

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03807434.6

[51] Int. Cl.

C07J 9/00 (2006.01)

C11B 7/00 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100408592C

[22] 申请日 2003.1.30 [21] 申请号 03807434.6

[30] 优先权

[32] 2002.1.31 [33] IL [31] 147942

[86] 国际申请 PCT/IL2003/000081 2003.1.30

[87] 国际公布 WO2003/064444 英 2003.8.7

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.29

[73] 专利权人 酶学技术有限公司

地址 以色列米格达勒埃梅克

[72] 发明人 E·加科-戈兰 S·巴希尔

D·普拉特 G·本-德罗

O·法卡斯 E·霍塔姆

Z·戈德施米特

[56] 参考文献

CN 1171106A 1998.1.21

CN1258199A 2000.6.28

WO0175083A1 2001.10.11

WO0172136A1 2001.10.4

US5843499A 1998.12.1

US6326050B1 2001.12.4

审查员 王晓东

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 王景朝

权利要求书 5 页 说明书 20 页 附图 9 页

[54] 发明名称

油中植物甾醇酯的分馏

[57] 摘要

一种组合物，其含有溶解或分散于食用油和/或食用脂肪中的至少一种二酰甘油以及至少一种植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，并进一步可选择性地含有甘油一酯。植物甾醇酯可以是 β -谷甾醇酯，菜油甾醇酯，豆甾醇酯和菜子甾醇酯。植物甾烷醇酯可以是豆甾烷醇酯、菜油甾烷醇酯和谷甾烷醇酯。所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯优选是 C_{14} - C_{22} 、更优选为 C_{16} - C_{18} 的饱和或不饱和脂肪酸的酯类，特别是油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸。二酰甘油优选是 1,3-二脂肪酰基甘油。本发明也提供了一种制备组合物的方法，所述组合物富含三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸或主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。本发明也涉及含有本发明组合物的饮食增补剂和食品。

1. 一种饮食营养增补剂或营养品组合物, 其含有溶解或分散在食用油和/或食用脂肪中的至少一种二酰甘油以及至少一种植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述的至少一种植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的类型是预先确定的并且与所述食用油或食用脂肪相应。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其进一步含有甘油一酯。

4. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其含有溶解或分散在食用油和/或食用脂肪中的1-99wt%的二酰甘油以及1-99wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

5. 根据权利要求4所述的组合物, 其含有1-99wt%的二酰甘油, 1-99wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯, 以及1-99wt%的三酰甘油, 其中各组分含量之和为100%。

6. 根据权利要求4所述的组合物, 其含有1-99wt%的二酰甘油, 1-99wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯, 至多50wt%的甘油一酯以及1-99wt%的三酰甘油, 其中各组分含量之和为100%。

7. 根据权利要求4所述的组合物, 其含有3-50wt%的二酰甘油, 7-48wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯, 以及2-90wt%的三酰甘油。

8. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其中, 所述植物甾醇选自于 β -谷甾醇, 菜油甾醇, 豆甾醇和菜子甾醇。

9. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其中, 所述植物甾烷醇选自于豆甾醇、菜油甾烷醇和谷甾烷醇。

10. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其中, 所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯是 C_{14} - C_{22} 饱和或不饱和脂肪酸的酯类。

11. 根据权利要求10所述的组合物, 其中, 所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯是 C_{16} - C_{18} 饱和或不饱和脂肪酸的酯类。

12. 根据权利要求10所述的组合物, 其中, 所述脂肪酸选自于油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸。

13. 根据权利要求1-2任一项所述的组合物, 其中, 二酰甘油是

1, 3-二脂肪酰基甘油。

14. 根据权利要求 1-2 任一项所述的组合物, 其中, 食用油选自于亚麻子油, 油菜籽油, 玉米油, 橄榄油, 可可油, 米糠油, 大豆油, 棕榈油, 核油, 蓖麻油, 棉籽油, 椰子油, 花生油, 向日葵油, 鳄梨油, 红花油和鱼油。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物, 其中, 食用油是鱼油。

16. 根据权利要求 1-2 任一项所述的组合物, 其中, 食用脂肪选自于乳脂, 和动物脂肪。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物, 其中, 食用脂肪是猪油。

18. 一种饮食增补剂, 其含有权利要求 1-4 任一项所述的组合物。

19. 一种营养制品, 其含有权利要求 1-4 任一项所述的组合物。

20. 一种制备如权利要求 1-3 任一项所述组合物的方法, 所述方法包括以下步骤: 将油和/或脂肪中的植物甾醇和/或植物甾烷醇进行酯交换, 从而得到由油和/或脂肪中的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯和甘油二酯所组成的产物, 称为混合物 A, 其中, 所述产物包括两个明显不同的馏分: 油馏分, 含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯; 糊状馏分, 含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述油馏分包含 10 - 20% 重量的主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯, 所述糊状馏分包含 30 - 35% 重量的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法, 其中, 所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯为 $C_{14} - C_{22}$ 饱和或不饱和脂肪酸的酯类。

23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯为 $C_{16} - C_{18}$ 饱和或不饱和脂肪酸的酯类。

24. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 所述脂肪酸选自于油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸。

25. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法, 其中, 所述植物甾醇选自于 β -谷甾醇, 菜油甾醇, 豆甾醇和菜子甾醇, 所述植物甾烷醇选自于菜油甾烷醇和谷甾烷醇。

