霉毒素。这些真菌毒素是世界上许多地区中的人类食品供应的常见污染物,且与特别在亚洲和非洲的人类肝癌发生率的上升在统计学上相关。因此,黄曲霉毒素可引起食品工业中的显著损失。

[0005] 如此,在食品工业中,依照关于农产品和食品产品的加强规则,用于例如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和串珠镰孢菌毒素的真菌毒素的检测和定量程序已变得特别重要。例如目前,市售可得的亲和柱已经用于检测真菌毒素的存在,或者特别用于检测黄曲霉毒素。

[0006] 在市售可得的方法中,有机溶剂通常用来从样品中提取此类真菌毒素。由于真菌毒素(例如黄曲霉毒素、串珠镰孢菌毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等等)在它们的结构中具有多芳族环或长疏水链,因此优选使用有机溶剂,用于有效提取并准确表征 (profiling) 样品中的此类真菌毒素。然而,有机溶剂(例如甲醇或乙醇)是易燃的、有毒的且要求供储存和作为有害废物处置的额外费用。因此,已经出现在不使用有机溶剂的情况下,从商品样品中提取真菌毒素或黄曲霉毒素的需求。

[0007] 发明概述

本发明提供针对使用有机溶剂从食品样品中检测真菌毒素的目前使用的方法的技术解决方案。因此,在本发明中,公开了用于在不使用有机溶剂的情况下,从样品中有效提取真菌毒素的组合物。此外,公开了使用本发明的组合物来检测真菌毒素的方法。

[0008] 在一方面,本发明提供用于提取样品中的真菌毒素的组合物。该组合物可包含:一种或更多种表面活性剂;一种或更多种聚合物;一种或更多种粘度改进剂;和一种或更多种缓冲盐。

[0009] 在另一方面,本发明提供用于提取样品中的真菌毒素的第一浓缩液和第二浓缩

液。该第一浓缩液和第二浓缩液可独立包含：一种或更多种表面活性剂；一种或更多种聚合物；一种或更多种粘度改进剂；和一种或更多种缓冲盐。

[0010] 在某些示例性实施方案中，表面活性剂可选自聚山梨酯20(吐温20)、硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、十二烷基硫酸钠(SDS)和三甲基十六烷基氯化铵。

[0011] 在仍某些示例性实施方案中，聚合物可选自聚丙烯酸、多羟基聚合物(polyol)、聚乙二醇(PEG)和聚乙烯吡咯烷酮。

[0012] 在其它某些示例性实施方案中，粘度改进剂可选自蔗糖、纤维素、甘露糖醇及其组合。

[0013] 在某些实施方案中，缓冲盐可以是盐、酸式盐、碱式盐或其组合。在某些示例性实施方案中，缓冲盐可以是选自以下的一种或更多种：氯化钠、硫酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、溴化钠、碘化钠、氯化钾、乙酸钾、溴化钾和碘化钾、碳酸氢钠、硫化钠、硫酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸钙、碳酸钠、氰化钾和硫化钠。

[0014] 在某些示例性实施方案中，基于组合物的总量计，可以约2至10 wt %的量包含表面活性剂。另外，基于组合物的总量计，可以约30至50 wt %的量包含聚合物。此外，基于组合物的总量计，可以约30至50 wt %的量包含粘度改进剂。基于组合物的总量计，可以约10至18 wt %的量包含缓冲盐。

[0015] 在其它示例性实施方案中，可以第一浓缩液的约2.4至7.2 wt %以及第二浓缩液的5至15%体积%的量包含表面活性剂。基于浓缩液的总量计，缓冲盐可以6至18 wt %和1.4至4.2 wt %的量包含在第二浓缩液中。在某些实施方案中，基于组合物的总量计，可以约30至50 wt %的量包含聚合物。

[0016] 在示例性实施方案中，基于组合物的总重量计，本发明的组合物可由以下物质组成或基本由以下物质组成：约6 wt%量的十二烷基硫酸钠(SDS)；约40 wt%量的聚乙二醇(PEG)；约40 wt%量的蔗糖；约7 wt%量的氯化钠(NaCl)；和约7 wt%量的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

[0017] 在示例性实施方案中，基于组合物的总重量计，本发明的第一浓缩液和第二浓缩液可由以下物质的水溶液组成或基本由以下物质的水溶液组成：约4.8 wt%量的十二烷基硫酸钠(SDS)；约12.4 wt%量的氯化钠(NaCl)；10体积%量的聚山梨酯20；和约2.8 wt%量的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

[0018] 在其它方面，提供了检测样品中的真菌毒素的方法。

[0019] 在示例性实施方案中，该方法可包括：通过与本发明的组合物组合来制备样品；以及从制备的样品中提取真菌毒素。

[0020] 在某些示例性实施方案中，基于组合物的总重量计，该方法中使用的本发明的组合物可包含：约6 wt%量的十二烷基硫酸钠(SDS)；约40 wt%量的聚乙二醇(PEG)；约40%量的蔗糖；约7 wt%量的氯化钠(NaCl)；和约7 wt%量的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

[0021] 在另一示例性实施方案中，该方法可包括：通过与本发明的第一浓缩液和第二浓缩液组合来制备样品；以及从制备的样品中提取真菌毒素。在某些实施方案中，在水中制备样品。在特别的实施方案中，通过在添加第一浓缩液和第二浓缩液之前添加水来制备样品。

[0022] 在某些示例性实施方案中，该方法中使用的本发明的第一浓缩液可包含：约4.8 wt%量的十二烷基硫酸钠(SDS)；

在某些示例性实施方案中,基于组合物的总重量计,该方法中使用的本发明的第二浓缩液可包含:10体积%量的聚山梨酯20;约12.4 wt%量的氯化钠(NaCl);和约2.8 wt%量的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

