

(19)



(10)

LT 4649 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4649**

(51) Int. Cl.⁷ **A61K 31/575**

(21) Paraiškos numeris: **99-018**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 02 26**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **2000 04 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/FI96/00465**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1996 09 02**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 02 26**

(31, 32, 33) Prioritetas: **963126, 1996 08 09, FI**

(72) Išradėjas:

**Ingmar Wester, FI
Tapio Palmu, FI
Tatu Miettinen, FI
Helena Gylling, FI**

(73) Patent savininkas:

RAISIO BENECOL LTD, P.O. Box 101, FIN-21201 Raisio, FI

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Stanolio kompozicija ir jos panaudojimas

(57) Referatas:

Stanolio kompozicija, savo sudėtyje be sitostanolio, kaip pagrindinio komponento, taip pat turinti žymų kiekį, mažiausiai 10 % kampestanolio, efektyviai sumažina cholesterolio koncentracijas serume, kada ji įterpta į maisto produktus. Po esterinimo kompozicija ypač naudinga maistiniuose riebaluose ir aliejuose bei riebalų turinčiuose maisto produktuose.

Išradimas apima augalinių stanolių kompoziciją, savo sudėtyje turinčią sitostanolį, ypač naudojamą sumažinti cholesterolio koncentraciją serume. Išradime taip pat aprašoma tokios kompozicijos atitinkama esterinta forma, kuri gali būti naudinga priemonė maistiniuose aliejuose ir riebaluose bei maistiniuose produktuose, turinčiuose riebalų.

Augaliniai steroliai yra visų augalų pagrindiniai komponentai. Jų funkcijos augaluose yra panašios į cholesterolio funkcijas žinduolių organizme. Didžiausią augalinių sterolių dalį sudaro β -sitosterolis, kampesterolis ir stigmasterolis. Šių augalinių sterolių cheminė struktūra yra labai panaši į cholesterolio struktūrą, skirtumų galima rasti tik molekulės šoninėje grandinėje. Pvz., lyginant su cholesteroliu, šoninė sitosterolio grandinė turi papildomą etilo grupę, o šoninė kampesterolio grandinė - papildomą metilo grupę.

Nuo 1950 m. augaliniai steroliai žinomi kaip efektyviai mažinanti cholesterolio lygį serume priemonė. Net skiriami reliatyviai mažomis dozėmis (keli gramai per dieną), jie efektyviai mažina tiek tulžies, tiek maistinio cholesterolio absorbingumą ir tokiu būdu mažina bendro ir LDL-cholesterolio lygius serume [Grundy SM, Mok HYI. Effects of low dose phytosterols on cholesterol absorption in man. In: Greten H (Ed.) Lipoprotein metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 112-118; Mattson FH, Grundy SM, Crouse JR. Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. Am J Clin Nutr 1982; 35: 697-700; taip pat Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 1995; 57: 195-206; Pollak OJ. Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis. Pharmac Ther 1985; 31: 177-208]. Cholesterolio absorbcijos apribojimo mechanizmas iki šiol detalčiai nežinomas, tačiau manoma,

jog augaliniai steroliai pašalina cholesterolį iš micelinės fazės ir tokiu būdu trukdo jo absorbcijai. Praktiškai visose ankstesnėse studijose didžiausią susidomėjimą tarp augalinių sterolių kėlė sitosterolis arba jo hidrinta forma sitostanolis. Tačiau išbandytų sterolių preparatų sudėtis ne visada būdavo nurodoma, o daugelyje tyrimų naudoti sterolio preparatai turėdavo taip pat įvairius kiekius kitų sterolių.

Į augalinius sterolius buvo žiūrima kaip į saugų būdą sumažinti cholesterolio lygius serume, kadangi jie yra natūralūs augalinių riebalų ir aliejų komponentai. Be to, jų absorbcija sveikų žmonių žarnyne yra ribota, o absorbuoti riboti kiekiai iš organizmo pašalinami per tulžį. Skirtingų individų ir skirtingų augalinių sterolių absorbcijos greitis svyruoja, tačiau sveiki žmonės iš virškinamojo trakto paprastai absorbuoja mažiau negu 5% augalinių sterolių [Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 1995; 57: 195-206]. Nežiūrint to, yra parodyta, jog absorbuojama iki 10% maistinio kampesterolio [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831].

Esant kai kuriems retiems susirgimams, pvz., sitosterolemijai, augaliniai steroliai absorbuojami ypatingai efektyviai, o pasišalinimas iš organizmo per tulžį yra susilpnėjęs. Sitosterolio, kampesterolio, o taip pat jų sočiųjų formų - sitostanolio ir kampestanolio lygiai serume yra žymiai aukštesni. Didesni sočiųjų stanolių lygiai yra daugiau ne dėl jų efektyvesnės absorbcijos [Dayal B, Tnt GS, Batta AK, Speck J, Khachadurian AK, Shefer S, Salen G. Identification of 5- α stanols in patients with sitosterolemia and xanthomatosis: stereochemistry of the protonolysis of steroidal

organoboranes. Steroids 1982; 40: 233-243; Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 1995; 57: 195-206], bet dėka efektyvesnės endogeninės
5 sintezės. Negydoma sitosterolemija jau jaunystėje sukelia ksantomatozę ir širdies vainikinių kraujagyslių ligą. Paskyrus šia liga sergantiems žmonėms nesočiųjų augalinių sterolių kiekius, didesnius negu jie paprastai randami maisto produktuose, galima sukelti sveikatai pavojingus
10 efektus.

Lees ir Lees [Lees RS, Lees AM. Effects of sitosterol therapy on plasma lipid and lipoprotein concentrations. In: Greten H (Ed) Lipoprotein metabolism. Springer-
15 Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 119-124] tyrė trijų skirtingų sitosterolio preparatų poveikį lipidų ir lipoproteinų koncentracijai plazmoje. Vienas iš šių preparatų buvo komercinis preparatas Cytellin (Eli Lilly Co., JAV), kuris turėjo 60-65% sitosterolio ir 35-40%
20 kitų sterolių, daugiausia kampesterolio. Vidutinė 18 g/dienai dozė, padalinta į tris porcijas, bendro cholesterolio kiekį plazmoje vidutiniškai sumažino 10,5%, o LDL-cholesterolio - 15%. Tačiau, kada plazmoje buvo aptinkami sterolių, įskaitant kampesterolį [Dayal B, Tnt
25 GS, Batta AK, Speck J, Khachadurian AK, Shefer S, Salen G. Identification of 5- α stanols in patients with sitosterolemia and xanthomatosis: stereochemistry of the protonolysis of steroidal organoboranes. Steroids 1982; 40: 233-243; Salen G, Ahrens Jr. EH, Grundy SM.
30 Metabolism of β -sitosterol in man. J Clin Invest 1970, 49: 952-967. J Nutr Sci Vitaminol 1981; 27: 243-251], tiksliai pėdsakai, plazmoje subjektų, tirtų Lees ir Lees [Lees RS, Lees AM. Effects of sitosterol therapy on plasma lipid and lipoprotein concentrations. In: Greten H
35 (Ed) Lipoprotein metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 119-124], kampesterolių

koncentracija svyravo nuo 4 iki 21 mg/dl. Diskusijoje autoriai labai griežtai pareiškė, jog, kadangi, kampesterolio aterogeniškumas yra neaiškus, sitosterolis su santykinai aukštu kampesterolio kiekiu, tokiu, kokį turi jų tyrimuose naudotas Cytellin preparatas, nerekomenduotinas.