26. 一种产品的获得方法, 该产品含有植物甾醇和/或植物甾烷醇

与饱和或不饱和的脂肪酸的酯类，所述方法包括下述步骤：

(a) 对油和/或脂肪中的植物甾醇和/或植物甾烷醇进行酯交换，从而产生第一产物，称为混合物 A，所述第一产物包括两个明显不同的馏分，第一馏分是油馏分，其含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，第二馏分是糊状馏分，其含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯；和

(b) 对所述混合物 A 的两个馏分进行分离，从而得到第一产物，称为混合物 B，和第二产物，称为混合物 C，前者含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，后者含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中，混合物 A 的两个馏分的分离通过离心来实施。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的方法，其中，将混合物 B 中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的含量进一步富集，从而形成一种产物，称为混合物 B1，其含有至少 50 % 重量的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中，通过用己烷处理来富集所述混合物 B。

30. 根据权利要求 28 所述的方法，其中，用甲苯处理来富集所述混合物 B，从而获得含至少 98 % 重量的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的混合物，称为混合物 B2。

31. 根据权利要求 26 或 27 所述的方法，其中，将所述混合物 C 中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的含量进一步富集，从而形成一种产物，称为混合物 C1，其含有至少 25 % 重量的主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中，通过用丙酮处理来富集所述混合物 C。

33. 根据权利要求 31 所述的方法，其中，用甲苯处理来富集混合物 C，从而获得含至少 95 % 重量的主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的混合物，称为混合物 C2。

34. 一种混合物 B, 其由权利要求 26 或 27 的方法获得。
35. 一种混合物 B1, 其由权利要求 28 的方法获得。
36. 一种混合物 B2, 其由权利要求 30 的方法获得。
37. 一种混合物 C, 其由权利要求 26 或 27 的方法获得。
38. 一种混合物 C1, 其由权利要求 31 的方法获得。
39. 一种混合物 C2, 其由权利要求 33 的方法获得。
40. 权利要求 18 中定义的饮食增补剂, 其中所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯主要是不饱和脂肪酸的酯。
41. 权利要求 18 中定义的饮食增补剂, 其中所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯主要是饱和脂肪酸的酯。
42. 根据权利要求 40 或 41 所述的饮食增补剂, 其进一步含有甘油一酯。
43. 根据权利要求 40 或 41 所述的饮食增补剂, 其为剂量单位形式。
44. 根据权利要求 43 所述的饮食增补剂, 其为片剂或胶囊。
45. 根据权利要求 42 所述的饮食增补剂, 其为剂量单位形式。
46. 根据权利要求 45 所述的饮食增补剂, 其为片剂或胶囊。
47. 根据权利要求 40 或 41 所述的饮食增补剂, 其是下述任何一种: 低胆固醇黄油, 可可油, 脱水乳脂肪, 冰淇淋, 咖啡增白剂以及奶油, 乳制品。
48. 根据权利要求 47 所述的饮食增补剂, 其是下述任何一种: 干酪和其他含胆固醇食品。
49. 权利要求 19 中定义的营养制品, 其中所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯主要是不饱和脂肪酸的酯。
50. 权利要求 19 中定义的营养制品, 其中所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯主要是饱和脂肪酸的酯。
51. 根据权利要求 49 或 50 所述的营养制品, 其进一步含有甘油一酯。
52. 根据权利要求 49 或 50 所述的营养制品, 其为剂量单位形式。
53. 根据权利要求 52 所述的营养制品, 其为片剂或胶囊。
54. 根据权利要求 51 所述的营养制品, 其为剂量单位形式。
55. 根据权利要求 54 所述的营养制品, 其为片剂或胶囊。

56. 根据权利要求 49 或 50 所述的营养制品,其是下述任何一种:低胆固醇黄油,可可油,脱水乳脂肪,冰淇淋,咖啡增白剂以及奶油,乳制品。

57. 根据权利要求 56 所述的营养制品,其是下述任何一种:干酪和其他含胆固醇食品。

油中植物甾醇酯的分馏

发明领域

本发明涉及组合物，其含有溶解或分散于食用油和/或食用脂肪中的二酰甘油（DAG）——主要是 1,3-二酰甘油、植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯（PSE）以及选择性地含有甘油一酯，并涉及所述组合物的制备和各种用途，尤其是作为膳食营养素、食品增补剂和/或食品工业中的成分的用途。

更具体而言，本发明涉及使用固定化的、选择性地表面活性剂包衣的脂肪酶来对油中的植物甾醇和/或植物甾烷醇进行醇解、酯化和/或酯交换而得的产物。特别地，本发明涉及植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯在食用油和/或脂肪中的新混合物。这种混合物通常包括油馏分 and 糊状馏分，所述油馏分尤其含有二酰甘油和主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，糊状馏分含有二酰甘油和主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。本发明进一步提供了油或脂肪中富含甘油二酯与植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的多种新混合物，这些新混合物由本发明的混合物进一步分馏所得。本发明进一步涉及由所述分馏方法获得的高度纯化的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯和酯的混合物。

发明背景

术语“植物甾醇（phytosterols）”包括植物甾醇（plant sterols）和植物甾烷醇（plant stanols）。植物甾醇是天然存在的物质，其作为植物油微量成分而存在于食物。植物甾醇在植物中的作用与胆固醇在哺乳动物中的作用相似，比如形成细胞膜组织。在人类营养中，游离植物甾醇和游离植物甾烷醇都是有益的。

植物甾醇和植物甾醇酯现今被应用于 3 个主要工业类别中，即医药、化妆品和食品产品。在人类营养中，植物甾醇已表现出能降低血清胆固醇，从而降低心血管疾病（CVD）的风险【Pollak, O. J. (1953) Circulation, 7, 702-706】。由于植物甾醇是非脂溶性的，因此开发了用来生产脂溶性植物甾醇酯的酯化方法。可以获得的含有植物甾醇酯的普通食物主要是油，人造黄油和某些乳制品。许多其它当前

