



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **333298**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07C 51/353 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20051989	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.09.24 PCT/IB2003/04897
(22)	Inng.dag	2005.04.22	(85)	Videreføringsdag	2005.04.22
(24)	Løpedag	2003.09.24	(30)	Prioritet	2002.09.24, US, 253216
(41)	Alm.tilgj	2005.04.22			
(45)	Meddelt	2013.04.29			
(73)	Innehaver	Aker Biomarine ASA, Strandveien 15, 1366 LYSAKER, Norge			
(72)	Oppfinner	Asgeir Sæbo, Davane, 6037 EIDSNES, Norge			
		Per Christian Sæbo, Plassevegen 20, 6100 VOLD, Norge			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Konjugerte linolsyreblandinger			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0950410 A1 US 20020098274 A1 NAGAO, T. et al. Fractionation and Enrichment of CLA Isomers by Selective Esterification with Candida rugosa Lipase. JAOCS, 79, s. 303-308 (mars 2002)			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår fremstilling av konjugert linolsyre, og spesielt diett-tilskudd, fôr og næringsmiddelprodukter som inneholder konjugert linolsyre. Det beskrives fremgangsmåter for fremstilling av konjugert linolsyre med høy renhet og høyt syretall. Ved disse fremgangsmåter anvendes alkoholatkatalysatorer og estere av solsikkeolje, safflorolje eller maisolje som kilde for linolsyre. Esterne av konjugert linolsyre fremstilt ved fremgangsmåten kan anvendes i dyrefôr og i næringsmiddelprodukter som er egnet for humant konsum. Videre kan esterne bli omdannet til frie fettsyrer eller inkorporert i triglyserider.

OMRÅDE FOR OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av konjugert linolsyre, og spesielt fôr- og næringsmiddelprodukter som inneholder konjugert linolsyre.

5 BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

I 1978 påviste forskere ved universitetet i Wisconsin et stoff i tilberedt storfekjøtt som syntes å inhibere mutagenese. Stoffet ble funnet å være en blanding av posisjons-isomerer av linolsyre (C18:2) som hadde konjugerte dobbeltbindinger. Isomerene c9,t11 og t10,c12 var til stede i størst mengde, men det var usikkert hvilke isomerer som var ansvarlige
10 for den observerte biologiske aktivitet. Studier med opptak av merkede forbindelser viste at 9,11-isomerer syntes å være noe foretrukket ved opptak og innlemmelse i fosfolipid-fraksjonen i dyrevev, og i mindre grad 10,12-isomerer. (Se Ha, et al., Cancer Res., 50: 1097, 1990).

Den biologiske aktivitet forbundet med konjugerte linolsyrer (kalt CLA) er mang-
15 foldig og kompleks. For tiden er svært lite kjent angående virkningsmekanismene, selv om flere pågående prekliniske og kliniske undersøkelser sannsynligvis vil kaste nytt lys over den fysiologiske og biokjemiske virkningsmåter. De antikarsinogene egenskaper hos CLA er blitt godt dokumentert. Administrasjon av CLA inhiberer tumorgenese hos hunnrotter, som demonstrert av Birt et al., Cancer Res., 52:2035s (1992). Ha. et al., Cancer Res., 50: 1097
20 (1990), rapporterte tilsvarende resultater i formage hos mus med en neoplasimodell. CLA er også blitt identifisert som et sterkt cytotoxisk middel målrettet mot human melanom, tykktarms- og brystcancerceller in vitro. En nylig stor oversiktsartikkel bekrefter konklusjonene trukket på grunnlag av de individuelle studier (Ip, Am, J. Clin. Nutr., 66 (6 Supp): 1523s, 1997).

Selv om mekanismene ved CLA-virkningen fortsatt er uklare, så er det bevis på at
25 en eller flere komponenter i immunsystemet kan være involvert, i det minste in vivo. I US patentskrift nr. 5585400 (Cook et al.), innlemmet her gjennom henvisning, beskrives en fremgangsmåte for å dempe allergiske reaksjoner formidlet av type I- eller TgE-hypersensitivitet hos dyr ved å administrere en diett som inneholder CLA. CLA i konsentrasjoner
30 fra 0,1 til 1,0 % ble også vist å være et effektivt adjuvans for bevaring av hvite blodceller. I US patentskrift nr. 5.674.901 (Cook et al.), innlemmet her gjennom henvisning, beskrives at oral eller parenteral administrasjon av CLA i form av en enten fri syre eller salt resulterte i en forhøyning i CD-4- og CD-8-lymfocyt-subpopulasjoner i sammenheng med celleformidlet immunitet. Uheldige virkninger som skyldes forbehandling med eksogen tumornekrose-
35 faktor kunne mildnes indirekte ved å forhøye eller beholde nivåene av CD-4- og CD-8-celler i dyr som var gitt CLA. Til slutt beskrives i US patentskrift nr. 5.430.066, innlemmet her gjennom henvisning, virkningen av CLA når det gjelder å hindre vekttap og anoreksi ved immunstimulering.

Bortsett fra mulige terapeutiske og farmakologiske anvendelser av CLA, som angitt over, har det vært mye oppstyr angående anvendelse av CLA ernæringsmessig og som et diett supplement. Det er funnet at CLA har en dyp generalisert virkning på kroppens sammensetning, spesielt omdirigering av fordelingen av fett og mager vevsmasse. I US patentskrift nr. 5.554.646 (Cook et al.), innlemmet her gjennom henvisning, beskrives en fremgangsmåte hvor CLA benyttes som et diett supplement ved at griser, mus og mennesker ble gitt en diett som inneholdt 0,5 % CLA. Hos hver art ble det observert et signifikant fall i fettinnholdet med en samtidig økning av proteinmassen. Det er interessant at hos disse dyr resulterte ikke økningen i fettsyreinnhold i dietten gjennom tilsetning av CLA, i noen økning av kroppsvekten, men var forbundet med en omfordeling av fett og mager masse i kroppen. Et annet diettfenomen av interesse er virkningen av CLA-tilskudd på stoffskiftet. I US patentskrift nr. 5.428.072 (Cook et al.), innlemmet her gjennom henvisning, presenteres data som viser at innlemmelse av CLA i dyrefôr (fugler og pattedyr) økte effektiviteten ved foromsetningen og ledet til større vektøkning hos dyr som hadde fått CLA-tilskudd. De potensielt gunstige virkninger av CLA-tilskudd er åpenbare for produsenter av dyrefôr.

En annen viktig årsak til interessen for CLA, og som understreker det tidlige kommersielle potensialet, er at det forekommer naturlig i næringsmidler og fôr som fortæres både av mennesker og dyr. Spesielt er CLA rikelig til stede i produkter fra drøvtyggere. For eksempel er det blitt gjennomført flere studier hvor CLA er blitt kartlagt i forskjellige meieriprodukter. Aneja et al., Dairy Sci., 43:231, 1990, observerte at bearbeiding av melk til yoghurt resulterte i en konsentrasjon av CLA. Shanta, et al., Food Chem., 47:257, 1993, viste at en kombinasjon av økning i bearbeidingstemperatur og tilsetning av myse økte CLA-konsentrasjonen under fremstilling av smelteost. I en separat undersøkelse rapporterte Shanta et al., J. Food Sci., 60:695 (1995) at selv om bearbeidings- og lagringsbetingelser ikke reduserte CLA-konsentrasjonene vesentlig, så ble det ikke observert noen økninger. Faktisk har mange undersøkelser vist at sesongmessige variasjoner, eller variasjoner fra dyr til dyr, kan tilskrives så mye som en trefoldig forskjell i CLA-innholdet i kumelk (se f.eks. Parodi et al., J. Dairy Sci., 60:1550, 1977). Også diettfaktorer er blitt trukket inn i variasjonen i CLA-innhold, som angitt av Chin et al., J Food Camp. Anal. 5: 185, 1992. På grunn av denne variasjon i CLA-innhold i naturlige kilder, vil fortæring av foreskrevne mengder av forskjellige næringsmidler ikke garantere at individet eller dyret vil få optimale doser for å sikre at det oppnås en ønsket ernæringsmessig virkning.

