



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



FI000120148B

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 120148 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

15.07.2009

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C07J 9/00 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

20060782

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag

30.08.2006

(24) Alkupäivä - Löpdag

03.05.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

30.08.2006

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/FI1991/000139

(73) Haltija - Innehavare

1 • Raisio Benecol Oy, PL 101, 21201 Raisio, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Miettinen, Tatu, Sateenkuja 3 C, 02100 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 • Vanhanen, Hannu, Naapurinkuja 3 B 6, 01670 Vantaa, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 • Wester, Ingmar, Stålarinkatu 19 as. 2, 20810 Turku, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä β -sitostanolirasvahappoesterin tai esteriseoksen valmistamiseksi

Förfarande för framställning av en β -sitostanolfettsyraester eller esterblandning

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan: **20011891**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB 1405346 A

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää β -sitostanolrasvahappoesterin tai esteriseoksen valmistamiseksi esteröimällä vapaa β -sitostanoli rasvahappoesterillä tai rasvahappoesteriseoksella vaihtoesteröintikatalyytin läsnä ollessa ja ilman liuotinta.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av β -sitostanolfettsyraester eller en esterblandning genom att förestra fri β -sitostanol med en fettsyraester eller fett-syraesterblandning i närvaro av en omestringskatalysator och utan lösningsmedel.

Menetelmä β -sitostanolirasvahappoesterin tai esteriseoksen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av en β -sitostanolfettsyraester eller esterblandning

5 Tämä hakemus on jakamalla erotettu hakemuksesta FI-20011891.

Tämä keksintö kohdistuu seerumin kolesterolipitoisuutta alentavaan aineeseen ja sen käyttöön.

- Suoliston rasva-aineenvaihduntaa muuttamalla voidaan tehokkaasti alentaa seerumin korkeaa kolesterolitasoa. Tällöin vaikutuskohteena voi olla triglyseridien, kolesterolin tai sappihappojen imeytymisen häiritseminen. Tiettyjen kasvisterolien, kuten β -sitosterolin (24-etyyli-5-kolesteeni-3 β -oli) ja sen kovetetun muodon, β -sitostanolin (24-etyyli-5 α -kolestaani-3 β -oli), on monessa tutkimuksessa todettu alentavan seerumin kolesterolitasoa vähentämällä dietaarisen kolesterolin imeytymistä suolistosta (1-25). Kasvisterolien käyttöä voidaan pitää turvallisena, koska kasvisterolit ovat luonnollisia kasvirasvojen ja -öljyjen komponentteja. Itse kasvisterolit eivät imeydy suolistosta tai ne imeytyvät erittäin pieninä pitoisuuksina. Seerumin kolesterolin laskuun, erityisesti LDL-kolesterolin laskuun, liittyy selvästi alentunut sepelvaltimotaudin esiintyminen. Seerumin korkea kolesteroliarvo on merkittävin yksittäinen sepelvaltimotaudin riski-indikaattori.
- 10
- 15
- 20 Kolesterolin imeytymisaste riippuu perinnöllisestä ominaisuudesta, apoproteiini E-fenotyypistä. Apoproteiini E on seerumin lipoproteiineihin kuuluva valkuaisaine, joka osallistuu kolesterolin kuljetukseen elimistössä (26). Imeytymiseen vaikuttavan lipoproteiinin, apoproteiini E:n, synteesiin liittyviä alleleja tunnetaan kolme erilaista tyyppiä, e2, e3, ja e4, jotka yhdistyvät pareittain sattumanvaraisesti.
- 25
- Alleelit voivat muodostaa kaikkiaan kuusi erilaista yhdistelmää. Mitä suurempi alaindeksien summa on, sitä paremmin kolesterolin imeytyy, ja sitä korkeampi on kolesterolin, erityisesti pahanlaatuisen LDL-kolesterolin pitoisuus seerumissa (27). Suomalaisten perintötekijöissä e4 alleeli on yliedustettuna siten, että sen osuus on lähes kaksinkertainen moniin Euroopan populaatioihin verrattuna (28).
- 30
- Suomalaiset ovatkin poikkeuksellisen herkkiä ravinnon dieettivirheille, rasvaiselle ja kolesterolipitoiselle ravinnolle (29).

Seerumin kolesterolipitoisuutta voidaan dietaarisin keinoin alentaa kiinnittämällä huomiota nautitun rasvan määrään ja laatuun sekä syödyn kolesterolin määrään. Käytännössä nämä keinot eivät kuitenkaan aina johda tyydyttävään lopputulok-

seen. On etsittävä myös muita, koko väestölle sopivia tapoja saavuttaa nykyistä alhaisempi seerumin kolesterolitaso. Ravinnon kuitupitoisuuden lisääminen on teholtaan rajallinen keino. Ravinnon liukoisen kuidun kolesterolia alentava vaikutus perustuu sappihappojen sitomiseen ja poistamiseen. Koska kolesterolin imeytymisellä on perustavaa laatua oleva merkitys seerumin kolesterolitason säätelyssä, on loogista pyrkiä kehittämään sellaisia keinoja, joiden avulla voidaan estää tai vähentää kolesterolin imeytymistä.