的食品含有植物甾醇酯，尤其是面食和巧克力产品，但是量很少。植物甾醇酯与营养产品的结合是具有重要意义的，为正常人群早期胆固醇血症的预防性治疗，以及在严重高胆固醇血症中结合他汀类药物（statins），为血清胆固醇降低的预防治疗提供了一种饮食选择。

甘油二酯（DAG）

甘油二酯的每个脂肪分子中仅含有 2 个脂肪酸，而不是 3 个。两个脂肪酸中大部分基本上位于脂肪分子的每一端（通常称为 1, 3 位）。在营养学中，具有该独特位置的脂肪酸的甘油二酯的组成差别是明显的。DAG 油同常规油一样被人体所消化。然而，由于 DAG 油上两个脂肪酸的起始位置，有一种消化成分是不同的。消化道不习惯用这种消化成分重组富脂微粒，这可通过在进食含有 DAG 油的餐后血液中富脂微粒数量低而反映出来。结果是，此消化成分在消化道中被完全分解。这种差别使得人体使用这部分的脂肪酸作为能量，而不是吸收后储备脂肪。而且，对于人类中 DAG 油的研究表明，在只需食用 20 克的 DAG 油后，就观察到血液中的富脂微粒与常规油相比出现了减少（Taguchi, H 等人, J Am Coll Nutr (2000 第 11-12 月) 19 (6): 789-96)。食用 DAG 油后富脂微粒的水平比起常规油在餐后富脂微粒的峰值水平要小约 50%。随着研究者了解餐后脂肪水平对血管健康的影响，DAG 油的这个方面甚至会更有益。在具有高、尤其是体重过重和体质指数（BMI）过大的人群中，长期食用 DAG 油可能影响体重和人体脂肪变化。初始研究表明，当每天食用 10-25 克的 DAG 油来代替常规油时，体重和体脂肪的下降可在更大程度上发生（Nagao, T., 等, J Nutr (2000) 130 (4): 792-7）。DAG 油已被日本政府批准用于与餐后血脂和体重相关的特定用途。另外，日本医生的一个专业联合会已经正式建议将 DAG 油作为健康饮食的一部分。在美国，专家组评论已普遍认为 DAG 油是安全的，并能作为烹饪油销售和推广。初始研究表明，在超重的成人美国个体中与日本个体中以相同的有益方式表现出体重和总脂肪量的变化（FASEB J (2001) 15 (4): A301）。

W001/32035 教导了基于橄榄油的产品，其特别是基于更高级别的橄榄油（如轻榨优质橄榄油），并含有植物甾烷醇酯和/或植物甾

醇酯。

美国专利 No. 5843499 公开了源自玉米纤维的油提取物，其含有阿魏酸酯（与阿魏酸酯化的植物甾醇酯），特别是谷甾烷基酯，其已经表现出具有降低胆固醇的功能。需指出的是，玉米纤维油【含有大约 73% 的脂肪（三酰甘油），8% 的甾醇（脂肪酰基）酯，4% 的游离甾醇，6% 的二酰甘油和 6% 的阿魏酸酯（甾醇酯）】已被作为用来降低胆固醇水平的增补食品的添加剂。

美国专利 No. 6326050 公开了一种组合物，其含有油或脂肪，溶解或分散在油或脂肪中的二酰甘油、游离植物甾醇和维生素 E。

上述出版物都没有公开在油和/或脂肪中植物甾醇酯和二酰甘油的结合。

而且，在先技术没有公开任何具有甘油二酯和植物甾醇酯或植物甾烷基醇酯的天然存在的油或脂肪的富集。

W001/75083 公开了一种在基于脂肪的产品中对游离甾醇（包括植物甾醇）选择性醇解或酯化（酯交换）的方法，其中使用了固定化、选择性地表面活性剂包衣的脂肪酶。反应在甘油三酯的存在下发生，所述甘油三酯包含在基于脂肪的产物中，选择性地可接着添加至少一种羧基脂肪酸或其酯衍生物。正如此出版物中定义的，“选择性醇解”指的是该方法引起了游离甾醇的醇解或酯化，但对于甘油三酯中甘油骨架上脂肪酰基的特性或位置分布而言，则不引起明显的改变，所述甘油三酯存在于油或脂肪基产物中，如乳脂。此出版物公开了由所公开方法而获得的改性乳脂组合物和低胆固醇食品制品，并进一步公开了就地获得的富含植物甾醇酯的脂肪基产品。然而，对于由所述选择性酯化反应获得的产品的组成和成分，W001/75083 并没有提供任何详细资料或者其物理特性，而对于所获二酰甘油与植物甾醇和/或植物甾烷基醇酯的结合物或者相应富集产物的改良用途，也没有教导或暗示所获产物的详细富集步骤。

鉴于上述内容，本发明的一个目的是提供一种可食性组合物，其由油和/或脂肪中的植物甾醇酯和/或植物甾烷基醇酯以及二酰甘油所组成，并可进一步选择性地含有甘油一酯。

本发明的另一个目的是将所述组合物作为饮食营养增补剂（食品添加剂）或作为营养品中的一种成分提供。

本发明的另一个目的是通过下述方式制备所述组合物:要么通过植物甾醇和/或植物甾烷醇的酶促酯交换反应,其中,包含于油和/或脂肪中的甘油三酯作为酰基供体;或者仅仅通过将植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯以及二酰甘油与油和/或脂肪混合。