Linolsyre er en viktig komponent i biolipider og utgjør en signifikant andel av triglyserider og fosfolipider. Linolsyre er kjent som en "essensiell" fettsyre, hvilket betyr at dyret må skaffe seg den fra eksterne næringskilder siden den ikke kan bli autosyntetisert. Innlemmelse av CLA-formen av linolsyre kan resultere i en direkte substitusjon av CLA i lipidposisjoner hvor ukonjugert linolsyre ville ha migrert. Imidlertid er dette ikke blitt bevist, og noen av de svært gunstige men uforklarte virkninger som er blitt observert, kan til og med resultere i en reposisjonering av CLA i lipidarkitekturen på steder hvor ukonjugert linolsyre

ellers ikke ville ha migrert. Det er nå klart at én kilde for animalsk CLA, særlig i meieri-produkter, kommer fra den biokjemiske virkning av visse vombakterier på naturlig linolsyre, først isomerisering av linolsyren til CLA, og deretter sekretering av den i vommen. Kepler et al., J. Nutrition, 56:1191, 1966, isolerte en vom-bakterie, *Butyrivibrio fibrisolvens*, som

5 katalyserer dannelsen av 9,11-CLA som et mellomprodukt ved biohydrogeneringen av linolsyre. Videre fant Chin, et al., J. Nutrition, 124:694, 1994, at CLA funnet i vevet hos gnagere var assosiert med bakterier, siden tilsvarende mikrobefrie rotter ikke produserte noe CLA.

I utviklingen av en definert kommersiell CLA-kilde for både terapeutisk og ernæringsmessig anvendelse, er det nødvendig med en prosess som gir store mengder

10 definert materiale. Problemet med de fleste CLA-produkter fremstilt ved konvensjonelle tiltak, er heterogeniteten og den vesentlige variasjon i isoform fra sats til sats. Det har vært gitt stor oppmerksomhet til det faktum at fortæring av store mengder hydrogenert olje og fett, i stedet for dyretalg, har resultert i en diett med et høyt innhold av trans-fettsyrer. For eksempel viste Holman et al., PNAS, 88:4830, 1991, at hos rotter føret med hydrogenerte

15 oljer, forekom en akkumulering i rotteleveren av uvanlige polyumettede fettsyreisomerer som viste seg å interferere med den normale metabolisme av naturlig forekommende polyumettede fettsyrer. Disse bekymringer er blitt oppsummert i en tidlig redaksjonell artikkel i Am. J. Public Health, 84:722 (1974). Det eksisterer derfor et sterkt behov for et biologisk aktivt CLA-produkt med definert sammensetning.

20 SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av konjugert linolsyre som angitt i krav 1, og spesielt fôr- og næringsmiddelprodukter som inneholder konjugert linolsyre. Med noen utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes fremgangsmåter for

25 fremstilling av konjugert linolsyre med et høyt syretall, omfattende: a) det tilveiebringes: i) en blanding omfattende linolsyreestere og ii) en alkoholatkatalysator, b) blandingen omfattende linolsyreestere behandles med alkoholatkatalysatoren slik at det dannes en blanding med konjugerte linolsyreestere, c) blandingen med konjugerte linolsyreestere behandles med alkali slik at det dannes en blanding med forsåpede konjugerte linolsyrer, og

30 d) blandingen med forsåpede konjugerte linolsyrer behandles med en vaskeløsning med svak syre slik at det dannes en blanding med frie, konjugerte fettsyrer. I noen utførelsesformer har blandingen med frie konjugerte linolsyrer et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen med frie, konjugerte linolsyrer et syretall fra ca. 190 til 210. I andre utførelsesformer har vaskeløsningen med svak syre en pH fra ca. 5 til 7. I ytterligere

35 utførelsesformer omfatter trinn (d) også flere vaskinger med svak syre. I noen utførelsesformer utføres vaskingen med svak syre med en sitronsyreløsning. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen bestemt utgangsolje. Faktisk kan blandingen som omfatter linolsyreestere være fremstilt av en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til anvendelse av

noen bestemt alkoholatkatalysator. Faktisk kan alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og kaliumetylat. I ytterligere andre utførelsesformer er alkoholen etanol.

I eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes en blanding med konjugert linolsyre, fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i avsnittet ovenfor. I noen utførelsesformer har blandingen et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen et syretall fra ca. 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer er blandingen hovedsakelig fri for estere av konjugert linolsyre. I ytterligere utførelsesformer omfatter blandingen mindre enn 1,0 mol% trans-trans-fettsyreisomerer. Med noen utførelsesformer tilveiebringes næringsmiddelprodukter eller kapsler som omfatter blandingene med konjugert linolsyre.

Med eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for fremstilling av konjugert linolsyre med et høyt syretall, omfattende: a) det tilveiebringes: i) en blanding omfattende linolsyreestere og ii) en alkoholatkatalysator, b) blandingen omfattende linolsyreestere behandles med alkoholatkatalysatoren slik at det dannes en blanding med konjugerte linolsyreestere, c) blandingen med konjugerte linolsyreestere behandles med alkali under slike betingelser at det dannes en blanding med forsåpet, konjugert linolsyre omfattende gjenværende alkohol, e) en løsning med sterk syre injiseres i blandingen med forsåpet, konjugert linolsyre under slike betingelser at det dannes en oljefase omfattende frie, konjugerte fettsyrer og en vannfase, og e) oljefasen og vannfasen skilles umiddelbart under slike betingelser at re-forestring mellom gjenværende alkohol og konjugerte fettsyrer blir i det vesentlige forhindret. I noen utførelsesformer har blandingen med frie, konjugerte linolsyrer et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen med frie, konjugerte linolsyrer et syretall fra ca. 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer har vaskeløsningen med svak syre en pH fra ca. 5 til 7. I noen utførelsesformer utføres separasjonen i trinn (e) med sentrifugeseparasjon. I ytterligere utførelsesformer har oppløsningen med sterk syre en pH fra ca. 2 til 3. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen bestemt utgangsolje. Faktisk kan blandingen omfattende linolsyreestere være fremstilt av en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til anvendelse av noen bestemt alkoholatkatalysator. Faktisk kan alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og kaliumetylat.

I eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes en blanding med konjugert linolsyre fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i avsnittet ovenfor. I noen utførelsesformer har blandingen et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen et syretall fra ca. 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer er blandingen hovedsakelig fri for estere av konjugert linolsyre. I ytterligere utførelsesformer omfatter blandingen mindre enn 1,0 mol% trans-trans-fettsyreisomerer. Med noen utførelsesformer tilveiebringes næringsmiddelprodukter eller kapsler som omfatter blandingene med konjugert linolsyre.

Med eksempelvisse utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for å spalte
 forsåpede, konjugerte linolsyrer, omfattende: a) det tilveiebringes: i) en blanding omfattende
 forsåpet, konjugert linolsyre, ii) en oppløsning med svak syre, og b) blandingen omfattende
 forsåpet, konjugert linolsyre vaskes med oppløsningen med svak syre slik at det dannes en
 5 blanding som omfatter fri, konjugert linolsyre. I noen utførelsesformer omfatter
 fremgangsmåtene også trinn c) hvor trinn (b) gjentas minst én gang for å fremstille en
 blanding med frie, konjugerte fettsyrer. I noen utførelsesformer har blandingen med fri,
 konjugert linolsyre et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen med fri,
 konjugert linolsyre et syretall fra ca. 190 til 210. I noen utførelsesformer har vaskeløsningen
 10 med svak syre en pH fra ca. 5 til 7. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen
 bestemt utgangsolje. Faktisk kan blandingen omfattende estere av linolsyre være fremstilt av
 en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje. Den foreliggende oppfinnelse er ikke
 begrenset til anvendelse av noen bestemt alkoholatkatalysator. Faktisk kan
 alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og
 15 kaliumetylat.