[0023] 在某些示例性实施方案中,可将样品制备为水溶液。

[0024] 在某些示例性实施方案中,可通过涡旋约2 min来实施提取。

[0025] 在某些实施方案中,该方法可进一步包括过滤制备的样品。

[0026] 在仍某些实施方案中,该方法可进一步包括分析来自样品的真菌毒素。在某些示例性实施方案中,可通过测试条来分析真菌毒素,所述测试条包括对真菌毒素具有特异性的亲和标记物。

[0027] 本发明方法中所分析的示例性真菌毒素可以是但不限于黄曲霉毒素。特别地,当分析黄曲霉毒素时,测试条可以是AFLA-V®条(VICAM, Milford, MA)。

[0028] 在仍某些实施方案中,该方法可进一步包括确定来自样品的真菌毒素的量。在某些示例性实施方案中,可通过在单测定池荧光计(single-cell fluorometer)中测量约454 nm的波长处的荧光来确定真菌毒素的量。

[0029] 在另一方面,本发明还提供试剂盒,其可包含:本发明的组合物、亲和测试条和使用说明书。特别地,试剂盒可包括亲和测试条:AFLA-V®条(VICAM, Milford, MA)。

[0030] 附图简述

图1例示了根据使用本发明的组合物的示例性实施方案提取并检测黄曲霉毒素的示例性方法。

[0031] 图2例示了根据使用本发明的第一浓缩液和第二浓缩液的示例性实施方案提取并检测黄曲霉毒素的示例性方法。

[0032] 图3例示了根据使用本发明的第一浓缩液和第二浓缩液的示例性实施方案提取并检测黄曲霉毒素的另一示例性方法。

[0033] 发明详述

本发明提供在不使用有害的有机溶剂的情况下可用于从样品中提取并检测真菌毒素的组合物和方法。特别地,可将本发明的组合物最优化,用于提取水溶液中的此类真菌毒素。

[0034] 应理解,本发明不限于所描述的特别方法和实验条件,由此方法和条件可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅用于描述特别的实施方案的目的,且不意欲为限制性的,因为本发明的范围将仅由随附权利要求书限制。

[0035] 除非另外定义,本文使用的全部科学和技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义。如本文所使用的术语“约”在用于提及特定叙述的数值或数值范围时表示该值可自所叙述的值变化不超过1%。例如,如本文所使用的表述“约100”包括99和101,以及介于其中的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0036] 虽然在本发明的实践或测试中可使用与本文所描述的那些相似或等效的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。本文中提及的所有出版物通过引用以其整体并入本文。

[0037] 定义

如本文所使用的术语“真菌毒素”是由真菌界的生物体(通常称为霉菌)产生的有毒次

生代谢物。术语‘真菌毒素’通常应用于由容易定殖作物的真菌产生的有毒化学产物。一种霉菌物种可产生许多不同的真菌毒素，且相同的真菌毒素可由若干物种产生。

[0038] 如本文所使用的术语“黄曲霉毒素”是由黄曲霉和寄生曲霉产生的一类真菌毒素。已经将各种各样的黄曲霉毒素鉴定为B₁、B₂、G₁、G₂、M₁和M₂型黄曲霉毒素。

[0039] (黄曲霉毒素B₁)

黄曲霉毒素天然存在于花生、花生粕、棉籽粕、玉米、干辣椒等等中。黄曲霉毒素是世界上许多地区中的人类食品供应的常见污染物，且与特别在亚洲和非洲的人类肝癌发生率上升在统计学上相关。

[0040] 如本文所使用的术语“样品”指包括至少一种经受提取、检测、分离、分析或表征的分子的分子的任何混合物。本发明中的特别实例包括但不限于食品样品(例如农产品)或环境样品。特别地，食品样品可以是农产品或作物，例如玉米、花生、棉花或棉籽、小麦、大豆、稻米等等。在某些示例性实施方案中，样品可包括可检测范围的真菌毒素，例如黄曲霉毒素。

[0041] 如本文所使用的术语“表面活性剂”指降低两种液体之间或液体与固体之间的表面张力的化合物。表面活性剂可充当洗涤剂、湿润剂、乳化剂、发泡剂、分散剂等等。在某些实施方案中，表面活性剂可用来稳定水溶液中的疏水性有机分子，例如脂质、油、芳族化合物、疏水性蛋白质等等。

[0042] 如本文所使用的术语“聚合物”指高分子量分子，其含有重复子单元，并赋予溶液特定的性质。在本发明的某些实施方案中，聚合物可具有亲水基团、疏水基团或组合基团，且可进一步用作表面活性剂或表面改性剂。

[0043] 如本文所使用的术语“粘度改进剂”指溶液中的调节该溶液的粘度的成分。可特别添加粘度改进剂，以提供较高的粘度、表面张力或流动性。另外，粘度改进剂在溶液中可具有温和的化学活性。在某些实施方案中，在水溶液中，示例性粘度改进剂可以是葡萄糖、蔗糖或纤维素，以使得可增加溶液的粘度或密度。

[0044] 如本文所使用的“缓冲盐”指任何类型的盐，其可溶解于水或水溶液中，并维持溶液的缓冲条件。缓冲盐通常包括盐、酸式盐、碱式盐或其组合。缓冲盐可不与溶液中的其它组分反应，但影响其pH、缓冲性质或电解性质。