本发明的另一个目的是提供一种油或脂肪中甘油二酯与植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的混合物,它可以进一步分馏用于下一步富集。

本发明的另一个目的是提供甘油二酯与饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的多种富集混合物。

本发明的另一个目的是提供甘油二酯与不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的多种富集混合物。

本发明的另一个目的是提供高度纯化的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

本发明的另一个目的是提供一种制备组合物的方法,所述组合物由油和/或脂肪中的预定组成的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯以及甘油二酯所组成。

随着说明进行,本发明的这些以及其他目的将变得显而易见。

发明概述

本发明涉及一种组合物,其含有溶解或分散于食用油和/或食用脂肪中的至少一种二酰甘油以及至少一种植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

本发明的组合物含有溶解或分散于食用油和/或食用脂肪中的 1-99wt% 的二酰甘油, 1-99wt% 植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯,并可进一步选择性地含有甘油一酯。

在具体实施方案中,本发明的组合物含有 1-99wt% 的二酰甘油, 1-99wt% 的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯, 0-50wt% 的甘油一酯以及 1-99% 的三酰甘油。更具体而言,本发明的组合物含有 3-50wt% 的二酰甘油, 7-48wt% 的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯,以及 2-90wt% 的三酰甘油。

植物甾醇酯可选自于 β -谷甾醇酯,菜油甾醇酯,豆甾醇酯和菜子甾醇酯。植物甾烷醇酯可选自于豆甾烷醇酯、菜油甾烷醇酯和谷甾烷醇酯。

在具体实施方案中，所述植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯是 C_{14} - C_{22} ，优选 C_{16} - C_{18} 的饱和或不饱和脂肪酸，特别是油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸的酯类。

二酰甘油优选是 1,3-二脂肪酰基甘油。

食用油基优选取自于亚麻子油，油菜籽油，玉米油，橄榄油，可可油，米糠油，大豆油，棕榈油，核油，蓖麻油，棉籽油，椰子油，花生油，向日葵油，鳄梨油，红花油和鱼油。

食用脂肪优选取自于乳脂，动物脂肪，特别是猪油。

在另一实施方案中，本发明涉及一种含有本发明所述组合物的膳食食品增补剂和营养制品。

在另一实施方案中，本发明提供了一种制备本发明组合物的方法，其包括以下步骤：将油和/或脂肪中的植物甾醇和/或植物甾烷醇进行酯化，从而得到由在油和/或脂肪中的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯所组成的产物（称为混合物 A），其中，所述产物包括两个明显不同的馏分：油馏分，含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯；糊状馏分，含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

在本发明的方法中，所述油馏分包含约 10 - 20% 重量的主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，所述糊状馏分包含约 30 - 35% 重量的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

本发明的方法中所采用的植物甾醇酯和植物甾烷醇酯为 C_{14} - C_{22} 、优选 C_{16} - C_{18} 的饱和或不饱和脂肪酸的酯类，特别是油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸。具体的植物甾醇选自于 β -谷甾醇，菜油甾醇，豆甾醇和菜子甾醇。具体的植物甾烷醇选自于菜油甾烷醇和谷甾烷醇。

在另一实施方案中，本发明涉及一种获得含有饱和或不饱和的脂肪酸的植物甾醇和/或植物甾烷醇的酯类的方法，所述方法包括下述步骤：(a) 对油和/或脂肪中的植物甾醇和/或植物甾烷醇进行酯化，从而产生第一产物（称为混合物 A）的步骤，所述第一产物包括两个明显不同的馏分，第一馏分是油馏分，其含有二酰甘油、三酰

甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，第二馏分是糊状馏分，其含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯；然后(b)对所述混合物A的两个馏分进行分离，从而得到第一产物(称为混合物B)和第二产物(称为混合物C)，前者含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，后者含有二酰甘油、三酰甘油以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

混合物A两个馏分的分离可通过离心分离来进行。

混合物B中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的含量可进一步富集，从而形成一种产物(称为混合物B1)，其含有至少50%重量的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。这样，可通过用己烷处理，或者用甲苯处理来富集混合物B，从而获得相当纯(至少98%重量)的主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯(称为混合物B2)。

所述混合物C中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的含量可进一步富集，直到形成一种产物(称为混合物C1)，其含有至少25%重量的主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。这样，可通过用丙酮处理，或者用甲苯处理来富集混合物C，从而获得纯(至少95%重量)的 mainly 是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯(称为混合物C2)。

本发明进一步涉及混合物B，混合物B1，混合物B2，混合物C，混合物C1，混合物C2，特别是由权利要求20和22的方法而获得的。

更进一步，本发明涉及一种膳食营养素、营养制品或食品增补剂，其含有二酰甘油，三酰甘油，以及主要是不饱和脂肪酸的和/或主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。所述膳食营养素、营养制品或食品增补剂可进一步含有甘油一酯。