I eksempelvisse utførelsesformer tilveiebringes en blanding med konjugert linolsyre
 fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i avsnittet ovenfor. I noen utførelsesformer har
 blandingen et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen et syretall fra ca.
 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer er blandingen hovedsakelig fri for estere av
 20 konjugert linolsyre. I ytterligere utførelsesformer omfatter blandingen mindre enn 1,0 mol%
 trans-trans-fettsyreisomerer. Med noen utførelsesformer tilveiebringes
 næringsmiddelprodukter eller kapsler som omfatter blandingene med konjugert linolsyre.

Med ytterligere andre eksempelvisse utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter
 for å spalte forsåpede, konjugerte linolsyrer, omfattende: a) det tilveiebringes: (i) en
 25 blanding omfattende forsåpet, konjugert linolsyre og gjenværende alkohol, og ii) en løsning
 med sterk syre, b) en løsning med sterk syre injiseres i blandingen med forsåpet, konjugert
 linolsyre under slike betingelser at det dannes en oljefase omfattende frie, konjugerte
 fettsyrer og en vannfase omfattende gjenværende etanol, og c) oljefasen og vannfasen
 separeres umiddelbart under slike betingelser at re-forestring mellom gjenværende etanol og
 30 konjugerte fettsyrer blir i det vesentlige forhindret. I noen utførelsesformer har blandingen
 med fri, konjugert linolsyre et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen
 med fri, konjugert linolsyre et syretall fra ca. 190 til 210. I noen utførelsesformer har
 oppløsningen med sterk syre en pH fra ca. 2 til 3. Den foreliggende oppfinnelse er ikke
 begrenset til noen bestemt utgangsolje. Faktisk kan blandingen omfattende ester av linolsyre
 35 være fremstilt av en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje. Den foreliggende
 oppfinnelse er ikke begrenset til anvendelse av noen bestemt alkoholatkatalysator. Faktisk
 kan alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og
 kaliumetylat.

I noen eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes en blanding med konjugert linolsyre fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i avsnittet ovenfor. I noen utførelsesformer har blandingen et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen et syretall fra ca. 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer er blandingen hovedsakelig fri for estere av konjugert linolsyre. I ytterligere utførelsesformer omfatter blandingen mindre enn 1,0 mol% trans-trans-fettsyreisomerer. Med noen utførelsesformer tilveiebringes næringsmiddelprodukter eller kapsler som omfatter blandingene med konjugert linolsyre.

Med noen eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for fremstilling av konjugert linolsyre med høyt syretall, omfattende: a) det tilveiebringes: i) en blanding omfattende linolsyreestere og ii) en alkoholatkatalysator, b) blandingen omfattende linolsyreestere behandles med alkoholatkatalysatoren slik at det dannes en blanding med konjugerte linolsyreestere, c) blandingen med konjugert linolsyreester behandles med alkali slik at det dannes en blanding med forsåpete konjugerte linolsyrer og som omfatter gjenværende alkohol, d) etanolen fjernes fra blandingen med forsåpet konjugert linolsyre, og e) blandingen med forsåpet konjugert linolsyre behandles med en syreløsning slik at det dannes en blanding med fri konjugert fettsyre. I noen utførelsesformer har blandingen med fri konjugert linolsyre et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen med fri konjugert linolsyre et syretall fra ca. 190 til 210. I noen utførelsesformer har oppløsningen med sterk syre en pH fra ca. 2 til 3. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen bestemt utgangsolje. Faktisk kan blandingen omfattende ester av linolsyre være fremstilt av en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til anvendelse av noen bestemt alkoholatkatalysator. Faktisk kan alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og kaliumetylat.

I noen eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes en blanding med konjugert linolsyre fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i avsnittet ovenfor. I noen utførelsesformer har blandingen et syretall på over 190. I andre utførelsesformer har blandingen et syretall fra ca. 190 til 210. I ytterligere andre utførelsesformer er blandingen hovedsakelig fri for estere av konjugert linolsyre. I ytterligere utførelsesformer omfatter blandingen mindre enn 1,0 mol% trans-trans-fettsyreisomerer. Med noen utførelsesformer tilveiebringes næringsmiddelprodukter eller kapsler som omfatter blandingene med konjugert linolsyre.

DEFINISJONER

Som anvendt her, henviser "konjugert linolsyre" eller "CLA" til hvilken som helst konjugert linolsyre eller oktadekadien-fettsyre. Det er ment at dette begrep skal innbefatte og angi alle posisjonelle og geometriske isomerer av linolsyre med to konjugerte karbon-

5 karbon-dobbeltbindinger på hvilket som helst sted i molekylet. CLA skiller seg fra ordinær linolsyre ved at den ordinære linolsyre har dobbeltbindinger ved karbonatomer 9 og 12. Eksempler på CLA innbefatter cis- og trans-isomerer ("E/Z-isomerer") av følgende posisjonsisomerer: 2,4-oktadekandiensyre, 4,6-oktadekandiensyre, 6,8-oktadekandiensyre, 7,9-oktadekandiensyre, 8,10-oktadekandiensyre, 9,11-oktadekandiensyre og 10,12-oktadeka-

10 diensyre, 11,13-oktadekandiensyre. Som anvendt her, innbefatter "CLA" en enkeltisomer, en utvalgt blanding av to eller flere isomerer, og en ikke utvalgt blanding av isomerer, oppnådd fra naturlige kilder, samt syntetisk og semisyntetisk CLA.

Som anvendt her, henviser begrepet "isomerisert konjugert linolsyre" til CLA fremstilt ved kjemiske metoder (for eksempel vandig alkali-isomerisering, ikke-vandig

15 alkali-isomerisering eller alkali-alkoholat-isomerisering).

Som anvendt her, henviser begrepet "konjugert linolsyregruppe" til enhver forbindelse eller flere forbindelser som inneholder konjugerte linolsyrer eller linolsyre-derivater. Eksempler innbefatter, men er ikke begrenset til, fettsyrer, alkylestere og triglyserider av konjugert linolsyre.

20 Som anvendt her, er det ment at "triglyserider" eller "acylglyserider" med CLA inneholder CLA i hvilken posisjon som helst eller i alle de tre posisjoner (for eksempel posisjoner SN-1, SN-2 eller SN-3) på triglyseridryggraden. Følgelig kan et triglyserid som inneholder CLA inneholde hvilke som helst av de posisjonelle og geometriske isomerer av CLA.

25 Som anvendt her, er det ment at "estere" av CLA innbefatter hvilke som helst eller alle posisjonelle og geometriske isomerer av CLA som er bundet gjennom en esterbinding til en alkohol eller en annen kjemisk gruppe, innbefattende men ikke begrenset til, fysiologisk akseptable naturlig forekommende alkoholer (f.eks. metanol, etanol, propanol). En CLA-ester eller en forestret CLA kan derfor inneholde hvilke som helst av de posisjonelle og

30 geometriske isomerer av CLA.

Det er ment at "ikke naturlig forekommende isomerer" av CLA innbefatter, uten å være begrenset til, c11,t13; t11,c13; t11,t13; c11,c13; c8,t10; t8,c10; t8,t10; c8,c10 og trans-trans-isomerer av oktadekandiensyre, men innbefatter ikke t10, c12- og c9,t11-isomerer av oktadekandiensyre. "Ikke naturlig forekommende isomerer" kan også bli henvist til som

35 betegnet "små- isomerer" av CLA, fordi disse isomerer generelt dannes i små mengder når CLA syntetiseres ved alkaliisomerisering.

Som anvendt her, henviser "lav-forurensset" CLA til CLA-blandinger, innbefattende frie fettsyrer, alkylestere og triglyserider, som totalt inneholder mindre enn 1 % 8,10-oktadekadiensyrer, 11,13-oktadekadiensyrer og trans-trans-oktadekadiensyrer.