Pollak osoitti nautitun kasvisterolin alentavan seerumin kolesterolitasoa ihmisellä (1). Sama oli aiemmin todettu koe-eläimillä (2,3). Suurten kasvisteroliannosten on todettu alentavan seerumin kolesterolitasoa useissa tutkimuksissa, parhaimmillaan 10-20 % (4,5). Näissä kokeissa on käytetty suuria määriä, ad 24 g/päivä, kiteisessä muodossa olevaa β -sitosterolia (6). Eräissä kokeissa on seerumin kolesterolitaso alentunut merkitsevästi pienemmilläkin annoksilla (7), vaikka liukoinen, rasvahappoestereinä annettu pieni sitosterolimäärä ei näyttänyt alentavan seerumin kolesterolia kovinkaan tehokkaasti (8). Sitosterolivalmisteet ovat yleensä olleet pitkäaikaiskäytössä hyvin siedettyjä (9).

Luonnon kasvisterolit muistuttavat rakenteeltaan kolesterolia. Kolesterolin ja kasvisterolimolekyylin erot löytyvät lähinnä perusrungon sivuketjun rakenteesta. Tavallinen ruokavalio sisältää kasvisteroleja 100-300 mg/vrk. Pääosa dieetin kasvisterolista on β -sitosterolia, ja noin kolmasosa kampesterolia. Myös saturoituja 5α -sitostanoleita esiintyy ravinnossa pieniä määriä. Tavallisesti erityisesti seerumin kampesterolipitoisuudet heijastavat kolesterolin imeytymistä (10, 11, 12). Dieetin sisältämien kasvisterolien määrissä esiintyvä vaihtelu vaikuttaa seerumin kolesterolipitoisuuteen, mutta tämä on huonosti tutkittu alue. Kasvisterolit imeytyvät suolistosta niukasti. Elimistöön vähäisessä määrin imeytyvät kasvisterolit (alle 10 % sterolimäärästä) (30, 31, 32) erittyvät sappeen ja sitä kautta ulosteeseen. Sterolipitoisuudet on nykyisin helppo mitata kaasukromatografisilla menetelmillä ravinto-, seerumi- tai ulostenäytteistä. Pitoisuudet seerumissa riippuvat osittain ravinnosta saaduista kasvisterolimääristä ja sterolien imeytymistehokkuudesta. Yleensä seerumin kasvisterolipitoisuudet jäävät alle 1/300 seerumin kolesterolipitoisuudesta, koska imeytynyt kasvisterolifraktio eritetään elimistöstä saponin mukana.

Suuretkaan nautitut kasvisteroliannokset eivät näy seerumin kasvisterolipitoisuuksissa. Arvot pysyvät normaalitasolla, koska ihmisellä kasvisterolien imeytymiskapasiteetti kyllästyy nopeasti. Seerumin kasvisterolipitoisuus nousee haitalliselle

tasolle muutamissa harvinaisissa sairauksissa, kuten serebrotendinoottisessa ksantomatoosissa ja sitosterolemiassa (33, 34, 35), joiden yhteydessä myös sepelvaltimotauti on tavallinen. Näitä sairauksia on korkeintaan muutama tapaus miljoonaa asukasta kohden. Suomessa ei ole havaittu yhtään tautitapausta. Eräitä maksasairauksia sairastavilla potilailla tavataan ajoittain korkeita kasvisteroliarvoja (36).

Kolesteroliainevaihduntatutkimukset ovat osoittaneet sitosterolin estävän sekä endogeenisen että dietaarisen kolesterolin imeytymistä suolistosta (13,14). Tämän seurauksena neutraalisteroidien erityis ulosteeseen lisääntyy, mikä johtaa kolesterolipulaan maksassa ja sitä kautta alentuneeseen seerumin kolesterolipitoisuuteen. Sappihappojen imeytymiseen sitosteroli ei sen sijaan vaikuta (13).

Eläinkokeiden perusteella näyttää sitosterolin vaikutus perustuvan sen kykyyn syrjäyttää ravinnon kolesteroli sappihappomisellistä (15, 16, 17). Samanlaisia tuloksia on saatu myös ihmisellä (37). Eri kasvisterolien on osoitettu vaikuttavan eri tavalla kolesterolin imeytymiseen (19, 38). Aiempien koe-eläimillä suoritettujen tutkimusten perusteella saa vaikutelman, että sitostanoli alentaa tehokkaimmin kolesterolin imeytymistä (38) ja on itse lähes imeytymätön. Lisäksi kontrolloimaton kuudella henkilöllä suoritettu tutkimus osoitti vapaan sitostanolin (1,5 g/vrk) alentavan neljän viikon aikana seerumin kolesterolia (pääosin LDL-kolesterolia) jopa 15 %. Kahden viikon tauon aikana kolesteroliarvot palautuivat ennalleen (20). Useimmat kasvisterolivalmisteet sisältävät monia eri kasvisteroleja. Kasvisteroliseoksen vaikutus kolesterolin imeytymiseen vaihtelee, samoin niiden oma imeytyminen (21, 22, 23).