本发明也涉及剂量单位形式的所述膳食营养素、营养制品和食品增补剂，优选为片剂或胶囊。

本发明所述的膳食营养素或营养制品可以是下述任何一种：低胆固醇黄油、可可油、脱水乳脂肪、冰淇淋、咖啡增白剂以及奶油、乳制品，特别是干酪和其他含胆固醇食品。

附图简述

根据优选实施方案的详细说明以及附图，将更清楚地理解本发明，其中：

图 1 表示的是混合物 B 的气相色谱图，所述混合物 B 通过对低芥酸菜籽油中的豆甾醇进行醇解而获得。

图 2 表示的是混合物 C 的气相色谱图，所述混合物 C 通过对低芥酸菜籽油中的豆甾醇进行醇解而获得。

图 3 表示的是 60℃ 下在向日葵油中对植物甾醇进行酯化后获得的混合物 A 的气相色谱图。

图 4 表示的是混合物 B 的气相色谱图，所述混合物 B 来自图 3 中的混合物 A。

图 5 表示的是混合物 C 的气相色谱图，所述混合物 C 来自图 3 中的混合物 A。

图 6 表示的是混合物 C1 的气相色谱图，所述混合物 C1 来自图 5 中的混合物 C。

图 7 表示的是混合物 C2 的气相色谱图，所述混合物 C2 来自图 5 中的混合物 C。

图 8 表示的是混合物 B1 的气相色谱图，所述混合物 B1 来自图 3 中的混合物 B。

图 9 表示的是混合物 B2 的气相色谱图，所述混合物 B2 来自图 3 中的混合物 B。

发明的详细说明

在寻求更为有益的食品增补剂中，本发明人惊奇地获得了一种油和/或脂肪基中的二酰甘油—主要是 1,3-二酰甘油 (DAG)，以及植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的组合物，这就是本发明的目的。虽然植物甾醇和甘油二酯的多种组合是公知的（例如，所述的 US6326050），但是，植物甾醇酯和二酰甘油的组合是新的，并出乎意料地发现相对于二酰甘油和游离植物甾醇，上述组合具有一些优点。因而，通过使用植物甾醇酯而不是常规的游离植物甾醇，在混合物中增加它们的浓度变得更为容易。此外，结晶型植物甾醇不会显著地溶解于消化道中的 micelli 相中，因此不能有效地抑制胆固醇的吸收。而且，油和脂肪只能在有限的程度上溶解游离甾醇。而只有溶解态的

甾醇才能抑制胆固醇的吸收。

因此，本发明的要点是一种基本上由溶解或分散于食用油和/或食用脂肪基中的二酰甘油以及植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯所组成的组合物。本发明的组合物可用作膳食营养素，食品增补剂和/或食品工业中的一种成分。

例如，可通过使用 W001/75083 中公开的选择性醇解或酯化或酯交换的方法，来获得本发明的组合物。现已发现，可通过 W001/75083 中公开的选择性植物甾醇酯化或类似方法而获得的油产物由两个馏分组成，每一馏分都含有甘油二酯和不同类型的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。更具体而言，选择性醇解或酯交换的产物是由两个馏分（油和糊）构成的混合物，其中，饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯基本上包含于一馏分中，而不饱和脂肪酸的酯基本上包含于另一馏分中。

因此，本发明进一步提供了一种制备所述组合物的方法，所述方法包括油和/或脂肪中的植物甾醇和/或植物甾烷醇的酯化步骤，从而生产出一种在所述油和/或脂肪中含有植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯以及甘油二酯的产物（称为混合物 A）。这种产物具有两个明显不同的馏分（层），也就是一个油馏分，其含有甘油二酯、甘油三酯以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，和一个糊状馏分（膏），其含有甘油二酯、甘油三酯以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。将这两个馏分相分离，从而得到一种产物（称为混合物 B），其含有甘油二酯、甘油三酯以及主要是饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯，和另一种产物（称为混合物 C），其含有甘油二酯、甘油三酯以及主要是不饱和脂肪酸的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

此外根据本发明，混合物 B 和 C 中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的含量可选择性地进一步富集。重要的是，本发明能对任何具有甾醇酯和二酰甘油的天然存在的油进行富集。

可用包含于每一层中的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的进一步富集步骤来处理所述混合物 B 和 C。

在另一实施方案中，本发明的分馏方法包括所述混合物 A 的富集步骤，从而获得如下的多种新混合物：

(i) 一种糊(此处称为混合物B),其含有大约3-50wt%的甘油二酯,以及大约7-48wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯,上述酯主要由饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯;

(ii) 一种油(此处称为混合物C),其含有大约3-50wt%的甘油二酯,以及大约7-48wt%的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯,上述酯主要由不饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的不饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的不饱和脂肪酸酯;

(iii) 一种固体(此处称为混合物B1),其含有大约60wt%的植物甾醇酯,上述酯主要由饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯;

(iv) 一种糊(此处称为混合物C1),其含有大约30-35wt%的植物甾醇酯,上述酯主要由不饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯;

(v) 高度纯化的植物甾醇酯(此处称为混合物B2),其主要由饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯;

(vi) 高度纯化的植物甾醇酯(此处称为混合物C2),其主要由不饱和脂肪酸酯组成,并优选 $C_{14}-C_{22}$ 的饱和脂肪酸酯、特别是 $C_{16}-C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯;

这些植物甾醇酯的不同混合物具有广泛应用,例如,在食品工业,既可作为最终产品、比如膳食营养素,也可作为营养制品中的功能性成分以及作为食品增补剂。

如上所述,本发明的混合物也可由以下方式制备:在食用油和/或脂肪中对甘油二酯和植物甾醇酯或植物甾烷醇酯进行简单混合。因此,本发明进一步提供了甘油二酯和植物甾醇酯或植物甾烷醇酯在食用油和/或脂肪中的多种混合物。根据本发明,这些混合物可含有1-99wt%的植物甾醇酯或植物甾烷醇酯,1-99wt%的甘油二酯,0-50wt%的甘油一酯,优选含有3-50wt%的甘油二酯和7-48wt%的植物甾醇酯或植物甾烷醇酯。

制备一种组合物,且所述组合物中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯的类型是预先确定的,这种能力是至关重要的。更具体而言,根