Be to, Lees ir kt. [Lees AM, Mok HYI, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. Atherosclerosis 1977; 28: 325-338] tyrinėjo sojos pupelių aliejaus ir talo alyvos augalinių sterolių efektyvumą, mažinant kraujo cholesterolio lygį. Jie naudojo kiekvieno augalinio sterolio dvi skirtingas fizines formas, būtent, suspensiją ir miltelius. Sojos sterolis turėjo 60-65% sitosterolio ir 35 % kampesterolio, o dienos dozė - apytikriai 18 g sterolių/dienai (9-24 g ribose) - buvo dalinama į tris lygias porcijas. Šiuose tyrimuose buvo naudojamas talo alyvos sterolio preparatas, turintis tiksliai apie 5 % kampesterolio. Buvo testuojami abu talo alyvos sterolių preparatai (miltelių ir suspensijos formose), kurių dienos dozė sudarė 3 g. Papildomai buvo tirinama talo alyvos sterolio suspensija, kurios dozė buvo 6 g.

Sojos sterolis abiejose fizinėse formose ir talo alyvos sterolis miltelių formoje cholesterolio kiekį plazmoje sumažino apytikriai 12% [Lees AM, Mok HYI, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. Atherosclerosis 1977; 28: 325-338]. Beje, jau anksčiau minėtas reliatyviai aukštas kampesterolio absorbingumas taip pat buvo nustatytas šiame tyrime. 5 tirtų pacientų kampesterolio lygiai serume svyravo nuo 5 iki 21 mg/dl (vidurkis 16 mg/dl). Tačiau vėl, net įrodžius žymų sojos

- sterolio efektą, mažinant cholesterolio lygį, autoriai nerekomendavo jo, kaip cholesterolio kiekį mažinančio agento, naudojimą. Priešingai, jie rekomendavo, jog augalinių sterolių farmaciniai preparatai turi turėti
- 5 minimalų kiekį kampesterolio ir maksimalų kiekį sitosterolio. Remiantis aukščiau cituotais dviem tyrimais, galima padaryti išvadą, jog augalinio aliejaus sterolių, pvz., sojos sterolio, naudoti griežtai nerekomenduojama.
- 10 Dauguma augalinių aliejų turi tik pėdsakus sočiųjų augalinių sterolių, pvz., sitostanolio ir kampestanolio. Tačiau talo alyvos steroliai turi 10-15 % sitostanolio, sočiosios sitosterolio formos. Sitostanolį taip pat galima gauti, hidrinant dvigubą sitosterolio jungtį.
- 15 Vėlesniuose tyrimuose, atliktuose su eksperimentiniais gyvuliukais ir žmonėmis, buvo įrodyta, jog, mažinant cholesterolio kiekį, sitostanolis yra efektyvesnis, negu sitosterolis [Becker M, Staab D, Von Bergmann K. Treatment of severe familial hypercholesterolemia in
- 20 childhood with sitosterol and sitostanol. J pediatr 1993; 122: 292-296; Hassan AS, Rampone AJ. Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β -sitostanol in the rat. L Lipid Res 1979; 20: 646-653; Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K. Effect of low-dose
- 25 sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. Atherosclerosis 1986; 61: 219-223; Heinemann T, Pietruck B, Kullack-Ublick G, von Bergmann K. Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption. Agents Actions
- 30 (Suppl) 1988; 26: 117-122; Heinemann T, Kullak-Ublick G-A, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Eur J Clin Pharmacol 1991; 40: 59-63; Vanhanen HT, Miettinen TA. Effects of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents. Clin Chim
- 35 Acta 1992; 205: 97-107].

Papildomas sitostanolio pranašumas yra tai, jog jis faktiškai yra neabsorbuojamas. Kai kurie tyrimai (pvz., Czubayko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lutjohann D, von Bergmann K. A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. J Lipid Res 1991; 32: 1861-1867; Hassan AS, Rampone AJ. Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β -sitostanol in the rat. L Lipid Res 1979; 20: 646-653; Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K. Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. Atherosclerosis 1986; 61: 219-223; Ikeda I, Sugano M. Comparison of absorption and metabolism of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. Atherosclerosis 1978; 30: 227-237] parodė, jog sitostanolis praktiškai neabsorbuojamas, kai tuo tarpu jo nesočiosios formos (sitosterolio) maži kiekiai (<5 %) gali būti absorbuojami [Salen G, Ahrens Jr. EH, Grundy SM. Metabolism of β -sitosterol in man. J Clin Invest 1970, 49: 952-967. J Nutr Sci Vitaminol 1981; 27: 243-251]. Panašiai, *in vitro* tyrimuose Armstrong ir Carey [Armstrong MJ, Carey MC. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. J Lipid Res 1987; 28: 1144-1155] taip pat parodė, jog cholestanolis, cholesterolio sočioji forma, buvo hidrofobiškesnė ir mažiau absorbuojama negu cholesterolis.

Sitostanolis gaunamas hidrinant labiausiai įprastus augalinių sterolių šaltinius, o iš kampesterolio susidaro kitas sotusis augalinis sterolis, būtent, kampestanolis. Iki šiol, palyginti mažai buvo žinoma apie šio stanolio absorbingumą ir galimą hipcholesteroleminį efektą. Remiantis anksčiau pateiktais duomenimis, jog sotieji steroliai yra mažiau absorbuojami negu jų nesočiosios formos, galima iškelti hipotezę, jog kampestanolis faktiškai gali būti neabsorbuojamas.

Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831], tirdami skirtingų augalinių sterolių absorbingumą perfuzine žarnyno technika, cholesterolio absorbciją žarnyne palygino su kampesterolio, sitosterolio, stigmasterolio absorbcija, o taip pat su sitostanolio ir kampestanolio žemomis koncentracijomis žmogaus organizme. Rezultatai parodė, kad skirtingų augalinių sterolių absorbcijos laipsnis skiriasi: sitosterolio - apytikriai 4,2%, stigmasterolio - 4,8%, kampesterolio - 9,6% ir kampestanolio - 12,5%. Dideli absorbcijos efektyvumo svyravimai nustatyti, tiriant dešimt vyriškos lyties asmenų.

15 Tokiu būdu, Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831] nustatė, jog kampestanolis yra efektyviau absorbuojamas negu kampesterolis, jo nesočioji forma. Tai prieštarauja prielaidai, kuri remiasi anksčiau cituotais tyrimais, teigiančiais, jog sotieji steroliai (sitostanolis, cholestanolis) absorbuosis silpniau, negu nesotieji steroliai (sitosterolis, cholesterolis). Šio reiškinių priežastis lieka neaiški. Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831] spėlioja, jog šių prieštarų rezultatų priežastis galėtų būti tai, jog Armstrong ir Carey [Armstrong MJ, Carey MC. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. J Lipid Res 1987; 28: 1144-1155] tyrimus atliko *in vitro* sąlygomis ir kad hidrofobiškumo teorija yra pagrindinis faktorius micelinizacijoje ir/arba absorbcija galėjo būti kitokia *in vivo* sąlygomis. Tačiau ši spėlionė nepaaiškina fakto, jog atskiri tyrimai, kurie

rodė prastesnį sitostanolio absorbingumą, lyginant su sitosterolio absorbingumu, buvo atlikti *in vivo* sąlygomis. Tokiu būdu, Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal
5 absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831] duomenys, prieštaraujantys ankstesniems rezultatams, liko autorių nepaaiškinti.