Tähänastisissa tutkimuksissa on pääasiassa keskitytty selvittämään sitä, miten kasvisterolien annostelumuoto (kiteinen, suspensio, granula) vaikuttaa näiden tehoon alentaa seerumin kolesterolitasoa. Kiteiset kasvisterolit eivät liukene merkittävästi ruoansulatuskanavassa misellifaasiin, eivätkä ne siten pysty tehokkaasti estämään kolesterolin imeytymistä. Öljyt ja rasvat pystyvät liuottamaan ainoastaan rajoitetusti vapaita steroleita. Vain liuenneessa muodossa olevat sterolit estävät kolesterolin imeytymisen. Heinemannin ja työtovereitten (24) mukaan sitostanoli esti infuusiokokeessa kolesterolin imeytymisen 82-prosenttisesti, sitosterolin estäessä imeytymistä vastaavasti 50 %.

Eräissä tutkimuksissa on käytetty sitosterolin rasvahappoestereitä, kuten sitosteroliasetaattia tai -oleaattia tai stigmasterolin oleaattia rasvaan liuotettuna. Rottakokeissa tällainen "öljy", jonka sterolipitoisuus oli ad 8 %, vähensi kolesterolin absorptiota 20-40 % (22). Runsaskolesterolisen dieetin (500 mg/vrk) aikana sitosterolioleaatti (2 g/vrk) rasvaan liuotettuna vähensi kolesterolin imeytymistä koehenkilöillä keskimäärin 33 % (25). Samassa tutkimuksessa sitosteroli ruokaan sekoitettuna ja pienemmällä annostuksella (1 g/vrk) alensi kolesterolin imeytymistä 42 %.

10 Saksalainen patenti (Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift 2035069/28.01.71) koskee kasvisterolirasvahappoestereiden lisäämistä ruokaöljyyn tavoitteena ihmisen seerumin kolesterolitason alentaminen. Mainitussa patentissa on esitetty käytettäväksi vapaiden sterolien esteröimiseen menetelmää, joka ei missään tapauksessa täytä elintarvikekelpoisen tuotteen valmistusvaatimuksia. Patentin mukaan esteröinti suoritetaan vapaan sterolin ja rasvahappoanhydridin välillä perkloorihapon toimiessa katalyyttinä. Käytettyä katalyyttiä ja reagenssia ei voida hyväksyä elintarvikeprosessissa. Lisäksi kyseinen patenti 15 koskee ainoastaan natiivien kasvisterolien rasvahappoestereitä.

Julkaisusta EP-A2-195 311 on tunnettua esteröidä mm. β -sitosterolia rasvahapoilla käyttäen entsyymiä.

20 Sterolirasvahappoestereiden valmistuksessa on käytetty monia reagensseja, joita ei voida hyväksyä elintarvikkeeksi tai elintarvikkeen lisäaineeksi tarkoitetun tuotteen valmistuksessa. Yleisiä ovat mm. rasvahappojen kloori- (39), bromi- (40), tionyylikloridi- (41) tai anhydridijohdannaisten (42) käyttö. Aiemmin tunnetuista menetelmistä vain Baltessin menetelmä (Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift 2248921/11.04.74) öljyjen ja rasvojen sisältämien sterolien esteröimiseksi 25 kemiallisella vaihtoesteröintitekniikalla täyttää elintarvikeprosessien edellyttämät kriteerit. Mainitussa patentissa vapaa steroli ja ylimäärä rasvahappoestereitä lisätään öljy- tai rasvaseokseen, minkä jälkeen koko rasvaseos vaihtoesteröidään yleisesti tunnetulla vaihtoesteröintitekniikalla.

30 Keksinnön pääasialliset tunnusmerkit ilmenevät oheisista patenttivaatimuksista.

Esillä oleva keksintö koskee siis kokonaan toisentyypin sterolin käyttöä seerumin kolesterolitason alentamiseen. Kyseessä on 5α -tyydyttyjen steroleiden rasvahappoesterit, erityisesti sitostanolirasvahappoesterit (sitostanoli= 24-etyyli- 5α -kolestaani- 3β -oli), joiden on havaittu alentavan seerumin kolesterolitasoa erityi-