据本发明，可制备出一种组合物，通过在酯化处理中往特定油和/或脂肪中加入所需的植物甾醇和/或植物甾烷醇，从而所述组合物中植物甾醇酯和/或植物甾烷醇得以预先确定。在酯化处理后，油和糊状馏分的分离产生了一种主要由含有不饱和脂肪酸残基的所需植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯所组成的组合物，和/或一种主要由含有饱和脂肪酸残基的所需植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯所组成的组合物。油和/或脂肪中的甘油三酯可作为植物甾醇和/或植物甾烷醇酯化处理中脂肪酰基的内部来源。可供选择的或另外的，游离脂肪酸和/或其衍生物可作为酰基的外部来源。

本发明的纯化和富集处理也可提供高度纯化的植物甾醇酯和/或植物甾烷醇酯。

本发明的组合物和营养素可以以剂量单位形式配制。例如，口服剂量形式可以是片剂或胶囊。用于口服的每一剂量单位可含有推荐每日量的本发明的混合物，或者其部分或倍量。所述推荐剂量单位通常由主治医生或营养学家决定，并取决于预期消费者的年龄、性别、体重和一般状况。

对于片剂的制备，可使用任何通常用来制备固体制剂的药用载体，例如，硬脂酸镁、淀粉、石膏粉、滑石、明胶、阿拉伯胶、硬脂酸、乳糖和蔗糖。对于胶囊的制备，任何常规的封装都是合适的，例如，在硬的明胶胶囊壳中使用所述载体。也可使用任何通常用于制备分散液或悬浮液的药用载体来制备软明胶壳胶囊，比如含水树脂、纤维素、硅酸盐或油，所述载体能并入软明胶胶囊壳中。

须指出的是，此处说明中术语甘油二酯和二酰甘油是相互交换使用的，术语相和馏分，以及糊、糊状和膏亦是如此。

如所公开的和表述的，须理解的是，本发明不限于此中公开的具体实施例，处理步骤和材料，因为这些处理步骤和材料在一定程度上可作变化。也应理解，此中所用的术语仅仅是出于表述具体实施方案的目的而使用的，而并非用来限定，因为本发明的范围只限定于所附权利要求及其等同范围。

贯穿本说明书以及其后的权利要求书中，除非上下文另外指明，否则词语“含有（包括）”以及变体应被理解为意指一定整体或步骤的、或者整体或步骤之集合的内含部分，但是并不排除任何其他的

整体或步骤、或者整体或步骤的集合。

下述实施例是本发明人在实施本发明的各个方面时所采用的具有代表性的工艺。应注意的是，虽然这些工艺是用来实施本发明的优选技术方案的实例，但本领域技术人员依据本公开文本，能认识到在不脱离本发明范围的情况下，可作出大量的改变。

实施例

方法

(1) 产物：混合物 A 和馏分 B 和 C 的制备

混合物 A 定义为由下述方法获得的混合物：在油中，在游离脂肪酸和/或相应单、二、三甘油酯的存在下，对植物甾醇和/或植物甾烷醇进行直接酯化和/或醇解+酯交换。例如：

反应是分批进行的。将表面活性剂包衣的固定化脂肪酶和植物甾醇或植物甾烷醇加入油或脂肪中。典型的混合物包含：相对于 1 份催化剂，油为 1-10 份；相对于 1 份植物甾醇（或植物甾烷醇），油为 1-10 份。然后，对该反应混合物进行混合，并在 5-96 小时、优选 10-48 小时加热到 35-70℃、优选 50-60℃。植物甾醇或植物甾烷醇成为植物甾醇酯或植物甾烷醇酯的转化由气相色谱法测定。分批取出反应混合物的称重样品（没有催化剂），并用正己烷或甲苯稀释到 20-60mg/ml 的浓度，然后根据下面所述的方法直接注入 GC。定量测定游离植物甾醇或植物甾烷醇的浓度（根据校正曲线），然后相对于起始浓度的植物甾醇，计算出转化率。通常在转化率为 70-100%，典型地为 85-95% 时，终止反应。

因此，混合物 A 含有植物甾醇酯和未经酯化的残留的游离植物甾醇。

此外，由植物甾醇和天然脂肪或油反应而得的混合物 A，会含有甘油二酯、甘油一酯和一定浓度的游离脂肪酸。通过脂肪酸从甘油三酯中“捐献”到植物甾醇酯，可取得甘油二酯和甘油一酯的富集。

在反应的最后，在反应温度下通过热过滤将催化剂从油中除去。待冷却到室温或以下，所获得的混合物 A 形成了具有两个明显不同、并且分离的相（也称为馏分）的固、液浆：

混合物 B：糊状相；和

混合物 C：油相。

由于所含植物甾醇酯的类型,此两个相是截然不同的。油相(馏分C)富含不饱和脂肪酸的酯,比如,油酸、亚油酸和亚麻酸,而膏相(馏分B)富含饱和脂肪酸的酯,比如,棕榈酸和硬脂酸的酯。

将混合物A分为馏分B和馏分C可通过下述方式来实现:在3000-14000g和10-25℃下将混合物A离心分离5-60分钟,优选10-30分钟。

所获馏分B是糊状形式的底部相,而所获馏分C是顶部相的清油。

馏分C在室温下放置1-10天可导致出现另外的糊残渣沉淀,并导致油清澈度的丧失。可通过二次离心或过滤来获得清澈的形态。

图3表示的是混合物A的气相色谱图,所述混合物来自木植物甾醇和向日葵油在60℃下的反应。该混合物含有来源于向日葵油的植物甾醇酯(16%重量)(从16.136-15.413分钟的6个主峰),油中的甘油三酯(17.083和16.707),甘油二酯(12.642),植物甾醇(3个主峰,从11.663-11.182),和游离脂肪酸(9.586, 8.686, 6.69)。