[0045] 术语“分析”(“analysis”或“analyzing”)可互换使用，并指分离、检测、离析、纯化、溶解、检测和/或表征小的营养素分子(例如维生素)的各种方法中的任意种。实例包括但不限于固相提取、固相微提取、电泳、质谱法(例如MALDI-MS或ESI)、液相色谱法(例如高效液相色谱法，例如反相、正相或尺寸排阻、离子对液相色谱法)、液-液提取(例如加速流体提取、超临界流体提取)、微波辅助提取、膜提取、索氏提取、沉淀、澄清、电化学检测、染色、元素分析、埃德蒙降解(Edmund degradation)、核磁共振、红外分析、流动注射分析、毛细管电色谱法、紫外检测及其组合。

[0046] 如本文所使用的术语“亲和色谱法”指基于底物与配体之间的高度特异性相互作用分离样品中的化学或生物化学物类的方法。此类特异性的特别实例可以是抗原与抗体之间、酶与底物之间或受体与配体之间(的特异性)。在亲和色谱法中，对分析物具有特异性的捕捉分子可被固定在柱或诊断工具中的色谱材料或树脂中，且感兴趣的分析物可被树脂俘获。在某些示例性实施方案中，黄曲霉毒素可由固定在亲和色谱柱或胶体颗粒中的它们的

特异性抗体来识别和捕捉。

[0047] 如本文所使用的术语“测试条”指用来确定分析物的存在的诊断条或试纸条。对分析物具有特异性的化学或生物化学物类可被固定在胶体颗粒上,且可定量或定性检测并分析与条上的颗粒特异性结合的分析物。在某些示例性实施方案中,测试条可包括用于检测样品中的黄曲霉毒素的黄曲霉毒素特异性抗体。

[0048] 真菌毒素的提取

本发明提供在不使用有机溶剂的情况下真菌毒素的新颖提取,并还公开了可用于水溶液中的提取的组合物。

[0049] 在一方面,公开了从水溶液形式的样品中提取真菌毒素,由此可避免使用有机溶剂。因此,本发明的组合物和浓缩液可用于有效提取具有高疏水性的真菌毒素。特别地,组合物可包含表面活性剂或分散剂来使有机分子在水溶液中增溶或稳定。在示例性实施方案中,组合物可包含一种或更多种表面活性剂、一种或更多种聚合物、一种或更多种粘度改进剂、一种或更多种缓冲盐等等。

[0050] 如本文所使用的,提取是将化学物类从一种相转移到另一种相(例如从有机溶剂相到水相)的化学过程。在某些示例性实施方案中,可将样品(例如固相或油相)中的真菌毒素转移到含水液相中,以使得可实施检测。在示例性实施方案中,可通过使用本发明中的组合物将黄曲霉毒素从食品样品中转移并溶解于水中。

[0051] 在某些实施方案中,可通过本领域通常已知的方法来实施提取。示例性提取方法可以是但不限于震荡、涡旋、超声处理、热回流、微波辅助提取、受控压降提取等等。

[0052] 在某些示例性实施方案中,待提取的真菌毒素可以是但不限于黄曲霉毒素、串珠镰孢菌毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等等。在那些真菌毒素之中,使用本发明的组合物可有效提取和分析黄曲霉毒素。

[0053] 在某些示例性实施方案中,样品可以非限制性地是食品或饮料样品、环境样品或生物样品。食品样品可包括农产品、食品产品等等。示例性食品样品可以是但不限于玉米、玉蜀黍(maize)、花生、棉花或棉籽、小麦、大豆、稻米、乳制品、早餐谷物、婴儿食品、水果罐头和相关的商品食品产品。当作为固体提供样品时,可适当制备该样品,并与本发明的组合物以及水组合。当作为含水液体提供样品时,可直接将该样品与本发明的组合物在其预定的范围内组合。

[0054] 组合物

本发明提供用于提取包含在食品样品中的真菌毒素的组合物或浓缩液。该组合物或浓缩液可特别用于在不使用有机溶剂的情况下提取真菌毒素的方法。根据如上所述的各种示例性方法,在分析样品之前,可将组合物与包含真菌毒素的样品以及水组合。

[0055] 在一方面,提供了组合物,其包含:一种或更多种表面活性剂、一种或更多种聚合物、一种或更多种粘度改进剂和一种或更多种缓冲盐。

[0056] 在另一方面,提供了浓缩液,其包含一种或更多种表面活性剂和一种或更多种缓冲盐。在特别的实施方案中,使用浓缩液时,该浓缩液不含聚合物或粘度改进剂。

[0057] 如上所公开的表面活性剂用来对分析物的表面进行改性,并因此使分析物稳定。在某些实施方案中,溶液中的表面活性剂可包括亲水基团、疏水基团或其组合,并因此使分析物在含水环境中稳定。在某些示例性实施方案中,表面活性剂可在没有任何有机溶剂的

情况下使其结构中具有一系列芳族环的黄曲霉毒素在水中增溶和稳定。因此,可通过添加表面活性剂来实质上改进黄曲霉毒素的分散或提取。

[0058] 在某些实施方案中,本发明中使用的表面活性剂可包括本领域中通常使用的化学表面活性剂。例如在本发明中可使用聚山梨酯20、硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、十二烷基硫酸钠(SDS)、三甲基十六烷基氯化铵等等,但是实例可不限于此。

[0059] 在本发明的组合物的某些示例性实施方案中,可以下列量包含表面活性剂:约2至10 wt%、约3至9 wt%、约4至8 wt%、约5至7 wt%、约5.5至7.5 wt%、或特别约6 wt%。在某些示例性实施方案中,组合物可包含SDS作为表面活性剂组分。