10 Sugano ir kt. [Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. Atherosclerosis 1976; 24: 301-309]

tyrinėjo hipocholesteroleminį aktyvumą kukurūzų sterolių (sudėtis: 31% kampesterolio, 4% stigmasterolio ir 65%
15 sitosterolio) ir kukurūzų stanolių (sudėtis: 31% kampestanolio ir 69% sitostanolio), gautų hidrinant kukurūzų aliejaus sterolių mišinį. Buvo atlikti du bandymai su žiurkėmis. Tiek sterolis, tiek stanolis, pasižymėjo hipocholesteroleminiu efektu 0,5-1% (maisto
20 raciono) eilės, kai cholesterolis (1% maisto raciono) patekdavo į skrandį. Pirmame bandyme nebuvo pastebėta esminio skirtumo tarp fitosterolių ir fitostanolio hipocholesteroleminių efektų. Tačiau sekančiame eksperimente, esant toms pačioms koncentracijoms maiste,
25 fitostanoliai žymiai daugiau mažino cholesterolio koncentraciją plazmoje, lyginant su fitosteroliais (statistinis patikimumas $p < 0,02$). Be to, žiurkių, šertų maistu, turinčiu 1% stanolio, plazma turėjo žymiai žemesnius cholesterolio lygius ($p < 0,02$), negu gyvuliukai,
30 gavę maistą be cholesterolio. To nebuvo pastebėta, šeriant žiurkes maistu, turinčiu 1 % sterolio.

Sugano ir kt. [Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats.
35 Atherosclerosis 1976; 24: 301-309] netyrinėjo hipocholesteroleminio efekto skirtumo tarp stanolio

mišinių, turinčių didelę koncentraciją sitostanolio bei mažą koncentraciją kampestanolio (talo alyvos sterolio pagrindu), ir stanolio mišinių su žymiai didesne kampestanolio koncentracija (augalinio aliejaus sterolio pagrindu). Jie palygino nesočiųjų sterolių mišinio ir atitinkamo sočiųjų stanolių mišinio hipocholesteroleminį efektą. Vėlesnės šios grupės tyrimo studijos buvo sutelktos konkrečiai į sitostanolio įtaką, mažinant cholesterolio koncentraciją, lyginant su sitosterolio poveikiu [Ikeda I, Sugano M. Comparison of absorption and metabolism of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *Atherosclerosis* 1978; 30: 227-237; Ikeda I, Tanabe Y, Sugano M. Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr SCI Vitaminol* 1989; 35: 361-369; Ikeda I, Kawasaki A, Samezima K, Sugano M. Antihypercholesterolemic activity of β -sitostanol in rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol* 1981; 27: 243-251; Sugano M, Morioka H, Ikeda I. A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *J Nutr* 1977; 107: 2011-2019]. Iš tikrųjų, vėlesnėje publikacijoje [Ikeda I, Kawasaki A, Samezima K, Sugano M. Antihypercholesterolemic activity of β -sitostanol in rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol* 1981; 27: 243-251] jie remiasi fitostanolio tyrimu, paminėtu anksčiau [Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. *Atherosclerosis* 1976; 24: 301-309], užsimenant tiksliai, kad β -sitostanolio hipocholesteroleminis efektas prilyginamas β -sitosteroliui, neaiškinant sočiųjų sterolių (įskaitant kampestanolį) hipocholesteroleminio efekto, prilyginamo nesotiesiems steroliams. Vėlesniuose tyrimuose buvo naudojami anksčiau minėti sterolių mišiniai, turintys tipinę hidrintų talo alyvos sterolių kompoziciją su didele sitostanolio (>90 %) koncentracija.

Miettinen ir Vanhanen [Miettinen TA, Vanhanen H. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis* 1994; 105: 217-226] parodė, kad, mažinant cholesterolio koncentraciją serume, sitostanolis, esantis riebalų rūgščių esterio formoje, yra efektyvesnis už laisvą sitostanolį. Vėlesni tyrimai taip pat parodė, kad sitostanolio esterių, kaip dalies dienos maisto raciono, vartojimas yra efektyvus būdas sumažinti bendro ir LDL-cholesterolio koncentracijas serume [Gylling H, Miettinen TA, Serum cholesterol lowering by dietary sitostanol is associated with reduced absorption and synthesis of cholesterol and decreased transport of LDL apoprotein B in men with type II diabetes. In: Gotto Jr AM, Mancini M, Richter WO, Schwandt P (Eds) *Treatment of severe dyslipoproteinemia in the prevention of coronary heart disease. 4th Int Symp Munich 1992*, Karger, Basel, 1993: 57-59; Gylling H, Miettinen TA. Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment. *Diabetologia* 1994; 37: 773-780; Gylling H, Siimes MA, Miettinen TA. Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1995; 36: 1807-1912; Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *New Engl J Med* 1995; 333: 1308-1312; Vanhanen HT, Blomqvist S, Enholm C, Hyvonen M, Jauhiainen M, Torstila I, Miettinen TA. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J Lipid Res* 1993; 34: 1535-1544; Vanhanen HT, Kajander J, Lehtovirta H, Miettinen TA. Serum levels, absorption efficiency, faecal elimination and synthesis of cholesterol during

- increasing doses of dietary sitostanol esters in hypercholesterolaemic subjects. Clin Sci 1994; 87: 61-67]. Stanolio esterų panaudojimas vietoj laisvojo stanolio taip pat yra naudingas tuo, kad stanolio esteriai yra tirpūs riebaluose ir dėl to gali būti lengvai įterpiami į daugelį maisto produktų, nepakeičiant galutinio produkto skonio, aromato ar fizinio būvio. Sitostanolio riebalų rūgščių esterų gavimo ir riebaluose tirpių stanolio esterų panaudojimo maisto produktuose būdas atskleistas JAV patente Nr. 5502045 [Miettinen TA, Vanhanen H, Wester I. Use of stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level. 1996] (ši nuoroda yra neatskirama aprašymo dalis).
- 15 Straub [JAV patentas 5244887; Straub CD. Stanols to reduce cholesterol absorption from foods and methods of preparation and use thereof. 1993] siūlo sočiuosius stanolius (sitostanolį, klionastanolį, 22,23-dihidrobrassikastanolį, kampestanolį ir jų mišinius) panaudoti maisto priedų kompozicijos sudarymo būde, kur stanoliai yra sumaišomi su maistiniu tirpumo agentu, efektyviu tinkamo antioksidanto kiekiu ir efektyviu tinkamo dispergento kiekiu. Šie maisto priedai yra skirti cholesterolio absorbcijai iš maisto produktų bei gėrimų, turinčių cholesterolio, pvz., mėsos, kiaušinių ir pieno produktų, sumažinti. Tačiau šiame patente nepateikiama duomenų, rodančių kokius nors klinikinius efektus, arba tai, jog vyksta maistinių sterolių absorbcija.
- 30 Eugster ir kt. [JAV patentas 5270041; Eugster C, Eugster C, Haldemann W, Rivara G. Sterols, their fatty acid esters and glucosides; processes for their preparation; spontaneously dispersible agents containing these compounds, and their use for treatment of tumors. 1993] dėsto apie sterolių, jų riebalų rūgščių esterų ir gliukozidų nedidelių kiekių panaudojimą auglių gydymui. Gavimo būdai, siūlomi Eugster ir kt., apima pavojingus