图4表示的是混合物B的气相色谱图。该混合物含有饱和脂肪酸的植物甾醇酯(15.966, 15.751, 15.361),小部分不饱和脂肪酸的植物甾醇酯(16.335, 16.159, 16.044)来自油的甘油三酯(16.904, 17.26),甘油二酯(12.348),植物甾醇(11.861, 11.580, 11.215),和少量游离脂肪酸。在该混合物中甾醇酯的总量为31%(w/w)。

图5表示的是混合物C的气相色谱图。该混合物含有不饱和脂肪酸的植物甾醇酯(16.009, 15.825, 15.686),来自油的甘油三酯(16.981, 16.597),甘油二酯(12.506),植物甾醇(11.526, 11.242, 11.043),和少量游离脂肪酸。在该混合物中甾醇酯的总量为15%(w/w)。

天然油和脂肪的实例是植物油(亚麻子油,油菜籽油,玉米油,橄榄油,可可油,米糠油,大豆油,棕榈油,核油,蓖麻油,棉籽油,椰子油,花生油,向日葵油等),动物油(乳脂,鱼油等)。

植物甾醇和植物甾烷醇的实例是 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇,以及豆甾烷醇、菜油甾烷醇和谷甾烷醇。

(2) 气相色谱法

可通过装备有火焰电离检测器的气相色谱仪 HP-5890 来测定植物甾醇、植物甾烷醇、植物甾醇酯、植物甾烷醇酯、脂肪酸和甘油三酯的浓度。在下述分离条件下使用毛细柱 Quardex 400-1HT: 注射器和检测器温度保持在 350℃, 初始柱温为 160℃, 接着是 2 分钟的等温线, 然后烘箱温度以 5℃/分钟的速度上升至 180℃; 之后, 烘箱温度以 20℃/分钟的速度上升至 400℃, 接着是 10 分钟的等温线。

(3) 混合物 B 和混合物 C 分离的进一步理解

为了进一步了解 B 和 C 混合物的分离, 用脂肪酸组成不同的不同类型的油来实施反应。对于每一油源, 实施上面所述的反应, 并将馏分 B、C 分馏和称重。

表 1 表示的是在不同油中油馏分 (B) 和膏馏分 (C) 的重量百分比, 上述物质由与来自大豆的植物甾醇进行酯化反应而获得。反应在振动恒温箱中 50℃ 下进行 24 小时, 植物甾醇: 油的重量比为 1:9, 催化剂: 油的重量比为 1:5。

表 1

由不同植物油中大豆植物甾醇的酯化反应而
获得的馏分 B(膏)和馏分 C(油)的质量分数

反应中所用油的类型	食用油中的饱和脂肪酸 (% w/w)	油相 (混合物 C) 的质量分数 (% w/w)	膏相 (混合物 B) 的质量分数 (% w/w)
纯三油酸甘油酯*	0	100	0
鱼油**	1	100	0
低芥酸菜籽油***	9.2	93	7
向日葵***	11.0	91.5	8.5
大豆***	15.8	80	20
橄榄****	19.8	76	24

*标准三油酸甘油酯纯度 >99% -σ

**Epax 2050-“Pronova”

***经工业精炼的来源

****上等轻榨优质橄榄油

从表 1 中可清楚看到，膏相（混合物 B）的质量分数随着脂肪酸源一本情况中为油一中饱和脂肪酸比例的上升而上升。

此外，进一步分析混合物 A 以及馏分 B 和 C，从而来评价植物甾醇酯分子中脂肪酸组成的差别。

通过玻璃柱层析法可实现植物甾醇酯从混合物的纯化，所述层析法使用 Merck 硅胶 60（0.04 - 0.063 μ m）并以石油醚：醚混合物（2 - 10% 的醚）作为溶剂。在该分离系统中，植物甾醇酯首先洗脱出，并容易纯化。

合并含有植物甾醇酯的馏分，并通过应用 AOC 方法 Ce-2-66 将纯植物甾醇酯馏分中的脂肪酸转化为甲酯。用内标法通过毛细管气相色谱法完成甲酯的分离和定量。

表 2 表示的是根据馏分结果，所选植物油的脂肪酸组成。

表 3 - 5 表示的是由不同类型油反应而获得的混合物 A、B 和 C 混合物的脂肪酸组成。

SFA 指饱和脂肪酸，MUFA 指单不饱和脂肪酸，PUFA 指多不饱和脂肪酸。反应条件与表 1 所述的相似。

表 2
植物油源的脂肪酸含量

油的类型	油中脂肪酸组成		
	SFA wt%	MUFA wt%	PUFA wt%
橄榄油	20	69.5	10.5
低芥酸菜籽油	9	55	36
大豆油	16	23.5	60.5
向日葵油	11	27.5	61.5

表 3
在混合物 A 中获得的植物甾醇酯的脂肪酸含量

油的类型	植物甾醇酯的脂肪酸组成		
	SFA Wt %	MUFA Wt %	PUFA Wt %

橄榄油	17	64	19
大豆油	11	25	64

表 4

在混合物 B(膏相)中获得的植物甾醇酯的脂肪酸含量

油的类型	植物甾醇酯的脂肪酸组成		
	SFA Wt %	MUFA Wt %	PUFA Wt %
橄榄油	32	53	15
低芥酸菜籽油	30	45	26
大豆油	41	17	42
向日葵油	43	17	40