[0060] 在示例性实施方案中,基于组合物的总重量计,组合物可包含约6 wt%量的SDS。

[0061] 在某些实施方案中,当使用本发明的浓缩液时,第一浓缩液和第二浓缩液包含不同的表面活性剂。在某些其它实施方案中,浓缩液使用相同的表面活性剂,任选还有其它表面活性剂。在某些示例性实施方案中,第一浓缩液包含第一表面活性剂,其含量可以为约2.4至7.2 wt%或特别约4.8 wt%。在某些示例性实施方案中,第二浓缩液包含第二表面活性剂,其含量可以为约5至15体积%。在某些示例性实施方案中,浓缩液包含SDS和聚山梨酯20作为表面活性剂组分。

[0062] 在示例性实施方案中,基于浓缩液的总重量计,第一浓缩液包含约4.8 wt%量的SDS。

[0063] 在示例性实施方案中,基于浓缩液的总体积计,第二浓缩液包含约10体积%量的聚山梨酯20。

[0064] 如本文所使用的聚合物可以是水溶性聚合物,且还用作表面活性剂或表面改性剂,其可对分析物的表面进行改性。另外,聚合物可稳定缓冲条件,例如pH或盐浓度。

[0065] 在某些实施方案中,聚合物是但不限于聚丙烯酸、多羟基聚合物、聚乙二醇(PEG)或聚乙烯吡咯烷酮。在示例性实施方案中,组合物可包含聚乙二醇(PEG)。具有约1,000至约40,000范围内的平均分子量的PEG可包含在组合物中,或者特别地,可使用具有约6,000、8,000、10,000、12,000、14,000、16,000、18,000、20,000、22,000、24,000、26,000、28,000、30,000、32,000的平均分子量的PEG。在某些示例性实施方案中,可使用具有约20,000的平均分子量的PEG。

[0066] 在某些实施方案中,基于组合物的总重量计,可以下列量包含聚合物:约30至50 wt%、约32.5至47.5 wt%、约35至45 wt%、约37.5至42.5 wt%、或特别约40 wt%。

[0067] 在示例性实施方案中,基于组合物的总重量计,PEG 20,000可以约40 wt%的量包含在组合物中。

[0068] 如本文所使用的粘度改进剂可在本发明的组合物溶解于水中时使提取溶液稳定,并使提取溶液的粘度在各种温度或压力范围内稳定。在某些实施方案中,本发明中的粘度改进剂可以是但不限于水溶性有机聚合物、纤维素、蔗糖、葡萄糖或甘露糖醇。

[0069] 在某些实施方案中,基于组合物的总重量计,可以下列量包含粘度改进剂:约30至50 wt%、约32.5至47.5 wt%、约35至45 wt%、约37.5至42.5 wt%、或特别约40 wt%。

[0070] 在示例性实施方案中,基于组合物的总重量计,蔗糖可以约40 wt%的量包含在组合物中。

[0071] 可在组合物中包含缓冲盐以维持提取溶液的缓冲条件、盐浓度和pH。在某些示例

性实施方案中,缓冲盐可以是盐、酸式盐、碱式盐或其组合。在仍某些示例性实施方案中,缓冲盐可包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苯磺酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐等等。示例性盐可以是但不限于氯化钠、硫酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、溴化钠和碘化钠、氯化钾、乙酸钾、溴化钾、碘化钾等等。示例性酸式盐可包括但不限于碳酸氢钠 (NaHCO_3)、硫氢化钠 (NaHS)、硫酸氢钠 (NaHSO_4)、磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 等等。示例性碱式盐可以是但不限于碳酸钙、碳酸钠、氰化钾等等。

[0072] 在某些示例性实施方案中,使用本发明的组合物时,盐和/或酸式盐的包含量可各自分别为:约5至9 wt%、约6至8 wt%、约6.5至7.5 wt%或特别约7 wt%。或者,混合物(compound)中盐和酸式盐的总量可以为以下量:约10至18 wt%、约11至17 wt%、约12至16 wt%或约13至15 wt%。在示例性实施方案中,可分别以约7 wt%的量使用氯化钠(NaCl)和磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

[0073] 在某些示例性实施方案中,使用本发明的浓缩液时,盐和/或酸式盐的包含量可各自分别为:约6至18 wt%或特别约12.4 wt%。或者,混合物中盐和酸式盐的总量可以为以下量:约1.4至4.2 wt%。在示例性实施方案中,可分别以约12.4 wt%和2.8 wt%的量使用氯化钠(NaCl)和磷酸氢二钠(NaH_2PO_4)。

[0074] 在某些示例性实施方案中,通过添加盐和酸式盐化合物,可通过盐和酸式盐将经由将组合物与水组合所形成的提取溶液的pH维持在约4至9、约5至9或特别约6-8的范围内。

[0075] 根据示例性实施方案,组合物可包含:聚乙二醇(PEG)、蔗糖、氯化钠、硫酸二氢钠和十二烷基硫酸钠(SDS)。特别地,组合物可包含:约40 wt%量的PEG、约40 wt%量的蔗糖、约7 wt%量的 NaCl 、约7 wt%量的 NaH_2PO_4 和约6 wt%量的SDS。

[0076] 根据示例性实施方案,浓缩液可包含:氯化钠、磷酸氢二钠、聚山梨酯20和十二烷基硫酸钠(SDS)。特别地,组合物可包含:约12.8 wt%量的 NaCl 、约2.8 wt%量的 NaH_2PO_4 、10体积%量的聚山梨酯20和约4.8 wt%量的SDS。

[0077] 在某些实施方案中,组合物中可包含其它添加剂,以改进组合物的物理或化学性质,例如货架贮存稳定性或溶解度。

[0078] 在某些示例性实施方案中,组合物可以是固体粉末,其可与样品混合并溶解于水或水溶液中。

[0079] 在其它方面,组合物及其组分可以是粉末或结晶粉末。

[0080] 提取真菌毒素的方法

本发明提供从样品中提取并检测真菌毒素的方法。特别地,本发明的方法包括使用以上组合物,并排除使用任何有机溶剂。

[0081] 在一种实施方案中,提取的方法可包括以下步骤:

通过将样品与本发明的组合物组合来制备样品;以及
从制备的样品中提取真菌毒素。

[0082] 在某些实施方案中,该方法中使用的组合物可包含一种或更多种表面活性剂、一种或更多种聚合物、一种或更多种粘度改进剂、一种或更多种缓冲盐。在示例性实施方案

中,组合物可包含:约40 wt%量的PEG、约40 wt%量的蔗糖、约7 wt%量的NaCl、约7 wt%量的NaH₂PO₄和约6 wt%量的SDS。

[0083] 在另一种实施方案中,提取的方法可包括以下步骤:

通过将样品与本发明的第一浓缩液和第二浓缩液以及水组合来制备样品;以及从制备的样品中提取真菌毒素。

[0084] 在某些实施方案中,该方法中使用的第一浓缩液和第二浓缩液可包含一种或更多种表面活性剂、一种或更多种缓冲盐。在示例性实施方案中,组合物可包含:约12.4 wt%量的NaCl、约2.8 wt%量的NaH₂PO₄、10体积%量的聚山梨酯20和约10体积%量的SDS。

[0085] 在某些实施方案中,样品可以是固体。在制备样品时,固体样品可与本发明的组合物以及水组合。在其它某些实施方案中,样品可以是液体,且可通过与组合物组合来制备样品。在仍其它实施方案中,可稀释制备的样品,以获得样品中所包含的分析物的可检测范围。

[0086] 在某些实施方案中,可在约10至30°C的温度或室温下实施样品的制备,在所述温度下,组合物和分析物(即,真菌毒素)可不改变或劣化。

[0087] 在某些实施方案中,可通过本领域中的任何方法来提取样品中的分析物。该方法可包括但不限于震荡、涡旋、超声处理、热回流、微波辅助提取、受控压降提取等等。在示例性实施方案中,可在将样品与组合物组合之后通过涡旋来提取样品中的分析物。示例性涡旋可实施至少约2 min。

[0088] 在某些实施方案中,该方法可进一步包括过滤制备的样品。在某些示例性实施方案中,可在本发明的方法中使用本领域中的任何通用的过滤方法。在某些示例性实施方案中,过滤可以是但不限于真空过滤、重力过滤等等。还可使用但不限于滤纸、膜或吸附剂来实施过滤。

[0089] 在仍某些实施方案中,该方法可进一步包括分析来自样品的真菌毒素。在某些示例性实施方案中,可在样品制备之后使用亲和色谱法实施分析。该分析可以使用但不限于分析色谱柱,例如液相色谱法、高效液相色谱法(HPLC)、反相液相色谱法、测试条等等。特别地,亲和色谱柱或测试条可包含亲和树脂或物类,诸如对于真菌毒素具有特异性的抗体、配体或化学物类。

[0090] 在示例性实施方案中,可使用包含对黄曲霉毒素具有特异性的抗体的测试条,用于检测并分析制备的样品中的黄曲霉毒素。令人赞赏的是,AFLA-V[®]条测试(VICAM, Milford, MA)提供了用于本发明中的方法开发的一系列选择。

[0091] 在某些实施方案中,该方法可进一步包括对样品中真菌毒素的水平进行定量。真菌毒素可通过测试条和测试条读数器来检测,或通过亲和色谱柱来检测,由此可通过但不限于使用荧光计来分析柱洗脱液。令人赞赏的是,VICAM Series 4 EX荧光计(VICAM, Milford, MA)提供了用于本发明中的方法开发的一系列选择。

[0092] 在示例性实施方案中,可通过在单测定池荧光计中测量化学物类在约454 nm的波长处的荧光来对真菌毒素的水平进行定量。

[0093] 在其它实施方案中,该方法可进一步包括对真菌毒素的检测水平进行校准。

[0094] 实施例1

材料和试剂

从Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO) 或JT Baker/Avantor Performance Materials, Inc. (Center Valley, PA) 商购材料和试剂(例如PEG 20,000、蔗糖、NaCl、Na₂HPO₄、SDS)。

[0095] 组合物

通过将约40 wt%量的PEG 20,000、约40 wt%量的蔗糖、约7 wt%量的氯化钠(NaCl)、约7 wt%量的磷酸二氢钠(Na₂HPO₄)和约6 wt%量的SDS组合来制备组合物。

[0096] 提取和测定

测试来自Trilogy Laboratories的精细碾磨的玉米参考样品,通过HPLC测定其黄曲霉毒素水平。将玉米样品(5g)与2 g组合物和25 mL蒸馏水组合。将混合物涡旋约2分钟,并使用滤纸进行过滤,以去除来自样品的固体碎屑。获得滤液作为用于分析的提取物。

[0097] 将体积为约100 μL的提取物施加到AFLA-V®条上,并使该条展开约5 min。使用Vertu条测试阅读器(VICAM, Milford, MA)来测定黄曲霉毒素的水平。重复三次运行样品。

[0098] 结果

测量该三次重复试验中的各黄曲霉毒素浓度水平。单独的数据点、平均值和%变异系数呈现于下表中。

样品	ppb	平均值 (ppb)	标准偏差	%CV (变异系数)	HPLC 检测
1 QC 玉米	1.3	0.4	0.7	173	0 ppb
	0.0				
	0.0				
2 AC287	5.3	5.6	0.4	6	5.4 ppb
	5.6				
	6.0				
3 MTC9991	8.3	8.2	0.6	8	8.4 ppb
	8.8				
	7.5				
4 MTC9993	14.9	15.2	0.3	2	17.4 ppb
	15.3				
	15.5				
5 AC241	21.4	21.7	0.5	2	21.2 ppb
	21.5				
	22.3				
6 AC279	65.8	76.0	11.4	15	99.9 ppb
	74.0				
	88.3				