cheminius reagentus, tokius kaip N,N'-karbonildiimidazolas, tionilo chloridas, ir tirpiklius, kaip tetrahidrofuranas, benzenas, chloroformas arba dimetilformamidas. Eugster ir kt. komentuoja galimą šių medžiagų, kaip dietinių maisto produktų bei maisto priedų panaudojimą, bet nepateikia jokių duomenų apie hipocholesteroleminius efektus ir nepareiškia tokio panaudojimo punktų išradimo apibrėžtyje. Remiantis Eugster ir kt. aprašymu, yra sunku gauti aiškų vaizdą, kaip galutinis produktas gryninamas, norint gauti pakankamai švarų sterolio esterį dideliais kiekiais, kad jo pakaktų kaip maistinio produkto komponento panaudojimui. Vieninteliai nurodyti valymo būdai yra plonasluoksnė chromatografija ir didelio slėgio skysčių chromatografija. Dėl šios priežasties gavimo būdas, nurodytas Eugster ir kt. patente, yra ribojamas, gaunant tik mažus kiekius.

JAV patentas 3751569 [Clear cooking and salad oils having hypocholesterolemic properties. 1973] siūlo augalinių sterolių riebalų rūgščių esterių priedą kepimo aliejui, siekiant sumažinti cholesterolio kiekius žmogaus serume. Laisvų sterolių esterinimui patentas siūlo metodą, kuris neatitinka maisto produktų klasės gamybos reikalavimų. Pagal patentą laisvojo sterolio esterinimas atliekamas riebalų rūgšties anhidridu, dalyvaujant katalizatoriui perchlorato rūgščiai. Naudojami katalizatorius ir reagentas negali būti priimtini maisto apdorojimo procesuose. Be to, patentas apima tikrai gamtinių augalinių sterolių riebalų rūgšties esterius. Vokietijos patente DE 2248921 [Baltes J, Merkle R. Verfahren zur Herstellung eines Gemisches aus pflanzlichen und tierischen Ölen bzw. Fetten und Fettsäureesternestern] pateiktas sterolių, esančių aliejuose ir riebaluose, esterinimo būdas, naudojant cheminį tarpusavio esterinimo metodą, atitinka maisto apdorojimo procesų kriterijus. Šiame patente laisvasis

sterolis ir riebalų rūgšties esterių perteklius yra dedami į aliejaus arba riebalų mišinį, po to visas riebalų mišinys esterinamas, naudojantis žinomu tarpusavio esterinimo metodu. Gautame riebalų mišinyje
5 faktiškai visi laisvieji steroliai yra konvertuoti į riebalų rūgšties esterius. Šios operacijos tikslas yra apsaugoti laisvuosius sterolius augaliniuose ir gyvuliniuose aliejuose nuo galimų pokyčių technologinių procesų metu.

10

Ankstesni duomenys rodo, jog kampesterolis, vienas iš svarbiausių augalinių sterolių, absorbuojamas santykinai efektyviai. Todėl yra rekomenduotina, jog būtų naudojami tiktai augalinių sterolių mišiniai, turintys minimalų
15 kiekį kampesterolio. Praktiškai tai įgalina naudoti sterolių mišinius, pvz., talo alyvos sterolius, turinčius didelį kiekį sitosterolio.

Daugiausia darbų su stanoliais atlikta naudojant tik
20 sitostanolį. Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831] tyrimai, rodantys, jog kampestanolis, sočioji kampesterolio forma, yra lengviau
25 adsorbuojamas negu kampesterolis arba sitosterolis (12,5%, 9,6% ir 4,2% atitinkamai), leidžia manyti, jog sočiųjų sterolių mišiniai, turintys "uždidintus" kampestanolio kiekius, yra nesaugūs dėl kampestanolio absorbcijos. Aiškus to įrodymas yra tai, jog visi
30 klinikiniai tyrimai, apimantys stanolių (sitostanolio) panaudojimą, remiasi sterolių mišiniais, turinčiais didelį sitostanolio kiekį ir mažą kampestanolio kiekį.

Daugelyje tyrimų (pvz., Becker M, Staab D, Von Bergmann K.
35 Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. J pediatr 1993; 122: 292-296; Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K.

- Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1986; 61: 219-223; Heinemann T, Pietruck B, Kullack-Ublick G, von Bergmann K. Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption. *Agents Actions (Suppl)* 1988; 26: 117-122; Heinemann T, Kullack-Ublick G-A, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40: 59-63; Ikeda I, Kawasaki A, Samezima K, Sugano M. Antihypercholesterolemic activity of β -sitostanol in rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol* 1981; 27: 243-251; Vanhanen HT, Miettinen TA. Effects of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents. *Clin Chim Acta* 1992; 205: 97-107) nustatyta, jog, mažinant cholesterolio koncentraciją kraujuje, sitostanolis, sočioji sitosterolio forma, yra efektyvesnis, negu atitinkamas nesotusis sitosterolis. Be to, sotieji steroliai absorbuojami labai ribotais kiekiais ir tai daro saugiu šių sterolių panaudojimo būdą, mažinant cholesterolį gyventojų mastu. Iš nesočiųjų sterolių ypač kampesterolis yra absorbuojamas dideliais kiekiais, pakankamais pareikšti rekomendacijas nenaudoti sterolio mišinių, turinčių padidintus kampesterolio (pvz., sterolio mišiniai augalinio aliejaus pagrindu) kiekius [Lees RS, Lees AM. Effects of sitosterol therapy on plasma lipid and lipoprotein concentrations. In: Greten H (Ed) *Lipoprotein metabolism*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 119-124; Lees AM, Mok HYI, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977; 28: 325-338].
- Egzistuoja neigiamas nusistatymas prieš kampestanolio, kaip medžiagos, pridedamos kiek žymesniais kiekiais į maisto produktus, naudojimą ir tai rimtai apriboja

fitosterolio turinčių žaliavų spektrą tik medžiagomis, turinčiomis palyginti nedidelį kampesterolio ir jo sočiosios formos, kampestanolio, kiekį.

5 Išradime pateiktos augalinių stanolių kompozicijos, skirtos cholesterolio koncentracijos mažinimui kraujo serume pagrindiniu komponentu turi sitostanolius, o kartu turi žymius kampestanolio kiekius, laisvoje formoje arba esterintoje, riebalų rūgšties esterių formoje.

10

Toliau išradimas apima stanolio kompozicijų, turinčių sitostanolį kaip pagrindinį komponentą, o taip pat žymius kampestanolio kiekius arba riebalų rūgščių esterius, panaudojamą maisto produktuose kaip dietinį
15 priedą cholesterolio koncentracijai mažinti kraujo serume.

Išradimo tikslas yra praplėsti augalinių žaliavų, naudojamų maisto produktų priedų gavimui, asortimentą,
20 ypač maistinių aliejų ir riebalų bei riebalų turinčių maisto produktų, skirtų reguliuoti cholesterolio koncentracijas kraujo serume. Išradime siūloma žaliava šiems tikslams panaudoti augalinius aliejus ir riebalus, šalia sitosterolio turinčius taip pat žymų kiekį
25 kampesterolio.

Šio išradimo kompozicijų gavimui tinkamos žaliavinės medžiagos gali būti, pvz., kukurūzai, sojos pupelės ir rapso sėklos, o taip pat kiti augalai, turintys
30 fitosterolių kompoziciją su dideliu kiekiu kampesterolio.