- sen tehokkaasti. Kyseisiä estereitä voidaan valmistaa ja käyttää sellaisenaan, tai lisätä elintarvikkeisiin, erityisesti elintarvikkeen rasvaosaan. Sitostanolirasvahappoesteriseos valmistetaan kovettamalla kaupallista β -sitosteroliseosta (sitosteroli= 24-etyyli-5-kolesteeni-3 β -oli). β -sitostanolia voidaan valmistaa tunnettua
- 5 kolesterolin kovetustekniikkaa käyttäen, kovettamalla β -sitosterolia Pd/C-katalyytin avulla orgaanisessa liuottimessa (43). Tällä seoksella on FDA:n hyväksyntä (Cytellin, Eli Lilly). Reaktiossa saavutetaan yli 99 %:n kovettumisaste. Kovetuksessa käytetty katalyytti poistetaan membraanisuodattimella ja saatu sitostanoli kiteytetään, pestään ja kuivataan.
- 10 β -sitostanoliseos, joka sisältää noin 6 % kampestanolia, esteröidään eri rasvahappoesteriseoksilla yleisesti tunnetulla kemiallisella vaihtoesteröintiteknikalla (44, 45, 46) keksinnön mukaisesti. Reaktiossa voidaan käyttää minkä tahansa kasviöljyn rasvahappojen metyyliesteriseosta. Esimerkkeinä mainittakoon rypsiöljy-metyyliesteriseos, mutta kaikki noin 2-22 hiiliatomia sisältävät rasvahapot
- 15 ovat käyttökelpoisia. Keksinnön mukaisten stanolirasvahappoestereiden valmistustapa poikkeaa aikaisemmista menetelmistä siinä, ettei esteröintireaktiossa käytetä muita aineita kuin vapaata stanolia, rasvahappoesteriä tai rasvahappoesteriseosta ja katalyyttiä. Katalyyttinä voidaan käyttää mitä tahansa tunnettua vaihtoesteröintikatalyyttiä, kuten esimerkiksi Na-etylaattia.
- 20 Keksinnön mukaista ainetta valmistettaessa ei, toisin kuin aiemmin mainitussa Baltasin menetelmässä, itse rasvaa vaihtoesteröidä. Tällöin rasvavalmisteen tai muun elintarvikkeen rasvaosa säilyttää luontaiset ominaisuutensa. Edelleen on huomattava, että keksinnön mukainen vaihtoesteröity seos voidaan suoraan
- 25 lisätä rasvapitoisiin elintarvikkeisiin tai käyttää sellaisenaan. Koska seoksen stanoliosaa on imeytymätön, on stanolirasvahappoesteriseoksen energiasisältö rasvahappokoostumuksesta riippuen vain 20-40 % tavanomaisen öljyn tai rasvan energiasisällöstä. Näin ollen seoksia voidaan käyttää edullisesti myös elintarvikkeen energiasisältöä alentavana aineena.
- β -sitostanolirasvahappoestereiden vaikutusta kolesterolin absorptioon ja seerumin kolesteroliarvoihin ei ole aikaisemmin tutkittu. Tähän keksintöön johtaneessa tutkimuksessa selvitettiin, miten rypsiöljyyn liuotettu sitosterolin kovetettu muoto sitostanoli (koostumus: β -sitostanolia 94 % ja kampestanolia 6 %) vaikutti sekä a) vapaana että b) rasvahappoesterinä seerumin kasviterolipitoisuuksiin. Tutkimuksen koejärjestely on esitetty liitteen 1 kaaviossa 1. Alkujaksona oli kaikilla
- 35 ryhmillä rypsiöljyinterventio (50 g/vrk), vertailuryhmällä kokeen ajan rypsiöljyinter-

ventio, ja muilla ryhmillä rypsiöljyyn lisättyä kokeen järjestelykaavion mukainen yhdiste.

Liitteen 2 taulukosta 1 nähdään, että ravinnon β -sitostanolipitoisuuden nostaminen alensi sekä β -sitosterolin että kampesterolin pitoisuutta seerumissa, mutta ei aiheuttanut seerumin β -sitostanolipitoisuudessa selvää muutosta. Tuloksista nähdään myös, että liukoisessa muodossa - siis rasva-happoestereinä - nautittu β -sitostanoli vähensi kasvisterolien imeytymistä tehokkaammin kuin samaa annostusta käyttäen nautittu vapaa β -sitostanoli. β -sitostanolien rasvahappoestereiden kohdalla havaitaan lisäksi selvä annosvaste. On ilmeistä, että β -sitostanoli estää myös β -sitosterolin ja kampesterolin imeytymisen, mikä nähdään näiden pitoisuuksien pienenemisenä.