[0099] 以上结果显示与GIPSA要求相比在5 ppb、10 ppb和 20 ppb下可接受的精度和准确度。因此,本发明提供了约0至100 ppb的范围内的黄曲霉毒素的便利且准确的提取和检测方法。

[0100] 实施例2

材料和试剂

从Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO) 商购材料和试剂(例如PROCLIN 300 (TM, Supelco)、吐温20、蔗糖、NaCl、Na₂HPO₄、SDS)。

[0101] 第一浓缩溶液

通过在1L容器中将900 mL纯化水、48克SDS和5mL ProClin300组合来制备第一浓缩溶液。搅拌混合物直到所有的化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0102] 第二浓缩溶液

通过在1L容器中将800 mL纯化水、124克NaCl、28克Na₂HPO₄、100 mL吐温20和5 mL ProClin300组合来制备第二浓缩溶液。搅拌混合物直到所有的化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0103] 提取和测定

测试来自Trilogy Laboratories的三种花生糊样品,通过HPLC测定其黄曲霉毒素水平。[具有5 ppb花生的A-PP-5、具有10 ppb花生的A-PP-10和具有21 ppb花生的A-PP-21]。在每种情况中,首先将花生样品(5g)与15 mL蒸馏水组合。然后向混合物中添加5 mL第一浓缩溶液和5 mL第二浓缩溶液。将混合物涡旋约2分钟并使用滤纸进行过滤,以去除来自样品的固体碎屑。获得滤液,作为用于分析的提取物。

[0104] 将体积为约100 μL的提取物施加到AFLA-V®条上,并使该条展开约5 min。使用Vertu条测试读数器(VICAM, Milford, MA)来测定黄曲霉毒素的水平。重复三次运行样品。

[0105] 材料和试剂

从Sigma Aldrich Co(St. Louis, MO)商购材料和试剂(例如PROCLIN 300 (TM, Supelco)、吐温20、NaCl、Na₂HPO₄、SDS)。

[0106] 第一浓缩溶液

通过在1L容器中将900mL纯化水、48克SDS和5mL ProClin300组合来制备第一浓缩溶液。搅拌混合物直到所有化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0107] 第二浓缩溶液

通过在1L容器中将800 mL纯化水、124克NaCl、28克Na₂HPO₄、100 mL吐温20和5 mL ProClin300组合来制备第二浓缩溶液。搅拌混合物直到所有化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0108] 提取和测定

测试来自Trilogy Laboratories的三种花生糊样品,通过HPLC测定其黄曲霉毒素水平。[具有5 ppb糊的C-PP-5、具有10 ppb糊的C-PP-10和具有20 ppb糊的C-PP-20];在每种情况中,首先将花生样品(5g)与15 mL蒸馏水组合。然后向混合物中添加5 mL第一浓缩溶液和5 mL第二浓缩溶液。将混合物涡旋约2分钟并使用滤纸进行过滤,以去除来自样品的固体碎屑。

[0109] 将体积为约100 μL的过滤提取物施加到AFLA-V®条上,并使该条展开约5 min。使用Vertu条测试读数器(VICAM, Milford, MA)来测定黄曲霉毒素的水平。重复三次运行样品。

[0110] 结果

测量该三次重复试验中的各黄曲霉毒素浓度水平。单独的数据点、平均值和%变异系数呈现于下表中。

样品	HPLC (ppb)	T/C	ppb	平均值 (ppb)	SD	%CV
A-PP-5	5	9.47	6.7	5	0.26	23
		13.98	4.1			
		12.54	4.8			
A-PP-10	10	6.34	9.8	10	0.04	1
		6.33	9.8			
		6.83	9.2			
C-PP-20	20	2.27	20.0	22	0.98	10
		2.15	22.9			
		2.43	20.9			

[0111] 以上结果显示与GIPSA要求相比在5 ppb、10 ppb、20 ppb下可接受的精度和准确度。因此,本发明提供了黄曲霉毒素的便利且准确的提取和检测方法。

[0112] 材料和试剂

从Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO) 商购材料和试剂(例如PROCLIN 300 (TM, Supelco)、吐温20、蔗糖、NaCl、Na₂HPO₄、SDS)。

[0113] 第一浓缩溶液

通过在1L容器中将900ml纯化水、48克SDS和5ml ProClin300组合来制备第一浓缩溶液。搅拌混合物直到所有化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0114] 第二浓缩溶液

通过在1L容器中将800 mL纯化水、124克NaCl、28克Na₂HPO₄、100 mL吐温20和5 mL ProClin300组合来制备第二浓缩溶液。搅拌混合物直到所有化学品溶解于溶液中。通过添加更多的纯化水使最终体积达到1L。

[0115] 提取和测定

测试来自Trilogy Laboratories的五个精细碾磨的玉米样品,通过HPLC测定其黄曲霉毒素水平。在每种情况下,首先将玉米样品(5g)与15 mL蒸馏水组合。然后向混合物中添加5 mL第一浓缩溶液和5 mL第二浓缩溶液。将混合物涡旋约2分钟并使用滤纸进行过滤,以去除来自样品的固体碎屑。获得滤液并用Afla-V稀释剂1:1稀释,作为用于分析的提取物。