Šio išradimo nauja kompozicija, o ypač jos esterinta forma, gali būti įterpta į maisto produktus, pvz., kepimo aliejus, margarinus, sviestą, majonezą, salotų užpilus,
35 riebalus tešlos trapumui padidinti, sūrius (įskaitant nesubrandintus ir subrandintus sūrius) bei kitus riebalų turinčius maisto produktus.

Išradimo kompozicija gali būti vartojama ir kaip tokia.

- 5 Augalinio stanolio kompoziciją pagal šį išradimą be jos pagrindinio komponento, sitostanolio, sudaro taip pat žymus, mažiausiai 10%, kampestanolio kiekis. Kompozicijos optimalioje sudėtyje yra nuo 20% iki 40%, optimaliau - nuo 25% iki 35%, pvz., apie 30 %
10 kampestanolio arba jo riebalų rūgšties esterio, kada kompozicija esterinama, norint ją paversti lipofiline.

Šiame aprašyme visos procentinės sudėtys pateiktos pagal masę, jeigu nenurodyta kitaip.

15

- Gauti duomenys netikėtai ir priešingai vyraujančiai išankstinei nuomonei, rodo, jog hidrinto stanolio mišinys, savo sudėtyje pagrindiniu komponentu turintis sitostanolį su žymiais kampestanolio kiekiais, yra
20 mažiausiai tokio pat efektyvumo, kaip stanolio mišinys, turintis daugiau kaip 90% sitostanolio ir nedidelį kiekį kampestanolio, pažymint, jog kampestanolis yra bent tiek pat efektyvus, mažinant cholesterolio absorbciją, kaip ir sitostanolis. Dar daugiau, kraujo serumo sterolio tyrimų
25 duomenys aiškiai rodo, jog kampestanolis pasilieka faktiškai neabsorbuotas, jo lygis serume yra maždaug 40% mažesnis negu sitostanolio. Tokiu būdu, į stanolio mišinį, turintį pagrindiniu komponentu stanolį su žymiais kampestanolio kiekiais, gali būti žiūrima kaip į tokį pat
30 nepavojingą įprastinį stanolio mišinį talo alyvos pagrindu. Šie duomenys labai skiriasi nuo paplitusios nuomonės dėl stanolio mišinių, turinčių padidintus kampestanolio kiekius, efektyvumo ir rizikingumo laipsnio [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of
35 intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831; Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: A review

of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 1995; 57: 195-206; Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. Atherosclerosis 1976; 24: 301-309].

5

JAV patente Nr. 5502045 teigiama, jog sitosterolio riebalų rūgščių esteriai yra efektyvesni, mažinant cholesterolio koncentraciją kraujyje, negu laisvas sitosterolis. Vėlesni tyrimai aiškiai patvirtino margarino, turinčio riebaluose tirpių sitosterolio riebalų rūgšties esterių, cholesterolio kiekį mažinantį efektą [Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitosterol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. New Engl J Med 1995; 333: 1308-1312].

Stanolio riebalų rūgšties esterių panaudojimas vietoj laisvųjų stanolių yra lemiamas faktorius jų plačiam vartojimui įvairiuose riebalų turinčiuose maisto produktuose, nes tiksliai stanolio riebalų rūgšties esteriai pasižymi pakankamai dideliu tirpumu maistiniuose aliejuose ir riebaluose, kas leidžia pasiekti lygius, efektyviai mažinančius tiek maistinio, tiek tulžies cholesterolio absorbciją virškinamajame trakte.

Stanolio esterių tirpumas maistiniuose aliejuose ir riebaluose yra 35-40% eilės, kai tuo tarpu laisvųjų sterolių tirpumas maistiniuose aliejuose ir riebaluose 21°C temperatūroje maksimaliai pasiekia tik 2% pagal masę [Jandacek RJ, Webb MR, Mattson FH. Effect of an aqueous phase on the solubility of cholesterol in an oil phase. J Lipid Res 1977; 18: 203-210]. Didesni kiekiai gali būti įterpiami, naudojant įvairias paviršinio aktyvumo medžiagas, soliubilizavimo bei dispergavimo agentus, bet net šių medžiagų vartojimas neužtikrina jų tirpumo riebaluose. Aukščiau minėtų medžiagų naudojimas praktiškai yra ribojamas arba net draudžiamas

įstatymiškai. Dar daugiau, esant laisvųjų sterolių 1% koncentracijai, gali būti paveiktos riebalų arba aliejaus fizinės savybės, kas sąlygotų produkto struktūros ir fizinės būsenos pokyčius. Taip neatsitinka, kai naudojami
5 stanolio riebalų rūgšties esteriai, kadangi riebalų mišinio fizinės savybės gali būti lengvai modifikuojamos, keičiant mišinio riebalų rūgščių sudėtį.

Akivaizdu, jog stanolio riebalų rūgščių esteriai gali
10 būti lengvai įterpiami ir į kitus maisto produktus, ne tik į margarinus, ir gali būti paskleisti, kaip aprašyta šiame išradime. JAV patentas Nr.5502045 pateikia papildomus galimo panaudojimo pavyzdžius. Tačiau specialistams ir be to yra aišku, kad stanolio riebalų
15 rūgščių esteriai gali būti dedami į daugelį maisto produktų, ypač į riebalų turinčius maisto produktus.

Siūloma daugybė būdų sterolių riebalų rūgščių esterių gavimui. Šie būdai turi tokį trūkumą, jog beveik visi jie
20 naudoja reagentus, kurie nepriimtini maisto produktų, skirtų naudoti kaip makromaistinės medžiagos (makroelementai), gamyboje. Toksinių reagentų, pvz., tionilo chlorido bei riebalų rūgščių anhidridinių darinių, naudojimas yra įprastas reiškinys.

25 Tinkamas būdas sterolių stanolio riebalų rūgščių esteriams gauti pateikiamas JAV patente Nr. 5502045 [Miettinen TA, Vanhanen H, Wester I. Use of stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level. 1996];
30 ši nuoroda yra neatskiriama aprašymo dalis). Šios procedūros esmę sudaro tarpusavio esterinimo būdas, plačiai taikomas maistinių riebalų bei aliejų pramonėje. Šis esterinimo būdas turi pranašumų prieš ankstesnius būdus tuo, jog jame nenaudojama jokių kitų medžiagų,
35 išskyrus laisvąjį stanolį, riebalų rūgščių esterį arba riebalų rūgščių esterių mišinį bei tarpusavio esterinimo katalizatorių - natrio etilatą. Viena svarbi šio būdo

ypatybė yra tai, jog vienas iš reagentų, riebalų rūgšties esteris, naudojamas perteklyje ir esamose sąlygose (5-15 mmHg vakuumas) jis yra tirpiklis, tirpinantis stanolį. Reakcijos metu gaunamas riebalų rūgščių esterių ir stanolio riebalų rūgščių esterių mišinys. Stanolio riebalų rūgščių esteriai gali būti lengvai sukonzentruojami iki beveik grynų stanolio riebalų rūgščių esterių, distiliuojant vakuume, ko dėka yra pašalinamas riebalų rūgščių esterių perteklius. Alternatyviai, mišinį galima dėti į galutinį riebalų mišinį, prieš atliekant dezodoravimo stadiją.