Vastaavasti mitattiin myös stanolilisäysten aiheuttamat muutokset seerumin kokonais- ja LDL-kolesterolipitoisuuksissa ja kolesterolin absorptiossa. Vertailuryhmä söi tavallista rypsiöljyä ilman stanolilisäyksiä. Liitteen 3 taulukko 2 osoittaa, että kolesterolin absorptio väheni tehokkaasti β -sitostanolirasvahappoesteriseoksella (27,4 %) vaikka syöty stanolimäärä kuitenkin oli suhteellisen pieni, 895 mg/vrk. Vertailuryhmän kolesteroliabsorptio ei muuttunut. Vapaan β -sitostanolin ja β -sitostanolirasvahappoesteriseoksen vaikutus seerumin kolesterolipitoisuuteen, verrattuna vertailuryhmään, nähdään liitteen 4 taulukosta 3. β -sitostanolirasvahappoesteriseos vähensi sekä kokonaiskolesterolia että LDL-kolesterolia tehokkaammin kuin vapaa ja β -sitostanoli. Rypsiöljyyn liuotettu β -sitostanolirasvahappoesteriseos (3,2 g β -sitostanolia/vrk) vähensi kokonaiskolesterolia 9,5 % enemmän ja LDL-kolesterolia 11,6 % enemmän kuin rypsiöljy yksinään. Vastaavasti HDL/LDL-kolesterolisuhde nousi merkitsevästi 0,32:sta 0,52:een.

Suoritetut tutkimukset osoittavat selvästi, että β -sitostanolirasvahappoestereiden lisäyksellä esim. ravintorasvoihin voidaan saavuttaa merkittäviä etuja sekä kansanravitsemuksessa että hyperkolesterolemian hoidossa, koska 1) seos pienentää seerumin kolesteroliarvoja, 2) seos ei lisää seerumin kasvisterolipitoisuuksia, 3) seosta voidaan käyttää päivittäin normaalin ruuan valmistuksessa suurinakin annoksina (0,2-20 g/vrk) rasvan substituuttina, jolloin myös energian saanti rasvasta vähenee.

Tutkimuksessa todettuja β -stanolirasvahappoestereiden aiheuttamia lipidimuutoksia on pidettävä terveyden kannalta erittäin merkittävänä. Tulosten

merkittävyttä korostaa mahdollisuus käyttää yhdistettä elintarvikevalmisteiden ohella osana tavallista ruuanvalmistusta ja ruokailua. Tutkimustulokset osoittavat, että seerumin stanolipitoisuus ei interventiodieetin aikana nouse, ja että muiden kasviterolien pitoisuudet seerumissa alenevat. Näin ollen kyseinen β -stanoliesteriseos on turvallinen myös niille harvoille henkilöille, jotka absorboivat herkästi kaikkia steroleja, tai joilla on häiriötä sterolien erityksessä. Lisäksi päivittäinen rasvasubstituutio vähentää henkilön energiansaantia, koska vaikuttava stanoliyhdiste ei imeydy, ts. se toimii energiaa tuottamattomana osana rasvaa. Mitään näyttöä ei ole saatu siitä, että kyseinen β -stanoliesteriseos häiritsisi lipidi-

5
10

Sitostanolirasvahappoesteriseoksen käyttömahdollisuudet eri rasvojen ja öljyjen osana rasvapitoisissa tuotteissa ovat laajat, koska seoksen fysikaalisia ominaisuuksia voidaan helposti muokata muuttamalla seoksen rasvahappokoostumusta. Tämän lisäksi voidaan β -sitostanolirasvahappoesteriseoksen rasvahappokoostumus valita esimerkiksi runsaasti monoeneja ja polyeeneja sisältäväksi, jolloin sen teho seerumin kolesterolin alentajana korostuu.

15

Koska β -sitostanolirasvahappoesteriseoksen valmistukseen käytetään tavalliseen ravintoon kuuluvia raaka-aineita ja elintarviketeollisuuden yleisiä valmistusprosesseja, ei yhdisteen valmistukselle ja käytölle ole esteitä.

20 **Esimerkki 1**

Valmistettiin pilot-mittakaavassa β -sitostanolieriseos. 6 kg β -sitostanolia, jota oli kuivattu yli yön 60 °C:ssa, esteröitiin 8,6 kg:n kanssa rypsiöljymetyyliesteriseosta. Esteröinti suoritettiin seuraavasti:

β -sitostanolin ja rypsiöljyn rasvahappojen metyyliesteriseosta kuumennettiin reaktioastiassa 90-120 °C:ssa ja 0,67-2,0 kPa:n alipaineessa. Kuivausta jatkettiin tunnin ajan, lisättiin 12 g Na-etylaattia ja reaktiota jatkettiin noin 2 tuntia. Katalyytti tuhottiin lisäämällä seokseen vettä. Faasien erottamisen jälkeen öljyfaasi kuivatettiin vakuumissa.

25

Reaktiossa saavutetaan 98 %:n konversio. Saatu esteriseos voidaan käyttää sellaisenaan lisänä rasvoissa.

30

Rypsiöljyn rasvahappojen metyylesteriseoksen sijasta reaktiossa voidaan käyttää minkä tahansa kasviöljyn rasvahappojen metyyliesteriä tai -seosta, erityisesti sellaisten rasvahappojen, jotka sisältävät noin 2-22 hiiliatomia.

Esimerkki 2

- 5 Lisättiin rypsiöljyyn ennen rypsiöljyn puhallusta esimerkissä 1 valmistettua β -sitostanoliesteriseosta 3, 6 ja 13 p-%. Valmistettiin mainittuja rasvaseoksia 65 % sisältävät majoneesit.