[0116] 将体积为约100 μ L的稀释提取物施加到AFLA-V®条上,并使该条展开约5 min。使用Vertu条测试读数器(VICAM, Milford, MA)来测定黄曲霉毒素的水平。重复三次运行样品。

[0117] 结果

测量该三次重复试验中的各黄曲霉毒素浓度水平。单独的数据点、平均值和%变异系数呈现于下表中。

ID	T/C	ppb	平均值 (ppb)	HPLC (ppb)
C1	19.43	2.1	1.6	<1
	24.30	0.1		
	17.95	2.6		
C2	8.56	7.4	7.0	5.4
	9.61	6.6		
	9.06	7.0		
C3	5.02	12.0	11.8	11
	5.11	11.8		
	5.24	11.5		
C4	2.45	20.8	21.4	21.2
	2.36	21.4		
	2.26	22.0		
C5	0.53	62.0	52.3	50.8
	0.76	47.0		
	0.76	47.9		

[0118] 贯穿本申请,通过作者和年份引用各种出版物(包括美国专利)以及通过号引用专利。这些出版物和专利的公开内容通过引用以其整体由此并入本申请。

[0119] 已经详细描述了本发明,包括其优选实施方案。但是,应理解,本领域技术人员在对本公开内容的考虑下,可在本发明的精神和范围之内做出修改和改进。

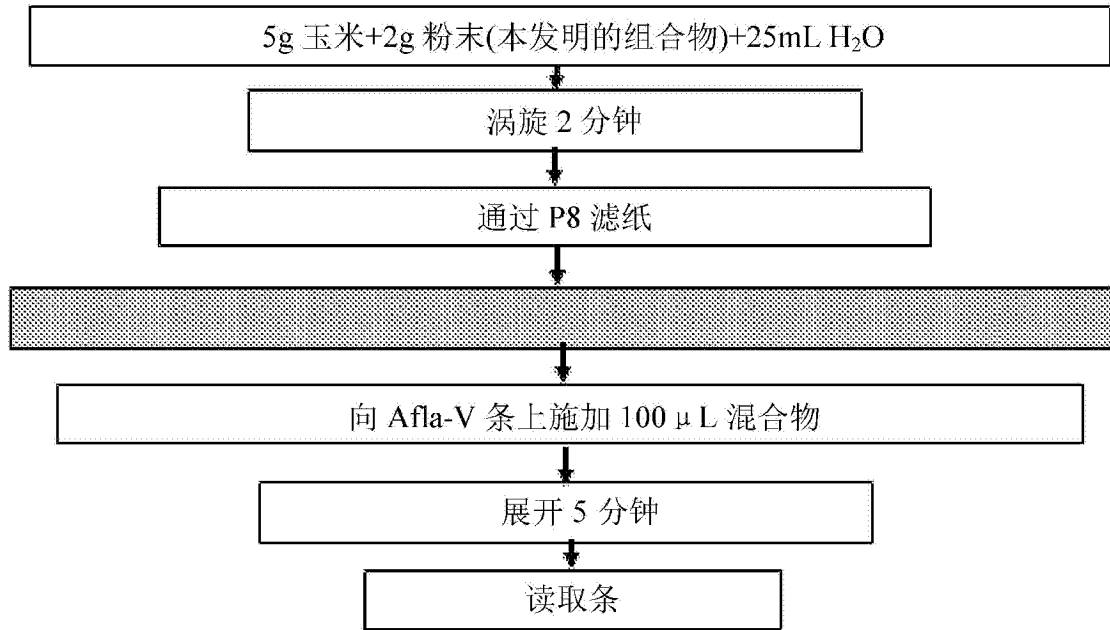


图 1

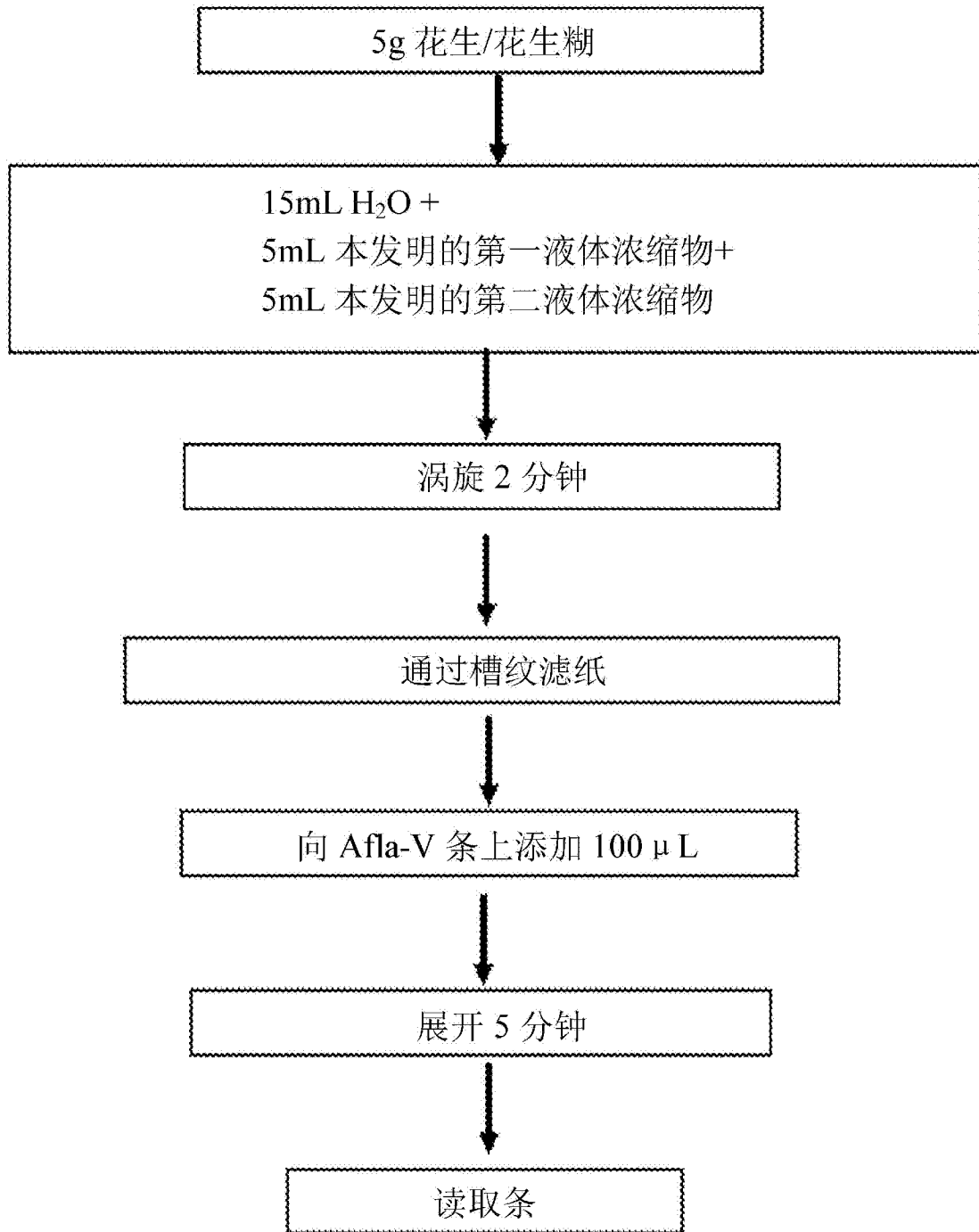


图 2

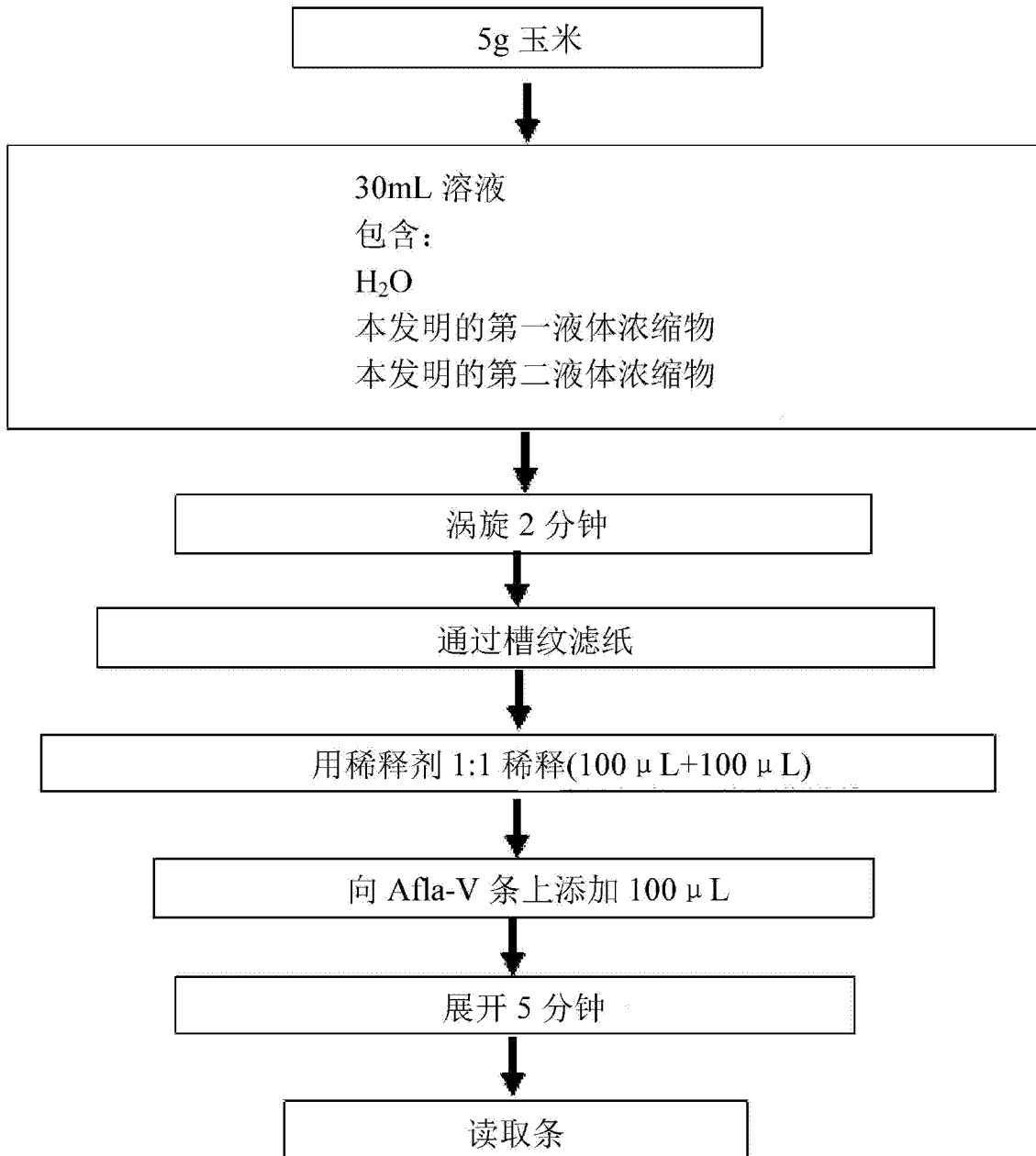


图 3