Stanoliai nedideliais kiekiais yra randami gamtoje, pvz., kviečiuose, rugiuose, kukurūzuose bei tritikaliuose ir todėl nedideli jų kiekiai [Dutta PC, Appelqvist LA. Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids. J Sci Food Agric 1996; 71: 383-391; Gylling H, Miettinen TA. Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment. Diabetologia 1994; 37: 773-780] esti kasdieniniame maiste. Stanoliai lengvai gali būti gaunami hidrinant natūralių sterolių mišinius. Tačiau ankstyvaisiais 1996 m. tikrai talo sterolio mišiniai, kurie pasižymi pakankamai aukšto švarumo laipsniu (sterolio kiekis >98%), komerciškai buvo prieinami naudoti maistui. Augaliniai steroliai, turintys žymius kiekius kampesterolio, kaip antai, sterolio mišiniai augalinio aliejaus pagrindu, gali būti, pvz., gaunami kaip tokoferolio gamybos iš augalinio aliejaus distiliatų šalutinis produktas. Augaliniai steroliai gali būti konvertuojami į stanolius, remiantis žinomais hidrinimo metodais, pvz., naudojant Pd/C katalizatorių organiniuose tirpikliuose [Augustine RL, Reardon Jr. EJ 1969. The palladium catalyzed hydrogenation of cholesterol. Org Prep and Proced 1969; 1: 107-109]; ši nuoroda yra

neatskiriama aprašymo dalis. Specialistams aišku, jog, atliekant hidrinimą, gali būti naudojami labai įvairūs Pd katalizatoriai ir tirpikliai ir, esant optimalioms sąlygoms, nesočiųjų nekonvertuotų sterolių išlieka tik
5 maži kiekiai, o tipinių dehidroksilintų šalutinių produktų, stanų ir stenų, taip pat susidaro labai nedaug (<1,5 %).

Šiame išradime palyginamas hipocholesteroleminis efektas
10 stanolio mišinio, turinčio didelį kiekį sitostanolio, kurį ekspertai laiko labiausiai nežalingu ir efektyviausiu augaliniu steroliu, mažinančiu cholesterolio absorbciją ir tuo pačiu cholesterolio koncentracijas serume, su efektu stanolio mišinio,
15 turinčio žymų kiekį kampestanolio. Šiame aprašyme pirmą kartą paskelbta apie augalinių aliejų stanolių hipocholesteroleminius efektus žmogaus organizme. Šiame išradime pirmą kartą parodyta, jog stanolio mišinys su žymiu kampestanolio kiekiu (virš 10%, o geriau - apie
20 30%) - yra mažiausiai tokio pat efektyvumo, kaip stanolio mišiniai, turintys aukštas sitostanolio koncentracijas. Be to, šių tyrimų rezultatai aiškiai rodo, jog kampestanolis, priešingai negu skelbė Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of
25 intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831], faktiškai yra neabsorbuojamas.

Klinikiniai tyrimai

30

Norint ištirti augalinio aliejaus stanolio esterio ir talo alyvos stanolio esterio margarinų hipocholesteroleminius efektus buvo paskirtas 5 savaites trunkantis sudvigubintas aklas kryžminis-persidengiantis
35 tyrimas su 2 savaitių išplovimo periodu. Tyrimo testo planas buvo toks:

Numeriai 1-6 žymi kraujo pavyzdžius, surinktus esant namų dietai (1,2), po pirmo intervencijos periodo (3,4) ir po antro intervencijos periodo (5,6). AS=margarinas augalinio aliejaus stanolio esterio pagrindu, TS=margarinas talo alyvos stanolio esterio pagrindu.

10

Grupè 2. (n=12)

15

-----1-----2-----3-----4-----5-----6

TS

TS

20	Namų dieta	Intervencijos periodas 5 sav.	Išplovimo periodas 2 sav.	Intervencijos periodas 5 sav.
----	------------	-------------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------

24 savanoriai, sveikos normaliai gyvenančios moterys, turinčios nežymiai padidintą cholesterolio koncentraciją (vidurkis $6,12 \pm 0,16$ mmol), per dieną be griežto reglamento kartu su maistu suvartodavo apie 25 g (250 g indelis/10 dienų) bandomųjų margarinų. Buvo matuojamas serumo lipidų kiekis (bendras cholesterolis, LDL-cholesterolis, HDL-cholesterolis ir trigliceridai) namų dietos metu ir kiekvieno bandymo periodo pabaigoje. Kraujo pavyzdžiai buvo imami du kartus, vieną savaitę prieš namų dietą ir kiekvieno margarino bandymo periodo pabaigoje. Gautos serumo lipidų reikšmės pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Lipidų koncentracijos serume (mmol/l, reikšmė
 ± vidutinis nukrypimas) namų dietos metu ir po 5 savaičių
 augalinio aliejaus stanolio esterio margarino (AS) ir
 talo alyvos stanolio esterio margarino (TS) vartojimo,
 5 (n=24).

	Namų dieta	AS	TS
Bendras	6,12±0,16	5,77±0,18*	5,95±0,23
cholesterolis			
LDL-	4,03±0,15	3,60±0,17*	3,76±0,19*
cholesterolis			
HDL-	1,54±0,09	1,62±0,09*	1,63±0,10*
cholesterolis			
Trigliceridai	1,22±0,13	1,20±0,11	1,26±0,15

*p<0,05 ar mažiau

Abu testuoti margarinais sąlygojo teigiamus pokyčius
 10 serumo lipidų koncentracijose. LDL-cholesterolio reikšmių
 sumažėjimas ir HDL-cholesterolio reikšmių padidėjimas
 buvo statistiškai patikimas (p<0,05 ar mažiau). Dar
 daugiau, sterolio esteris augalinio aliejaus pagrindu
 taip pat sąlygojo statistiškai patikimą bendro
 15 cholesterolio sumažėjimą. Gautas bendro cholesterolio ir
 LDL-cholesterolio sumažėjimas buvo žymesnis, naudojant
 margarina augalinio aliejaus stanolio pagrindu, palyginus
 su margarinu talo alyvos stanolio esterio pagrindu.
 Trigliceridų koncentracijose pokyčių nebuvo pastebėta.
 20 Gauti serumo lipidų rezultatai rodo, jog augalinio
 aliejaus stanolio esterio margarinas, turintis žymų kiekį
 kampestanolio jo stanolio frakcijoje, gali būti netgi
 efektyvesnis už talo alyvos stanolio esterio margarina.
 Talo alyvos stanolio esterio margarinas ankstesniuose
 25 tyrimuose [Gylling H, Miettinen TA. Serum cholesterol and
 cholesterol and lipoprotein metabolism in
 hypercholesterolemic NIDDM patients before and during
 sitostanol ester-margarine treatment. Diabetologia 1994;

37: 773-780; Gylling H, Siimes MA, Miettinen TA. Sitostanol ester margarine in dietary threatment of children with familial hypercholesterolemia. J Lipid Res 1995; 36: 1807-1912; Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. New Engl J Med 1995; 333: 1308-1312.] rodė efektyvius hipcholesteroleminius poveikius. Tokiu būdu, remiantis kryžminių persidengiančiu šio tyrimo planu, galima padaryti išvadą, jog stanoliai augalinio aliejaus pagrindu rodė mažiausiai tokius hipcholesteroleminius efektus kaip ir stanoliai talo alyvos pagrindu.