Som anvendt her, menes med "c" en kjemisk binding med cis-orientering og "t" henviser til en kjemisk binding med trans-orientering. Dersom en posisjonsisomer av CLA er angitt uten "c" eller "t", innbefatter angivelsen alle de fire mulige isomerer. For eksempel innbefatter 10,12-oktadekadiensyre både c10,t12-, t10,c12-, t10,t12- og c10,c12-oktadeka-

5 diensyre, mens t10,c12-oktadekadiensyre eller CLA henviser til kun den ene isomeren.

Som anvendt her, henviser begrepet "olje" til en frittflytende væske som inneholder langkjedede fettsyrer (for eksempel CLA), triglyserider eller andre langkjedede hydrokarbongrupper. De langkjedede fettsyrer innbefatter, men er ikke begrenset til, de forskjellige CLA-isomerer.

10 Som anvendt her, henviser begrepet "fysiologisk akseptabel bærer" til enhver bærer eller eksipient som vanligvis anvendes for oljeaktige farmasøytika. Slike bærere eller eksipienter innbefatter, men er ikke begrenset til, oljer, stivelse, sukrose og laktose.

Som anvendt her, henviser begrepet "oral avleverende bærer" til enhver innretning for avlevering av et farmasøytika oralt, innbefattende, men ikke begrenset til, kapsler, piller,

15 tabletter og siruper.

Som anvendt her, henviser begrepet "næringsmiddelprodukt" til ethvert næringsmiddel eller fôr som er egnet for å bli konsumert av mennesker, ikke drøvtyggende dyr eller drøvtyggende dyr. "Næringsmiddelproduktet" kan være ethvert fremstilt og emballert næringsmiddel (for eksempel majones, salatdressing, brød eller ost) eller et dyrefôr (for

20 eksempel ekstrudert og granulert dyrefôr eller grovblandet fôr). "Tilberedt næringsmiddelprodukt" betyr ethvert pre-emballert næringsmiddel godkjent for humant konsum.

Som anvendt her, henviser begrepet "matvare" til ethvert stoff som er egnet for å bli konsumert av mennesker eller dyr.

Som anvendt her, henviser begrepet "flyktig organisk forbindelse" til enhver

25 karbonholdig forbindelse som eksisterer delvis eller fullstendig i gassformig tilstand ved en gitt temperatur. Flyktige organiske forbindelser kan bli dannet ved oksidasjon av en organisk forbindelse (for eksempel CLA). Flyktige organiske forbindelser innbefatter, men er ikke begrenset til, pentan, heksan, heptan, 2-butenal, etanol, 3-metylbutanal, 4-metylpentanon, heksanal, heptanal, 2-pentylfuran, oktanal.

30 Som anvendt her, henviser begrepet "metalloksidantkompleksdanner" til enhver antioksidant som danner komplekser med metaller. Eksempler innbefatter, men er ikke begrenset til, lecithin og sitronsyreestere.

Som anvendt her, henviser begrepet "alkoholatkatalysator" til alkalimetallforbindelser av enhver énverdig alkohol, innbefattende, men ikke begrenset til, kalium-

35 metylat og kaliummetylal.

NÆRMERE BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Blandingene ifølge den foreliggende oppfinnelse er et resultat av en nøye kontrollert isomeriseringsprosess og anvendelse av de foretrukne utgangsmaterialer solsikkeolje, safflorolje eller maisolje. Denne blanding har hittil ikke vært oppnådd for anvendelse i industriell skala fordi de konvensjonelle prosesser historisk har produsert konjugerte linolsyrer for helt andre formål, nemlig som tørkende oljer for malingsindustrien. Det har heller ikke vært noen forståelse for virkningene av isomerinnholdet i sluttproduktet fordi analysemetodene for å karakterisere fettsyrer ikke har vært særlig godt tilgjengelige. Videre beskrives en fremgangsmåte for å hindre oksidasjon av CLA under lagring hvorved det dannes flyktige organiske forbindelser.

I. Fremgangsmåter for konjugering av linolsyrer

I eldre isomeriseringsprosesser, hvor noen fortsatt er i bruk i mer moderne format, ble fremstillingen av konjugerte fettsyrer utført i vandig alkali (generelt NaOH) ved høye temperaturer på over 200 °C og vanligvis ved trykk under atmosfæretrykk. For eksempel beskrives i US patentskrift nr. 2.350.583 (Bradley) en vandig alkalisk prosess hvor det benyttes behandlede såper slik at både konjugering og polymerisering forekommer under temmelig strenge betingelser ved 200-250 °C i en periode på flere timer. Fraksjonene med tørkende olje, med start med linolje, ble oppnådd ved destillasjon (se også britisk patentskrift nr. 558 881 angående en svært lik prosess). Som en variant av fremgangsmåten beskrives i US patentskrift nr. 4 381 264 en prosess hvor en vannfattig reaksjonssone (0,5 % vann) inneholder en støkiometrisk mengde med base i nærvær av SO₂ for å oppnå konjugering av dobbeltbindingene i forskjellige polyumettede fettsyrer. Den vandige alkaliske prosess ble i US patentskrift nr. 4 164 505 tilpasset til en kontinuerlig prosess hvor et alkalimetall-hydroksid og vann ble ført kontinuerlig inn i en strømmingssone holdt ved mellom 200 °C og 370 °C. Ved disse temperaturer blir reaksjonstiden kraftig forkortet, men det er forholdsvis liten kontroll med isomeriseringen. For den øvre ende av temperaturområdet vil fagfolk på området kunne forutsi en nesten fullstendig omdannelse til doble trans-forbindelser.

Fremgangsmåter for fremstilling av CLA ved anvendelse av forskjellige ikke-vandige løsningsmidler og katalysatorer er blitt beskrevet i litteraturen. Burr (US patentskrift nr. 2.242.230) beskriver anvendelse av løsningsmidler som metanol, butanol, etanol og glykol i kombinasjon med forskjellige katalysatorer. Disse reaksjonsparametre er oppsummert i tabell 1. Med unntak av glykol, ble reaksjonene utført enten under reflux-betingelser eller i forseglede rør. Disse reaksjonsbetingelser resulterte i unøyaktig kontroll av to av de viktige reaksjonsparametrene, temperatur og trykk. Unøyaktig kontroll av disse reaksjonsparametre vil sannsynligvis lede til mindre enn fullstendig konjugering og dannelse av uønskede isomerer.

TABELL 1 - Patent US 2.242.230

Løsningsmiddel	Katalysator	Temperatur	Tid
Etanol	KOH, NaOH	refluks eller høyere*	varierende
Butanol	KOH, NaOH	refluks eller høyere*	varierende
Glykol	KOH	195 °C	varierende
Isoamylalkohol	KOH	refluks eller høyere*	varierende
Butanol	Tributylamin	140-175 °C	22 timer
Butanol	Kalsiumacetat	175 °C	36 timer
Butanol	Trinatriumfosfat	175 °C	36 timer
Butanol	Kaliumfosfat	175 °C	36 timer
Butanol	Natriumbenzoat	175 °C	36 timer
Butanol	Kaliumtiocyanat	175 °C	36 timer
Butanol	Boraks	175 °C	36 timer

Likeledes beskriver Baltes *et al.*, (US patentskrift nr. 3162658) anvendelse av ikke-
5 vandige løsningsmidler og forskjellige metalliske baser som katalysatorer for konjugering av
fettsyrer. De forskjellige reaksjonsparametre ved fremgangsmåtene beskrevet av Baltes *et al.*
er oppsummert i tabell 2. Baltes *et al.* beskriver også anvendelse av forskjellige lavtkokende
løsningsmidler. Siden de fleste av disse reaksjoner ble utført ved temperaturer over koke-
punktet for det benyttede løsningsmiddel, så er det åpenbart at reaksjonene ble utført under
10 trykk, hvilket er en uavhengig faktor som påvirker dannelsen av oktadekadiensyreisomerer.
Produktet fremstilt ved disse reaksjoner vil således inneholde uønskede isomerer.