	Majoneesi:	%
	rasvaseos	65,0
10	sakeuttamisaine	2,0
	suola	1,0
	sokeri	3,0
	etikka (10 p-%)	3,0
	sinappi	2,0
15	vesi	24,0
	yht.	100,0

Majoneesi valmistettiin homogenoimalla tunnetulla tavalla Koruma-homogenisaattorilla.

- 20 Majoneesien valmistuksessa ei ilmennyt mitään ongelmia eivätkä niiden aistinvaraiset ominaisuudet poikenneet tavanomaisten majoneesien ominaisuuksista.

Esimerkki 3

Lisättiin rypsiöljyyn ennen öljyn puhallusta esimerkissä 1 valmistettua β -sitostanoliesteriseosta 3 ja 6 p-%.

- 25 Rypsiöljy, johon oli lisätty esteriseokset, pysyi kirkkaana huoneenlämmössä eikä siinä havaittu pysyvää sameutta jääkaappilämpötiloissa säilytettyinä.

Esimerkki 4

Esimerkkien 2 ja 3 mukaisissa tuotteissa voidaan öljynä käyttää myös muita kasviöljyjä, kuten esim. auringonkukka-, soija-, oliivi- ja maissiöljyä.

Taulukko 1

Rypsiöljyyn lisätyn β -sitostanolin aiheuttamat muutokset (%) seerumin kasvisteroliin pitoisuuksissa koejaksolla sekä β -sitostanoliesterin (3150 mg/vrk) osalta jatkojaksolla

5	Rypsiöljyyn lisätty stanoli (mg/vrk)	Lisäyksen aiheuttama muutos (%) ¹		
		Kampesteroli	β -sitosteroli	β -sitostanoli
	β -sitostanoli (895)	-18,4 ^x	-13,0 ^x	-0,6
	β -sitostanoliesteri (895) ²	-28,4 ^x	-23,4 ^x	-10,3
10	β -sitostanoliesteri (3150) ²	-51,7 ^x	-43,3 ^x	-10,3

1) = Muutos taulukossa korjattu rypsiöljyä saaneen vertailuryhmän %-muutoksella

2) = määrä vapaana stanolina

x) = muutos merkitsevä, vertailuryhmän muutokseen verrattuna $p < 0,05$

15 Taulukko 2

Rypsiöljyn ja siihen liuotetun β -sitostanoliesterin vaikutus kolesterolin absorptioon

Ryhmä (mg/vrk)	Kolesterolin absorptio interventiojakson		Muutos (%)
	-alussa		-lopussa
20 Vertailu	Rypsiöljy	Rypsiöljy	
	29,4	30,4	+3,4
β -sitostanoliesteri (895) ¹	Rypsiöljy	Rypsiöljy + β -sitostanoliesteri	
	29,2	21,2 ^{xt}	-27,4

25 x) = muutos merkitsevä, $p < 0,05$

t) = muutos merkitsevä vertailuryhmän muutokseen verrattuna, $p < 0,05$

1) = määrä vapaana stanolina

Taulukko 3

Rypsiöljyyn lisätyn β -sitostanolin vaikutus seerumin kolesteroliarvoihin

	Rypsiöljyyn lisätty stanoli (mg/vrk)	Lisäyksen aiheuttama muutos, (%)¹	
		kokonaiskolesteroli	LDL-kolesteroli
5	β -sitostanoli (895)	-2,1	-6,4
	β -sitostanoliesteri (3150)	-9,5 ^x ^t	-11,6 ^t

1) = korjattu muutos rypsiöljyä saaneen vertailuryhmän %-muutoksella

x) = muutos merkitsevä, $p < 0,05$

t) = muutos merkitsevä vertailuryhmän muutokseen verrattuna, $p < 0,05$

- 1) Pollak, O.J., Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*, 7, 702-706, (1953).
- 2) Peterson, D.W., Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78, 143-147, (1951).
- 5 3) Pollak, O.J., Successful prevention of experimental hypercholesterolemia and cholesterol atherosclerosis in the rabbit, *Circulation*, 7, 696-701, (1953).
- 4) Farquhar, J.W. and Sokolow, M., Response of serum lipids and lipoproteins of man to beta-sitosterol and safflower oil - A long term study, *Circulation*, 17, 890, (1956).
- 10 5) Grundy, S.M., Ahrens, E.H. Jr., and Davignon, J., The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man, *J. Lipid Res.*, 10, 304, (1969).
- 6) Oster, P., Schlierf, G., Heuck, C.C., Greten, H., Gundert-Remy, U., Haase, W., Klose, G., Nothelfer, A., Raetzer, H., Schellenberg, B. und Schmidt-Gayk, H.,
 15 Sitosterin bei familiären Hyperlipoproteinämie Typ II. Eine randomisierte gekreuzte Doppelblindstudie, *Dtsch. Med. Wschr.*, 101, 1308-1311, (1976).
- 7) Grundy, S.M., Dietary and drug regulation of cholesterol metabolism in man, pp. 127-159 in "Lipid Pharmacology, Vol II", Eds: Paoletti, R and Glueck, C.J., Academic Press, New York, 1976.
- 20 8) Lees, A.M., Mok, H.Y.I., McCluskey, M.A., Grundy, S.M., Plant sterols as cholesterol lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance, *Atherosclerosis*, 28, 325-338. (1977).
- 9) Schwartzkopf, W. and Jantke, H.-J., Dosiswirksamkeit von Beta-sitosterin bei Hypercholesterinämien der Typen II A und II B, *Munch. Med. Wschr.*, 120, 1575,
 25 (1969).
- 10) Tilvis, R.S., Miettinen, T.A., Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption, *Am. J. Clin. Nutr.*, 43, 92-97, (1986).
- 11) Miettinen, T.A., Tilvis, R.S., Kesäniemi, Y.A., Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a
 30 randomly selected male population, *Am. J. Epidemiol.*, 131, (1), 20-31. (1990).