Kiekybiškai sterolio koncentracijos serume, sutinkamai su anksčiau publikuotu metodu [Miettinen TA, Koivisto P. Non-cholesterol sterols and bile acid production in hypercholesterolaemic patients with ileal bypass. In: Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W (Eds.). Bile acid and concentration in health and disease. MTP Press, Boston 1983: 183-187]; ši nuoroda yra neatskirama aprašymo dalis), buvo įvertinamos dujų-skysčių chromatografijos pagalba.

2 lentelė. Augalinių sterolių koncentracijos serume (vidurkis $\pm$ vidutinis nukrypimas, $\mu\text{g/dl}$), esant namų dietai ir po kiekvieno intervencijos periodo ($n=24$). AS=margarinas augalinio aliejaus stanolio esterio pagrindu, TS=margarinas talo alyvos stanolio esterio pagrindu.

30

	Namų dieta	AS	VS
Kampestanolis	47 $\pm$ 2	58 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3
Sitostanolis	94 $\pm$ 3	92 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5
Kampesterolis	472 $\pm$ 37	337 $\pm$ 25	350 $\pm$ 28
Sitosterolis	277 $\pm$ 17	198 $\pm$ 12	227 $\pm$ 15

* $p<0,05$ ar mažiau

Buvo apskaičiuotos dviejų serumo lipidų matavimų reikšmės, imant kraujo pavyzdžius atitinkamu periodu. Augalinių sterolių koncentracijų serume reikšmių vidurkiai, esant namų dietai ir po kiekvieno bandomojo
5 laikotarpio bei šių koncentracijų pastebėtų pokyčių vidurkiai pateikiami 2 ir 3 lentelėse.

3 lentelė. Augalinių sterolių koncentracijų ($\mu\text{g/dl}$), (n=24) serume pokyčių vidurkiai ($\pm\text{SE}$). AS=margarinas
10 augalinio aliejaus stanolio esterio pagrindu, TS=margarinas talo alyvos stanolio esterio pagrindu, ND=namų dieta.

	$\Delta(\text{AS}-\text{ND})$	$\Delta(\text{TS}-\text{ND})$	$\Delta(\text{AS}-\text{TS})$
Kampestanolis	11 $\pm$ 2*	0 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2*
Sitostanolis	-2 $\pm$ 3	2 $\pm$ 4	-4 $\pm$ 4
Kampesterolis	-134 $\pm$ 19*	-122 $\pm$ 21*	-12 $\pm$ 13
Sitosterolis	-80 $\pm$ 11*	-51 $\pm$ 12*	-29 $\pm$ 8*

*p<0,05 ar mažiau

15

Abu testuoti margarainai žymiai sumažino kampesterolio ir sitosterolio lygius serume. Yra žinoma, jog kampesterolio koncentracija serume atspindi cholesterolio absorbciją žmogaus žarnyne [Miettinen TA, Koivisto P. Non-
20 cholesterol sterols and bile acid production in hypercholesterolaemic patients with ileal bypass. In: Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W (Eds.). Bile acid and concentration in health and disease. MTP Press, Boston 1983: 183-187; Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant
25 sterols and their relation to cholesterol absorption. Am J Clin Nutr 1986; 43: 92-97]. Tokiu būdu, kuo mažesnė kampesterolio reikšmė, tuo mažesnė procentinė cholesterolio dalis yra absorbuojama žarnyne.

- Žymūs kampesterolio koncentracijų serume sumažėjimai (25-28%) tyrimų metu rodo, jog abiejų stanolių esterių margarinai mažina cholesterolio absorbciją žarnyne. Be to, nesimato jokių sitostanolio koncentracijos serume pokyčių skirtumų, kai tuo tarpu kampestanolio koncentracijos serume vidurkis po augalinio aliejaus stanolio esterio periodo buvo žymiai aukštesnis, negu po namų dietos ir po talo alyvos stanolio esterio periodų. Nežiūrint to, absoliuti kampestanolio koncentracija sudarė tikrai apie 63% sitostanolio, tai gali būti traktuojama kaip faktiškai neabsorbuojama koncentracija. Ši žema kampestanolio koncentracija serume aiškiai rodo, jog kampestanolio absorbcija yra labai ribota, kas prieštarauja Heinemann ir kt. [Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur J Clin Invest 1993; 23: 827-831] rezultatams. Kadangi į stanolio mišinius, turinčius aukštas sitostanolio koncentracijas, žiūrima kaip į saugius žmogui, tai stanolio mišinius, turinčius žymius kampestanolio kiekius, taip pat reikėtų traktuoti kaip saugius, remiantis tuo faktu, jog kampestanolis, kaip ir sitostanolis, faktiškai neabsorbuojami.
- Stanolio esterio kompozicijos gavimas ir aukščiau pateiktuose klinikiniuose tyrimuose naudoti margarinai toliau yra detalizuoti sekančiuose šio išradimo pavyzdžiuose:
- 1 pavyzdys: Sterolio mišinių hidrinimas
- Komeraciškai prieinamas sterolių mišinys, gaunamas iš augalinio aliejaus distiliato (sudėtis: 2,7% brassikasterolio, 26,7% kampesterolio, 18,4% stigmasterolio, 49,1% sitosterolio ir 2,9% sitostanolio), hidrinamas bandyminiame reaktoriuje (25 l). Į reaktorių sudedama 26 g pluoštinio Pd katalizatoriaus (Smop-20; Pd-

kiekis 10% masės, Smoptech, Turku, Suomija), 26 g distiliuoto vandens katalizatoriaus aktyvinimui ir 11,7 kg propanolio. Reaktorius prapučiamas azotu, o katalizatorius 30 min. aktyvuojamas vandenilio atmosferoje, esant 1 baro (10^5 N/m²) slėgiui ir 65°C temperatūrai. Po aktyvavimo mišinys atšaldomas iki 40°C ir pridedama 1,3 kg sterolių mišinio.

Propanolio-sterolių mišinys azoto atmosferoje pakaitinamas iki 65°C, po to azotas pakeičiamas vandeniliu. Pilnai prapūtus vandeniliu, hidrinimo reakcija atliekama 1 baro (10^5 N/m²) slėgio vandenilio atmosferoje. Įprasta reakcijos tėkmė yra apie 120 min. Konversiją galima lengvai kontroliuoti, imant pavyzdžius, kurie analizuojami didelio slėgio skysčių chromatografijos pagalba.

Vandenilio dujų slėgis nuimamas ir reaktorius prapučiamas azotu. Azoto slėgio pagalba pluoštinis katalizatorius nufiltruojamas. Propanolio-sterolinių mišinys paliekamas per naktį kristalintis 10°C temperatūroje, po to sterolio kristalai vakuume nufiltruojami ir gauta masė praplaunama 0,5 kg atšaldyto propanolio. Gautas sterolių mišinys džiovinamas vakuuminėje džiovykloje 60°C temperatūroje. Reakcijos išeiga - 75%, o gauto sterolių mišinio sudėtis kapiliarinės dujinės chromatografinės analizės duomenimis yra: 0,2% kampesterolio, 28,9% kampestanolio, 0,1% stigmasterolio, 0,2% sitosterolio, 70,1% sitostanolio. Reikia pažymėti, jog hidrinamas brassikasterolis pavirsta 24β-metilcholestanoliu, kampestanolio epimeru, bet kadangi jis aptinkamas toje pačioje smailėje, kaip ir kampestanolis, pagal chiralumą, naudojant įprastines kapiliarinės dujinės chromatografijos procedūras, jo atskirti neįmanoma, ir jis paprastai apskaičiuojamas kaip kampestanolis. Remiantis pradiniu sterolių mišiniu, 24β-metilcholestanolio turi būti 2,7%.