TABELL 2 - Patent US 3.162.658

Løsningsmiddel	Katalysator	Temperatur	Tid
Metanol	KOH	60-140 °C	variabel
Metanol	Kaliummetylat	140 °C	variabel
Butanol	Kaliummetylat	140 °C	variabel
Etanol	Kaliummetylat	140 °C	variabel
Isopropanol	Kaliummetylat	120-140 °C	variabel
Heptan/3° Butanol	Kaliumbutyrat	refluks	variabel
3° Butanol	Cesiumbutylat	140 °C	variabel
Etylendiamin	Kaliummetylat	140-160 °C	variabel
Metanol	Natriumamid	140 °C	variabel

II. Isomerisering med alkoholatkatalysatorer

CLA ifølge den foreliggende oppfinnelse mangler signifikante mengder isomerer, så som 8,10-isomerer, 11,13-isomerer og de forskjellige trans-trans-isomerer. Disse blandinger ble fremstilt ved en omhyggelig kontrollert isomeriseringsprosess med ikke-vandig alkali, presentert i form av flytdiagram på figur 1 og ved isomerisering med alkalialkoholatkatalysatorer.

I de foretrukne utførelsesformer blir ester av linolsyre som er fremstilt av solsikkeolje, safflorolje eller maisolje, omsatt i nærvær av en alkalialkoholatkatalysator og en liten mengde av et egnet løsningsmiddel (for eksempel metanol eller etanol). I henhold til dette tilveiebringes fremgangsmåter for fremstilling av alkylestere av CLA. Etter splitting av fett og dehydrering av frøoljen, blir de frie fettsyrer kombinert med metanol eller en annen lavmolekylær énverdig alkohol og varmet til alkoholens kokepunkt. Forestringen skjer under betingelser med reflux og reaksjonsvannet fjernes ved hjelp av en kondensator. Frøoljen blir refluxert med overskudd av alkohol og med en alkalialkoholatkatalysator i 2 timer ved 65-78 °C under omrøring. Etter at laget er separert, blir bunnlaget som inneholder glyserol og overskuddsmengde alkohol dekantert. Forestringsprosessen kan så bli gjentatt med en mindre mengde alkohol og alkalialkoholatkatalysator for å oppnå en enda mer fullstendig forestring. Esteren blir så vasket med varmt vann som inneholder oppløst sitronsyre, og tørket under vakuum. I foretrukne utførelsesformer destilleres esterene før konjugering for å fjerne glyserol og hindre dannelse av trimetoksypropan. Følgelig er blandingene med konjugert linolsyre hovedsakelig fri for trimetoksypropan. Med hovedsakelig fri for trimetoksypropan, menes at sluttproduktet inneholder mindre enn 0,5 % trimetoksypropan, mer foretrukket mindre enn 0,1 % trimetoksypropan og mest foretrukket mindre enn 0,05 % trimetoksypropan.

Ved forestringen foretrekkes metanol eller etanol, selv om andre forgrenede eller rettkjedede énverdige alkoholer kan anvendes. Jo lenger alkylgruppens alifatiske kjede er, jo mer blandbart med lipider blir materialet. Også viskositeten har en tendens til å øke. For forskjellige typer fôr eller næringsmidler, hvor konsistensen varierer, kan produkter med varierende viskositet bli anvendt for å oppnå ønskede flyt- eller komponderingsegenskaper uten å påvirke de terapeutiske eller næringsmessige egenskaper som kommer fra CLA-gruppene. Teori og praksis for forestringen er konvensjonell. En grunnleggende forklaring på de mest vanlige fremgangsmåter er angitt i McCraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology. McGraw-Hill Book Co., N.Y.: 1996 (5. utg.). Hos dyr og mennesker har kroppen forskjellige esteraser slik at CLA-esteren lett spaltes og frigjør frie fettsyrer. Opptak i vev kan ha forskjellige kinetikker avhengig av det aktuelle vev og hva som søkes oppnådd.

Som beskrevet over, er det foretrukne utgangsmaterialet for konjugering med alkoholatkatalysatorer estere av linolsyre som er fremstilt av solsikkeolje, safflorolje og maisolje, eller andre oljer med et høyt innhold av linolsyre. Fortrinnsvis inneholder oljene lave nivåer med linolensyre. Konjugering av linolensyre resulterer i dannelse av flere

ukarakteriserte fettsyregrupper med ukjente biologiske egenskaper. Med tidligere konjugeringsprosesser brydde man seg ikke om ukjente forbindelser fordi produktene ble anvendt i tørkende oljer, malinger og lakk, og ikke i produkter beregnet på å bli konsumert av mennesker eller dyr. CLA produsert ved disse prosesser med oljer som inneholdt høye konsentrasjoner av linolensyre, var følgelig ikke egnet for ernæringsmessig anvendelse.

I noen utførelsesformer er det også tatt i betraktning at glyserol og glyserolestere må fjernes før fremstilling av fettsyremonoestere. Spor av glyserol som er til stede under konjugeringen, bidrar til dannelsen av trimetoksypropan og trietoksypropan. Før konjugeringen foretrekkes det derfor å destillere monoesterne som er oppnådd ved alkoholyse.

I foretrukne utførelsesformer utføres isomereringen ved å omsette linolsyreesterne med en gitt mengde av en énverdig alkohol (for eksempel metanol, etanol, propanol eller butanol) og en alkoholatkatalysator (se for eksempel US patentskrift nr. 3 162 658, innlemmet her gjennom henvisning). Typiske alkoholatkatalysatorer er natrium- eller kaliumetoksid, eller tilsvarende med metyl, butyl eller propyl (for eksempel natriummetylat, kaliummetylat, natriummetylat og kaliummetylat). I noen utførelsesformer er forholdet mellom alkoholatkatalysator og alkohol i forhold til fettsyreesterne ca. 2-5 % på vektbasis, mest foretrukket er forholdet mellom alkoholatkatalysator og alkohol i forhold til fettsyreesterne ca. 2,8 % på vektbasis. For eksempel blir 100 kg safflor-fettsyreester blandet med 2,8 kg kaliumetoksid og 2,8 kg etanol. I noen utførelsesformer blir den resulterende reaksjonsblanding omrørt i ca. 2-10 timer, mest foretrukket ca. 5 timer, ved 100 til 130 °C, mest foretrukket ved ca. 110-115 °C. I noen foretrukne utførelsesformer foregår reaksjonen i et lukket reaksjonskar under nitrogen. Ved denne isomeriseringsreaksjon dannes alkylestere av konjugert linolsyre.

I noen foretrukne utførelsesformer blir de konjugerte linolsyrealkylestere omdannet til frie fettsyrer (dvs. frie konjugerte fettsyrer). Dette utføres fortrinnsvis ved først å forsåpe de konjugerte linolsyrealkylestere slik at det dannes en såpe av konjugert linolsyre, og deretter spaltes såpen ved å tilsette en syre. I noen utførelsesformer utføres forsåpningen ved å omsette alkylestere av konjugert linolsyre med en passende base. Denne foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til anvendelse av noen bestemt base. Faktisk kan det anvendes forskjellige baser innbefattende, men ikke begrenset til, NaOH og KOH. Likeledes er den foreliggende oppfinnelse ikke begrenset til anvendelse av noen bestemt syre. Faktisk kan det anvendes forskjellige syrer innefattende, men ikke begrenset til, HCl, sitronsyre og eddiksyre.