- 12) Färkkilä, M.A., Tilvis, R.S., Miettinen, T.A., Regulation of plasma plant sterols levels in patients with gut resections, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 48, 715-722, (1988).
- 13) Grundy, S.M., Mok, H.Y.I., Effects of low dose phytosterols on cholesterol absorption in man, pp. 112-118 in "Lipoprotein metabolism". Ed. Greten, H., Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1976
- 14) Kudchodkar, B.J., Horlick, L., Sodhi, H.S., Effects of plant sterols on cholesterol metabolism in man, *Atherosclerosis*, 23, 239, (1976).
- 15) Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G.V., Gallo I.L., Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols, *J. Lipid Res.*, 29, 1573-1582, (1988).
- 16) Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G.V., Gallo, I.L., Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats, *J. Lipid Res.*, 29, 1583-1592, (1988).
- 15 17) Ikeda, I., Tanabe, Y. and Sugano, M., Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 361-369, (1989).
- 18) Ikeda, I., Sugano, M., Comparison of absorption and metabolism of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats, *Atherosclerosis*, 30, 227, (1978).
- 19) Sugano, M., Marioka, H. and Ikeda, I., A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats, *J. Nutr.*, 107, 2011-2019, (1977).
- 20 20) Heinemann, T., Leiss, O., von Bergman, K., Effects of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 61, 219-223, (1986).
- 21) Lees, R.S., Lees, A.M., Effects of sitosterol therapy on plasma lipids and lipoprotein concentrations, pp. 119-124 in "Lipoprotein metabolism". Ed: Greten, H., Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1976.
- 25 22) Mattson, F.H., Volpenhein, R.A. and Erickson, B.A.: Effect of plant sterol esters on the absorption of dietary cholesterol, *J. Nutr.*, 107, 1139-1146, (1977).

- 23) Heinemann, T., Pietruck, B., Kullak-Ublick, G., von Bergman, K., Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption, *Agents Actions (Suppl)*, 26, 117-122, (1988).
- 24) Heinemann, T., Kullak-Ublick, G.-K., Pietruck, B., von Bergmann, K.,
5 Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 40 Suppl. 1, S50-S63, (1991).
- 25) Mattson, F.H., Grundy, S.M., Crouse, J.R., Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man, *Am. J. Clin. Nutr.*, 35, 697-700, (1982).
- 26) Kesäniemi, Y.A., Ehnholm, C., Miettinen, T.A., Intestinal cholesterol
10 absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype, *J. Clin. Invest.*, 80, 578-581, (1987).
- 27) Kesäniemi, Y.A., Miettinen, T.A., Metabolic epidemiology of plasma cholesterol, *Ann. Clin. Res.*, 20, 26-31, (1988).
- 28) Ehnholm, C., et al., Apolipoprotein polymorphism in the Finnish population:
15 gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations, *J. Lipid. Res.* 27, 227-235, (1986).
- 29) Miettinen, T.A., Gylling, H., Vanhanen, H., Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E phenotype, *Lancet*, 2, 1261, (1988).
- 30) Gould, G., Absorbability of beta-sitosterol, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 2, 129,
20 (1955).
- 31) Gould, R.G., Jones, R.J., LeRoy, G.W., Wissler, R.W., Taylor, C.B., Absorbability of β -sitosterol in humans, *Metabolism*, 18, 652-662, (1969).
- 32) Salen, G., Ahrens, E.J., Grundy, S.M., Metabolism of β -sitosterol in man, *J. Clin. Invest.*, 49, 952-67, (1970).
- 25 33) Salen, G., Kwiterowich, P.O. Jr, Shefer, S., Tint, G.S., Horak, I., Shore, V., Dayal, B., Horak, E., Increased plasma cholestanol and 5α -saturated plant sterol derivatives in subjects with sitosterolemia and xanthomatosis, *J. Lipid Res.*, 26, 203-209, (1985).
- 34) Salen, G., Shore, V., Tint, G.S., Forte, T., Shefer, S., Horak, I., Horak, E.,
30 Dayal, B., Nguyen, L., Batta, A.K., Lindgren, F.T. and Kwiterowich, P.O., Jr.,

Increased sito-sterol absorption, decreased removal and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J. Lipid Res.*, 30, 1319-1330, (1989).