2 pavyzdys: Stanolio riebalų rūgščių esterių gavimas

Stanolio riebalų rūgščių esterių mišinys gaunamas bandyminiame reaktoriuje. 6 kg stanolių, gautų apjungiant keletą partijų, pagamintų naudojant 1 pavyzdyje aprašytą hidrinimo procedūrą, per naktį džiovinama 60°C ir esterinama su 8,6 kg rapsų aliejaus žemesniosios eruko rūgšties metilo esterio mišinio. Naudotų stanolių mišinių sterolių sudėtis buvo: 0,4% kampesterolio, 29,7% kampestanolio (+ 24β-metilcholestanolio), 0,1% stigmasterolio ir 68,0% sitostanolio. Stanolio kiekis mišinyje buvo 98,2%. Esterinimas atliekamas tokiu būdu:

Stanolių mišinys ir rapsų aliejaus žemesniosios eruko riebalų rūgšties metilo esteris reaktoriuje kaitinamas 90-120°C temperatūroje ir 5-15 mmHg vakuume. Po 1 val. džiovinimo pridedama 21 g Na-etilato ir reakcija tęsiama apie 2 val. Katalizatorius suardomas 90°C temperatūroje, pridedant 30% vandens (pagal masę). Atskyrus fazes, vandeninė fazė pašalinama ir perplaunama antrą kartą. Atskyrus vandeninę fazę, aliejinė fazė džiovinama vakuume 95°C temperatūroje maišant (200 aps./min.). Stanolio riebalų rūgščių mišinys lengvai balinamas 20 min. 110°C temperatūroje, esant 30 mmHg slėgiui ir 200 aps./min. maišymui, naudojant 1% balinančios žemės (Tonsil Optimum FF, Sudchemie, Vokietija). Balinanti žemė nufiltruojama, o gautas riebalų rūgščių metilo esterių ir stanolio riebalų rūgščių esterių mišinys gali būti kaip toksai sudedamas, pvz., į riebalų mišinius, prieš juos dezodoruojant, arba metilo esterių perteklius gali būti nudistiliuojamas vakuume. Atitinkamai, mišinys gali būti dezodoruojamas tikslu gauti beskonį stanolio riebalų rūgščių esterių mišinį, kuris gali būti pridedamas kaip toksai į produktus įvairiuose maisto gamybos etapuose.

Konversija esterinio proceso metu, matuojant greitu didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, paprastai būna >99%, išeiga - apie 95%.

5 3 pavyzdys: Margarino, skirto klinikiniam tyrimams, gavimas

80% margarinų, turinčių talo alyvos stanolio riebalų rūgščių esterių ir augalinio aliejaus stanolio riebalų rūgščių esterių, buvo gaminama Gerstenberg & Agger 3x57 bandyminiame įrenginyje. Talo alyvos stanolio riebalų rūgščių esteriai gauti iš Benecol® įprastos gamybos margarino (Raisio Margarini, Suomija). Buvo naudojamas paprastas trans riebalų rūgščių laisvųjų riebalų mišinys (sudėtis: 30% nehidrintų tarpusavyje esterintų augalinių riebalų ir 70% skystos LEAR alyvos), į kurią buvo pridedama stanolio riebalų rūgščių mišinių. Galutiniame produkte stanolio kiekis turėjo būti 12g/100g produkto, kas užtikrintų 3 g stanolių įsisavinimą, esant suvartojimui - 25 g/dienai. Produktai buvo ruošiami pagal tokį receptą:

	Riebalų mišinys, įskaitant stanolio riebalų rūgščių esterius	80%
25	Vanduo	19%
	Druska	0,5%
	Emulsiklis, Dimodan BP	
	Natrio bikarbonatas ir citrinos rūgštis (pH reguliuojančios medžiagos)	
30	β-karotinas (dažanti medžiaga)	
	Aromatai.	

Gauti margarinai buvo fasuojami į 250 g polipropileno indelius, užantspaudojamus aliuminio folija. Produkto skonis ir struktūra nesiskyrė nuo komercinių margarinų.

Talo alyvos stanolio margarine stanolio koncentracija sudarė 12,7g/100g produkto, o margarine augalinio aliejaus stanolio pagrindu - 12,6g/100g produkto. Šių dviejų produktų sterolių procentinė sudėtis buvo:

5

	Margarinas talo alyvos stanolio pagrindu	Margarinas augalinio aliejaus stanolio pagrindu
Brassikasterolis	0,3%	0,4%
Kampesterolis	2,2%	2,4%
Kampestanolis	7,5%	27,6%
Sitosterolis	7,4%	4,2%
Sitostanolis	82,5%	63,8%
Kiti	0,1%	1,6%

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Augalinių stanolių kompozicija, skirta cholesterolio koncentracijos serume sumažinamui ir turinti sitostanolio, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje dar turi bent 10% kampestanolio, su sąlyga, kad tai nėra kompozicija, turinti 31% kampestanolio ir 69% sitostanolio.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi nuo 20% iki 40%, optimaliai nuo 25% iki 35% kampestanolio.
3. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi nuo 50% iki 80% sitostanolio.
4. Augalinių stanolių riebalų rūgščių esterių kompozicija, skirta naudoti kaip cholesterolio koncentraciją serume mažinanti medžiaga, turinti sitostanolio riebalų rūgščių esterio, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje kompozicija dar turi bent 10% kampestanolio riebalų rūgščių esterio.
5. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi nuo 20% iki 40%, optimaliai nuo 25% iki 35%, pavyzdžiui, 30%, kampestanolio riebalų rūgščių esterio.
6. Kompozicija pagal 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi nuo 50% iki 80% sitostanolio riebalų rūgščių esterio.
7. Kompozicijos pagal bet kurį iš 1-6 punktų panaudojimas tokios, kokia yra, arba kaip maisto raciono dalies, pavyzdžiui, riebalų turinčiuose maisto produktuose, skirtuose cholesterolio koncentracijos serume sumažinimui.
8. Maistinė medžiaga, efektyvi mažinant cholesterolio koncentracijas serume, savo sudėtyje turinti augalinio stanolio kompoziciją, turinčią sitostanolio arba jo riebalų rūgščių esterio, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kompozicija dar turi žymų kiekį kampestanolio arba

jo riebalų rūgščių esterio tokiu santykiu, kad kampestanolio arba jo riebalų rūgščių esterio masės santykis su sitostanolio arba jo riebalų rūgščių esteriu yra nuo 1:9 iki 4:6, su sąlyga, jog stanolio kompozicija nesusideda iš laisvųjų stanolių ir tai nėra kompozicija, turinti 31% kampestanolio ir 69% sitostanolio.

9. Maistinė medžiaga pagal 8 punktą, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad minėtas masės santykis yra nuo 2:8 iki 3,5:6,5.

10. Fitostanolių mišinio, savo sudėtyje be sitosterolio turinčio žymų kiekį kampesterolio, panaudojimas kaip žaliavos kompozicijos arba maistinės medžiagos pagal bet kurią iš punktų 1-6,8 ir 9, mažinančios cholesterolio koncentraciją serume, gamybai.

15

20

25

30

35