Oppfinnerne har uventet funnet at under forsåpning og påfølgende tilsetning av syre for å danne frie fettsyrer av konjugert alkylester, så fant den motsatte reaksjon sted. Under bestemte betingelser vil gjenværende mengder med alkohol dannet ved forsåpningen av alkylestere (for eksempel metanol eller etanol) reagere med de frie fettsyrer under sure betingelser og danne estere (for eksempel etyl- eller metylestere) av CLA. Dette resulterte i et sluttprodukt med et uakseptabelt lavt syretall. Det er vel kjent for fagfolk på området at

forestring forekommer mellom frie fettsyrer og alkohol dersom det anvendes sterke syrer som katalysator. Tatt i betraktning den lave konsentrasjon av etanol, var det imidlertid ikke forventet at en forestring skulle kunne finne sted. Årsaken er sannsynligvis at tilsetning av surt vann ikke fjerner etanol fra lagene med frie fettsyrer, slik som forventet. CLA vil sannsynligvis på grunn av polariteten i dobbeltbindingsområdet oppløse etanol lettere enn andre fettsyrer.

Den foreliggende oppfinnelse tar hensyn til at tilføyelse av flere vasketrinn med svak syre ved fremgangsmåtene for fremstilling av CLA hvor det benyttes isomerisering med alkoholatkatalysatorer som beskrevet her, er særlig anvendelig ved satsvis fremstilling av CLA. Ved foretrukne utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelse unngås den uventede akkumulering av CLA-estere (for eksempel metylestere eller etylestere) under isomeriseringen med alkoholatkatalysatorer ved å foreta et antall (for eksempel 1, 2, 3 eller flere) vaskinger med svak syre, fulgt av isomeriserings- og forsåpningstrinn for å sikre at restetanol fjernes fra reaksjonsblandingen. Det er tatt hensyn til at fjerning av restmengdene med etanol forhindrer at det finner sted forestringsreaksjoner som danner etylesterderivater av CLA. Under vaskingen av det forsåpede CLA med svak syre blir pH i reaksjonsblandingen fortrinnsvis holdt på ca. 5 til 7. Egnede syrer for anvendelse i vasketrinnet med svak syre innbefatter, men er ikke begrenset til, sitronsyremonohydrat, sitronsyre og svake organiske syrer som eddiksyre.

I eksempler 2 og 3 gis eksempler på utførelsesformer relatert til vasketrinnene med svak syre beskrevet over. Spesielt beskrives i eksempel 2 problemet med dannelse av etylester ved produksjon i satsvis skala og med bestemte utførelsesformer av fremgangsmåten med isomerisering med alkoholatkatalysatorer. I eksempel 3 beskrives tilføyelse av vasketrinn med svak syre etter isomeriserings- og forsåpningstrinnene ved fremstillingsmetodene med alkoholatkatalysator ved produksjon i satsvis skala.

I noen utførelsesformer kan spaltingen av såpe skje ved en kontinuerlig prosess i stedet for en satsvis prosess. Med disse utførelsesformer blir en strøm med CLA-såpe ført fra en satsreaktor inn i et reaksjonskammer i linjen hvor det tilsettes en oppløsning med fortynnet syre (som fortrinnsvis har pH fra ca. 2 til 3). For å spalte CLA-såpen i fri fettsyre, anvendes en høyhastighetsblander. Små mengder såpe kan eventuelt medføre dannelse av emulsjon. I tillegg til at den fortynnede syre tilsettes ved høy blande-hastighet, bør derfor temperaturen fortrinnsvis holdes på ca. 80 °C til 90 °C. Fra reaksjonskammeret for tilsetning av syre blir en strøm som inneholder olje- og vannfasene ført umiddelbart (for eksempel innen mindre enn ca. 20 sekunder etter tilsetningen) inn i en sentrifugeseparator hvor olje og vann separeres. På dette trinn inneholder oljen fortrinnsvis en liten mengde vann for å minimere oljetap i vannfasen. På dette trinn bør temperaturen fortsattholdes fra ca. 80 °C til 90 °C for å oppnå en hurtig og fullstendig spalting av såpen og for å minimere problemene med emulsjonsdannelse.

I andre alternative utførelsesformer kan det forsåpede CLA bli hydrolysert enzymatisk. Foretrukne enzymer innbefatter, men er ikke begrenset til, "Novozym 435" og andre enzymer som er ikke-spesifikke for triacylglycerolsyntese eller -hydrolyse (dvs. som forestrer/hydrolyserer alle hydroksygrupper (sn-1,sn-2 og sn-3) på glyserol). I andre
 5 alternative utførelsesformer blir re-forestringsreaksjonen forhindret i vesentlig grad ved å fjerne restetanolen før behandling med syre. I foretrukne utførelsesformer blir etanolen fjernet fra såpen med vakuumsuging.

Blandingene som er et resultat av prosessene beskrevet over, kan ha en svakt gul farge på grunn av gjenværende såpe og tilstedeværende dimerer. I noen foretrukne utfø-
 10 elsesformer blir følgelig den resulterende blanding med konjugert fettsyre destillert for å fjerne mulige forurensninger. I foretrukne utførelsesformer er sluttproduktet hovedsakelig fargeløst og i det vesentlige fritt for kontaminanter som dimerer eller såper. I foretrukne utførelsesformer inneholder blandingene med konjugert fettsyre mindre enn 10 ppm såpe og/eller mindre enn 0,1 % dimerer på vektbasis i forhold til innholdet av konjugert fettsyre. I
 15 foretrukne utførelsesformer har den ferdige CLA-blanding fremstilt ved fremgangsmåtene beskrevet over, et syretall som er større enn 190, fortrinnsvis i området fra ca. 190 til 210. Dessuten er sluttproduktet hovedsakelig fritt for CLA-estere. Med hovedsakelig fritt, menes at konsentrasjonen av CLA-etylestere er mindre enn ca. 1,0 % av konsentrasjonen av fri konjugert linolsyre på molbasis, og fortrinnsvis mindre enn 0,5 % av konsentrasjonen av fri
 20 konjugert linolsyre på molbasis. I foretrukne utførelsesformer inneholder den resulterende blanding mindre enn 1,0 mol% trans-trans-fettsyrer i forhold til andre fettsyrer, og fortrinnsvis mindre enn 0,5 mol% trans-trans-fettsyrer i forhold til andre fettsyrer.

De frie konjugerte linolsyrer fremstilt ved disse fremgangsmåter er egnet for forskjellige anvendelser. For eksempel kan CLA bli anvendt som dietttilskudd, bli innlemmet
 25 i næringsmiddelprodukter eller bli formulert for oral avlevering som nærmere beskrevet nedenfor. CLA kan også anvendes for produksjon av acylglyseroler, fortrinnsvis diacylglyseroler eller triacylglyseroler, for oral administrasjon eller innlemmelse i næringsmiddelprodukter eller -pulvere.

30 III. Stabilisering av CLA-forbindelser

Det beskrives også stabilisering av CLA-holdige forbindelser innbefattende, men ikke begrenset til, CLA, CLA-estere og CLA-triglyserider, ved å hindre oksidasjon av forbindelsene. Den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen bestemt mekanisme. Faktisk er en forståelse av mekanismen bak oppfinnelsen ikke nødvendig for å fremstille
 35 blandingen eller utføre fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelse. Uansett, til forskjell fra ikke-konjugerte fettsyrer, så synes CLA ikke å danne peroksider som nedbrytningsprodukter. Dette er blitt demonstrert eksperimentelt ved å måle peroksidverdier (PV) spektrofotometrisk med en kolorimetrisk ferritiocynat-metode. Etter lagring i åpent glass hadde CLA en PV på 32, mens til sammenligning var verdien for linolsyre 370.

CLA danner under nedbrytning flyktige organiske forbindelser, innbefattende heksan. Produkter lagret i et stålfat i flere uker ble funnet å inneholde opp til 25 ppm heksan. Heksan har en karakteristisk smak og lukt som er uønsket i næringsmiddelprodukter. Oksidasjon av CLA synes å være forårsaket av tilstedeværende metallforurensninger. Et system for å fjerne slike forbindelser som fremmer oksidasjon under rensingen, er således fordelaktig.