- 5 35) Miettinen, T.A. Phytosterolemia, xanthomatosis and premature atherosclerosis disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis, *Eur. J. Clin. Invest.*, 10, 27-35, (1980).
- 36) Nikkilä, K., Miettinen, T.A., Serum cholesterol precursors, cholestanol and plant sterols in PBC, *Scand. J. Gastroenterol.*, 23, 967-972, (1988).
- 10 37) Miettinen, T.A., Siurala, M., Bile salts, sterols, sterol esters, glycerides and fatty acids in micellar and oil phases of intestinal contents during fat digestion in man, *Z. Klin. Chem. Biochem.*, 9, 47-52, (1971).
- 38) Hassan, A.S., Rampone, A.J., Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β -sitostanol in the rat, *J. Lipid Res.*, 20, 646-653, (1979).
- 39) Kuksis, A., Beveridge, J.M.R., *J. Org. Chem.*, 25:1209, (1960).
- 15 40) Saroja, M., Kaimal, T.N.B., A convenient method of esterification of fatty acids. Preparation of alkyl esters, sterol esters, wax esters and triacylglycerols, *Synthetic communications*, 16, 1423-1430, (1986).
- 41) Prabhudesai, A.V., A simple method for the preparation of cholesteryl esters, *Lipids*, 12, 242-244, (1977).
- 20 42) Lentz, B.R., Barenholz, Y., Thompson, T.E., A simple method for the synthesis of cholesterol esters in high yield, *Chemistry and Physics of Lipids*, 15, 216-221, (1975).
- 43) Augustine, R.L. and Reardon Jr., E.J., The palladium catalyzed hydrogenation of cholesterol, *Organic preparations and procedures* 1(2), 107-109, (1969).
- 25 44) Sreenivasan, B., Interesterification of fats, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 55, 796-805, (1978).
- 45) Lo, Y.C. and Handel, A.P., Physical and chemical properties of randomly interesterified blends of soybean oil and tallow for use as margarine oils, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 60, 815-818, (1983)

46) Chobanov, D., Chobanova, R., Alterations in glyceride composition during interesterification of mixtures of sunflower oil with lard and tallow, J. Am. Oil Chemists' Soc., 54, 47-50 (1977).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä β -sitostanolirasvahappoesterin tai β -sitostanolirasvahappoesteriseoksen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että esteröidään vapaa β -sitostanoli rasvahappoesterillä tai rasvahappoesteriseoksella vaihtoesteröintikatalyytin läsnä
5 ollessa ja ilman liuotinta.
2. Menetelmä β -sitostanolirasvahappoesterin tai β -sitostanolirasvahappoesteriseoksen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että esteröidään vapaa β -sitostanoli rasvahappoesterillä tai rasvahappoesteriseoksella vaihtoesteröintikatalyytin läsnä
10 ollessa, jolloin esteröintireaktiossa ei käytetä muita aineita kuin vapaata stanolia, rasvahappoesteriä tai rasvahappoesteriseosta ja katalyyttiä.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vapaa β -sitostanoli esteröidään rasvahappoesterillä tai rasvahappoesteriseoksella, jonka seoksen rasvahapot sisältävät 2-22 hiiliatomia.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että
15 rasvahappoesteri tai rasvahappoesteriseos on metyyliirasvahappoesteri tai metyyliirasvahappoesteriseos.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että esteröinti suoritetaan noin 90–120 °C:ssa ja noin 0,67–2,0 kPa:n alipaineessa.

20 Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en β -sitostanolfettsyraester eller en β -sitostanolfettsyraesterblandning, **kännetecknat** av att fri β -sitostanol förestras med en fettsyraester eller en fettsyraesterblandning i närvaro av en omestringskatalysator och utan lösningsmedel.
- 25 2. Förfarande för framställning av en β -sitostanolfettsyraester eller en β -sitostanolfettsyraesterblandning, **kännetecknat** av att fri β -sitostanol förestras med en fettsyraester eller en fettsyraesterblandning i närvaro av en omestringskatalysator, varvid det i förestringsreaktionen icke används några andra substanser än fri stanol, en fettsyraester eller en fettsyraesterblandning och en katalysator.
30

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att den fria β -sitostanolen förestras med en fettsyraester eller en fettsyraesterblandning, varvid fettsyrorerna i blandningen innehåller 2-22 kolatomer.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, **kännetecknat** av att fettsyraestern eller fettsyraesterblandningen är en metylfettsyraester eller en metylfettsyraesterblandning.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att förestringen utförs vid ca. 90-120 °C och ett undertryck av ca. 0,67-2,0 kPa.