Videre er det også fordelaktig å tilsette forbindelser til CLA-preparater for å minske oksidasjonen under lagring. Forbindelser som hindrer oksidasjon (antioksidanter) har to generelle virkningsmekanismer. Den første er å hindre oksidasjon ved å fjerne peroksidradikaler i lipidet. Eksempler innbefatter, men er ikke begrenset til, tokoferoler og askorbylpalmitat. Den andre mekanisme for å forhindre oksidasjon er å danne komplekser med metallionene. Eksempler på metalloksidant-kompleksdannere innbefatter, men er ikke begrenset til, sitronsyreestere og lecithin. Noen kommersielt tilgjengelige forbindelser (for eksempel "Controx", Grunau (Henkel), Illertissen, DE) innbefatter både peroksidfjernere og metallchelatorer (for eksempel lecithin, tokoferoler, askorbylpalmitat og sitronsyreestere). I noen eksempelvis utførelsesformer tilsettes metalloksidantchelatorer til CLA-holdige forbindelser for å forhindre oksidasjon. I andre utførelsesformer blir en kombinasjon av metalloksidantchelatorer og peroksidfjernere innlemmet i CLA-blandingen.

I noen utførelsesformer anvendes gasskromatografi/massespektroskopi for å detektere tilstedeværelse av flyktige, organiske nedbrytningsprodukter av CLA. I andre utførelsesformer anvendes måling av oljestabilitetsindeks (OSI) for å detektere tilstedeværelse av flyktige organiske nedbrytningsprodukter av CLA.

Med noen eksempelvis utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for å fjerne pro-oksideranter (for eksempel jern) fra CLA-prøver. Fremgangsmåter innbefatter, men er ikke begrenset til, å foreta destillasjon eller adsorpsjon. I noen eksempelvis utførelsesformer tilsettes forbindelser for å hindre oksidasjon av CLA. Eksempler på flyktige organiske forbindelser innbefatter pentan, heksan, heptan, 2-butenal, etanol, 3-metylbutanal, 4-metylpentanon, heksanal, heptanal, 2-pentylfuran og oktanal. Fagfolk på området vil forstå at prøver kan inneholde ytterligere flyktige organiske forbindelser, avhengig av utgangsmaterialene og de nøyaktige reaksjonsbetingelser.

I foretrukne utførelsesformer er det under rensingen tatt forholdsregler for å forhindre oksidasjon under lagring. Disse forholdsregler innbefatter å fjerne forbindelser som tjener som pro-oksideranter, innbefattende, men ikke begrenset til, jern og andre metaller. I noen utførelsesformer fjernes metallene ved behandling med adsorpsjonsmidler, innbefattende, men ikke begrenset til, blekejord, aktive trekullzeolitter og silika. I andre utførelsesformer fjernes pro-oksiderantene ved destillasjon. I noen utførelsesformer anvendes silica som adsorpsjonsmiddel. I andre utførelsesformer fjernes pro-oksiderantene i en destillasjonsprosess. I noen utførelsesformer hindres oksidasjon av CLA ved å tilsette metalloksidantchelatorer eller peroksidfjernere til det ferdige produkt. I noen utførelses-

former måles oksidasjonsgraden med oljestabilitetsindeksen (OSI). OSI (se for eksempel "AOCS official method Cd 12b-92") er et mål for oljens bestandighet mot oksidasjon. Den defineres matematisk som tiden inntil den største endringen i oksidasjonshastigheten. Denne hastighet kan bestemmes matematisk. Eksperimentelt beregnes OSI ved å måle endringen i

5 konduktivitet i avionisert vann som de flyktige organiske syrene (oksidasjonsproduktene) blir oppløst i. Ved utføringen av OSI-målinger er det viktig å unngå forurensninger med spormengder av metaller som kan akselerere oksidasjonsprosessen. Generelt gjøres dette ved at alt anvendt glassutstyr vaskes omhyggelig med en rengjørende løsning som er fri for kromat eller surfaktanter. Vann må bli avionisert og alle løsninger må være av høyrenset

10 kvalitet.

IV. Administrasjon av CLA-holdige forbindelser

De konjugerte linolsyregrupper kan tilveiebringes i forskjellige former. I noen eksempelvis utførelsesformer er administreringen oral. CLA-gruppene kan være formulert

15 med egnede bærere, så som stivelse, sukrose eller laktose, i form av tabletter, piller, pastiller, kapsler, oppløsninger, væsker, oppslemminger, suspensjoner og emulsjoner. Fortrinnsvis inneholder CLA-formuleringene antioksidanter, innbefattende, men ikke begrenset til, "Controx", "Covi-OX", lecithin og oljeløselige former av vitamin C (askorbylpalmitat). CLA kan foreligge i vannløsning, oljeløsning eller i hvilken som helst av de andre formene

20 diskutert over. Tabletten eller kapselen kan være overtrukket med et enterisk belegg som oppløses ved ca. pH 6,0 til 7,0. Et egnet enterisk belegg som oppløses i tynntarmen men ikke i magesekken, er celluloseacetatftalat. I noen utførelsesformer foreligger CLA som myke gelatinkapsler som inneholder ca. 750 mg CLA. CLA kan også tilføres via en rekke andre ruter, innbefattende, men ikke begrenset til, på intravenøs, intramuskulær, intra-arteriell,

25 intramedullær, intratekal, intraventrikulær, transdermal, subkutan, intraperitoneal, intranasal, enteral, topisk, sublingual eller rektal måte. Ytterligere detaljer angående teknikker med hensyn til formulering for administrasjon, og administrering, kan finnes i den siste utgave av "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Maack Publishing Co., Easton, PA, USA).

En effektiv mengde av en CLA-gruppe (i form av fri fettsyre, alkylester eller

30 acylglycerol) kan også tilføres som et supplement i forskjellige næringsmiddelprodukter innbefattende dyrefôr, og drikker. For formålet med denne søknad betyr næringsmiddelprodukter som inneholder CLA ethvert naturlig, bearbeidet, diettmessig eller ikke-diett-messig, næringsmiddelprodukt som er tilsatt eksogent CLA. CLA kan være tilsatt i form av frie fettsyrer, estere av konjugert linolsyre eller som en olje som inneholder partielle eller

35 hele triglyserider med CLA. CLA kan derfor være direkte innlemmet i de forskjellige fremstilte næringsmiddelprodukter, innbefattende, men ikke begrenset til, diett-drikker, diettplater, supplementer, tilberedt fryst ferdigmat, sukkertøy, snacksprodukter (for eksempel chips), tilberedte kjøttprodukter, melk, ost, yoghurt og andre fett- eller oljeholdige næringsmidler. Næringsmiddelprodukter formulert med alkylestere eller grupper med konjugert linolsyre

som er fremstilt ved alkalisk alkoholatkatalyse, vil inneholde alkoholer (for eksempel metanol eller etanol), avhengig av de anvendte løsningsmidler og katalysatorer. Generelt vil mengde tilstedeværende alkohol være ca. 1 til 10 ppm.

Som vist over og i eksemplene, kan CLA-blandinger dessuten ha slike nivåer med flyktige organiske forbindelser at dette har en uheldig innvirkning på smaken og lukten av næringsmiddelprodukter som inneholder CLA. Det viser seg at næringsmiddelprodukter ifølge den foreliggende oppfinnelse, som inneholder CLA-blandinger med mindre enn 100 ppm med flyktige organiske forbindelser, og fortrinnsvis mindre enn 5 ppm med flyktige organiske forbindelser, er overlegen i smak og lukt sammenlignet med næringsmiddelprodukter som inneholder høyere konsentrasjoner med flyktige organiske forbindelser, og de vil bli foretrukket i en blindtest og ved lukttester. Med noen utførelsesformer tilveiebringes følgelig et næringsmiddelprodukt som inneholder en gruppe med konjugert linolsyre, hvor denne gruppe med konjugert linolsyre inneholder en tilstrekkelig lav konsentrasjon av flyktige organiske forbindelser til at smaken og lukten på næringsmiddelproduktet ikke blir påvirket.

EKSPERIMENTELT

De følgende eksempler er gitt for å demonstrere og ytterligere belyse visse foretrukne utførelsesformer og aspekter ved den foreliggende oppfinnelse, og de må ikke oppfattes som en begrensning av rammen for oppfinnelsen.

I den eksperimentelle beskrivelse som følger, gjelder følgende forkortelser: M (molar); mM (millimolar); μ M (mikromolar); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μ g (mikrogram); ng (nanogram); L eller l (liter); ml (milliliter); μ l (mikroliter); cm (centimeter); mm (millimeter); nm (nanometer); °C (grad celsius); KOH (kaliumhydroksid); HCl (saltsyre); Hg (kvikksølv).

Eksempel 1

Satsvis storskalaproduksjon av konjugert saflor-FAME

Produksjonen av konjugert saflor-FAME kan deles i to trinn, metanolyse og konjugering. For metanolyse ble 6000 kg saflorolje trukket inn i en lukket reaktor. Reaktoren ble spylt med nitrogen ved atmosfæretrykk og det ble tilsatt 1150 l metanol og 160 kg NaOCH₃ (30 % oppløsning). Blandingen ble oppvarmet til 65 °C under omrøring og fikk reagere ved 65 °C i 2 timer. Det resulterende bunnlag ble fjernet mens reaktoren ble spylt med nitrogengass, hvorefter det så under omrøring ble tilsatt 1000 l vann (40-50 °C, hvori det var oppløst 50 kg sitronsyremonohydrat). Lagene fikk separere (ca. 60 min) og bunnlaget ble fjernet mens reaktoren ble spylt med nitrogengass. Det resulterende produkt av saflor-FAME ble tørket ved 80 °C under vakuum i én time. En tilsvarende fremgangsmåte kan benyttes for å fremstille etylester (se eksempel 4).

Eksempel 2

Satsvis produksjonsmetode med vasking med lav pH

I dette eksempel beskrives en produksjonsmetode i satsvis skala hvor sluttproduktene har uventet lavt syretall. I et 350 l reaksjonskar ble 35 kg av en CLA-etylester forsåpet ved å anvende 9,8 kg KOH oppløst i 14,5 kg vann. Temperaturen ble holdt på 75 °C i 1 time. Det ble anvendt et svakt overtrykk (0,2 bar) for å hindre dannelse av såpe under perioden med svak økning i temperaturen som følge av den eksoterme forsåpningsreaksjon. Etter at omsetningen var fullstendig ble det tilsatt 10 l vann for å gjøre det lettere å røre om den høyviskøse blandingen. Til blandingen ble det tilsatt 17,5 l saltsyre under omrøring og blandingen ble varmet til 80 °C. Det ble dannet frie fettsyrer, og bunnlaget ble tappet av. Bunnlagets pH var under ca. 3,0-2,0. Det ble oppløst 5 kg sitronsyre i 50 kg vann og tilsatt i reaktoren under omrøring. Temperaturen ble hevet til 90 °C for å unngå emulsjoner. Ytterligere 5 kg sitronsyre ble tilsatt etter at vannet var tappet av, for å spalte alle spor av såpe. Sluttproduktets resulterende syretall var ca. 186, som var lavere enn den forventede verdi på 200.

Eksempel 3

Satsvis produksjonsmetode med vasking med svak syre

I dette eksempel beskrives en produksjonsmetode i satsvis skala hvor det ble anvendt en serie vaskinger med svak syre. Det ble isomerisert 75,0 kg etylester av safflorolje ved å anvende 1,5 kg kaliumetoksid. For å oppnå forsåpning ble etylesteren behandlet med 16,6 kg KOH oppløst i 32 l vann. Temperaturen i blandingen ble holdt mellom 75 °C og 80 °C, og reaksjonsblanding ble holdt i nitrogenatmosfære under 0,3 bar trykk. Temperaturen i den eksoterme reaksjonsblanding økte til 85 °C. Etter at forsåpningsreaksjonen var fullstendig, ble det tilsatt 8,0 kg sitronsyre (fast) under kraftig omrøring, og det ble dannet frie fettsyrer. Bunnfasevannet med pH 6 ble tappet av. Deretter ble to vaskevann dusjet inn i reaktoren uten omrøring, og dette fikk bunnfelle før det ble tappet av. Deretter ble det utført tre sluttvaskinger med sitronsyremonohydrat oppløst i vann under kraftig omrøring av reaksjonsblanding. Disse tre sluttvaskinger var på henholdsvis 1,0, 2,0 og 7,0 kg. Oljeproduktet ble tørket under vakuum. Produktets syretall var 201.

Eksempel 4

Syntetisering i laboratorieskala av konjugert safflor-FAEE

Dannelse av safflorolje-etylestere ble utført ved å blande 1000 g safflorolje med 50 ml av 21 % natriumetylat i etanolløsning og 230 ml ren etanol i en rundkolbe. Blanding ble holdt under reflux i 1 time ved 78 °C med omrøring, og deretter overført til en skilletrakt. Etter at lagene var separert, ble bunnlaget, 100 ml, dekantert. Topplaget som inneholdt etylestere, ble vasket tre ganger med varmt vann, 90 °C, og deretter tørket under vakuum. De tørkede etylestere ble deretter destillert under vakuum (ca. 0,3 mbar) ved 180 °C.

Konjugering av det destillerte FAEE fra safflorolje for å fremstille et CLA-FAEE-produkt ble utført ved å blande 100 g FAEE med 2,00 g natriumetylatspulver og 0,66 g etanol i en minireaktor. Luften ble erstattet med nitrogen og reaktoren ble deretter varmet til 120 °C. Etter at blandingen var omrørt i 3 timer ved 120 °C, ble reaktoren avkjølt til 80 °C.

- 5 Den konjugerte olje ble deretter vasket 5 ganger med 50 g varmt vann, 80-90 °C. Vaskevann nr. 4 inneholdt 2 g oppløst sitronsyre. Etylesteren ble deretter tørket under vakuum. Endelig syretall for CLA-etylesteren var 0,9. Restmengden ikke-konjugert linolsyre var 0,9 %.

- 10 Det som er klart av ovenstående, er at med den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en konjugert linolsyreblanding med høy renhet som kan anvendes ved formuleringen av dyrefôr og i næringsmiddelprodukter som er egnet for humant konsum.

- 15 Alle publikasjoner og patentskrifter nevnt i beskrivelsen foran, innlemmes her gjennom henvisning. Forskjellige modifikasjoner og variasjoner av beskrevet fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen vil være åpenbare for fagfolk på området uten å avvike fra rammen for og ideen bak oppfinnelsen. Selv om oppfinnelsen er blitt beskrevet i sammenheng med spesifikke foretrukne utførelsesformer, så er det underforstått at oppfinnelsen slik den er angitt i kravene, ikke skal begrenses unødvendig til slike spesifikke utførelsesformer. Faktisk er de forskjellige modifikasjoner av de beskrevne måter for utførelse av oppfinnelsen, som er åpenbare for fagfolk innen medisin, biokjemi eller beslektede felter, ment å ligge innen rammen for de følgende krav.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Fremgangsmåte for fremstilling av en fri konjugert linolsyre som har et syretall på over 190
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene:
- a) behandle en blanding omfattende estere av linolsyre med en alkoholatkatalysator,
 - b) behandle den konjugerte linolsyreesterblandingen dannet i trinn a) med alkali,
 - 10 c) behandle den forsåpede konjugerte linolsyre blandingen dannet i trinn b) med flere vaskinger med svak syre, der vaskeløsningen med svak syre har en pH fra ca. 5 til 7.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor blandingen omfattende estere av linolsyre er fremstilt av en olje valgt blant safflorolje, solsikkeolje og maisolje.
- 15 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor alkoholatkatalysatoren velges blant natriummetylat, kaliummetylat, natriumetylat og kaliumetylat.
- 20 4. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-3, hvor vaskingen med svak syre utføres med en sitronsyreløsning.