表 5

在混合物 C(油-液相)中获得的植物甾醇酯的脂肪酸含量

油的类型	植物甾醇酯的脂肪酸组成		
	SFA Wt %	MUFA Wt %	PUFA Wt %
橄榄油	6	73	21
低芥酸菜籽油	4	59	37
大豆油	5	26	69
向日葵油	4	25	67

表 2-5 中的数据说明了下述内容:

1. 比较表 2 和 3, 可看出, 植物甾醇酯中饱和与不饱和脂肪酸的比例取决于在反应中所用油中脂肪酸的组成。换句话说, 可以说混合物 A(表 3)中 $(\text{MUFA} + \text{PUFA}) / \text{SFA}$ 的值与天然油(表 2)中同样的比值十分相似。

2. 比较表 4 和 5 可得出如下结论: 使包含于混合物 B(膏)和 C(油)中的植物甾醇酯具有区别的主要特征是脂肪酸组成。更具体而言, 酯化反应导致饱和脂肪酸植物甾醇酯在馏分 B 中富集, 而不饱和脂肪酸植物甾醇酯在馏分 C 中富集。甾醇酯的这种分馏能形成两

个截然不同的相。

3. 从表 5 中可看出, 无论油来源中的不饱和脂肪酸成分如何, 油相 (馏分 C) 均包含超过 94 % 的不饱和脂肪酸植物甾醇酯。

4. 馏分 B (膏) 和馏分 C (液体) 在物理形态上的差别可解释为在膏相中饱和脂肪酸植物甾醇酯的浓度相对较高, 这使得膏具有更高的熔点。

(4) 混合物 A、B 和 C 的进一步富集

4.1. 通过分子蒸馏将具有植物甾醇酯和甘油二酯的馏分 A 富集

具有甘油二酯和植物甾醇酯的反应产物的进一步富集可通过引入分子蒸馏来获得。三种主要成分根据其分子量依次被蒸馏出: 首先是甘油二酯, 其次是植物甾醇酯, 然后是甘油三酯。因此, 不同原料流组成和蒸馏条件可得到预知的甘油二酯和植物甾醇酯富集的馏出物和甘油三酯富集的残余物。蒸馏条件为 0.001 - 0.01mbar, 优选 0.001 - 0.005mbar, 和 200 - 300℃, 优选 220 - 280℃, 这种条件能蒸馏出 2 种较轻的成分: 甘油二酯和植物甾醇酯。

4.2 通过结晶作用将具有植物甾醇酯的馏分 B 和 C 富集

与产物中的其他成分相比, 植物甾醇酯具有相对较低的溶解度和较高的熔点, 因而将馏分溶解于各种有机溶剂中, 接着进行冷却, 这将导致植物甾醇酯的选择性结晶。这种方法能提高植物甾醇酯的浓度。

可使用的有机溶剂是己烷、甲苯、丙酮、乙醇、甲醇以及其他。

实施例 1: 低芥酸菜籽油中豆甾醇的脂肪酶催化的醇解

1. 1 酶促反应

低芥酸菜籽油中豆甾醇到豆甾醇酯的脂肪酶催化转化在下列反应条件下进行:

将 9g 根据 W001/75083 获得的脂肪酶制剂加入 50ml 富集 4gr 豆甾醇的低芥酸菜籽油中。然后, 将反应混合物加热到 60℃, 保持 14 小时。此后, 取出样品, 用正己烷 (30μl 反应混合物/600μl 正己烷) 稀释, 然后如上所述注入气相色谱系统。根据 GC 测定未反应豆甾醇的浓度, 并计算转化率, 得到的值为 94 %。

1. 2 反应产物的分离

在反应的最后, 过滤掉酶, 并将混合物冷却到 25℃, 然后静置

12 小时。

所获混合物（此中称之为混合物 A）具有两个截然不同的分离相/馏分：一个油相/馏分和一个膏（糊状）相/馏分。

在 8000 x rpm、15℃下将混合物 A 离心分离 15 分钟，从而获得混合物 B 和 C。

图 1 和 2 显示了这两个单独馏分的气相色谱分析。

图 1 表示的是由低芥酸菜籽油中豆甾醇的醇解而获得的混合物 B 的气相色谱图。该混合物含有棕榈酸豆甾醇酯（经化学合成类似标准证实）（16.5 分钟），来源于低芥酸菜籽油的甘油三酯（19.35 - 18.12 分钟），甘油二酯（14.37 分钟），豆甾醇（10.73 分钟），甘油一酯（11.42 分钟）和游离脂肪酸（8.72 - 6.54 分钟）。

图 2 表示的是由低芥酸菜籽油中豆甾醇的醇解而获得的混合物 C 的气相色谱图。该混合物含有油酸豆甾醇酯（经化学合成类似标准证实）（15.96 分钟），棕榈酸豆甾醇酯（16.56 分钟），来源于油的甘油三酯（19.42 - 18.17 分钟），甘油二酯（14.38 分钟），豆甾醇（10.76 分钟），甘油一酯（11.45 分钟）和游离脂肪酸（8.75 - 6.57 分钟）。

实施例 2：来自大豆的植物甾醇在橄榄油中的脂肪酶催化醇解

2.1 酶促反应

在 1 升玻璃搅拌反应器中，将 100g 根据 WO 01/75083 获得的脂肪酶制剂和 120g 来自大豆的植物甾醇（含有 0.3 - 4%的菜子甾醇，20 - 30%的菜油甾醇，11 - 20%的豆甾醇，>40%的 β 谷甾醇）加入 450g 上等轻榨优质橄榄油。然后将该反应混合物加热到 50℃，并搅拌 24 小时。反应的转化率为 93%。在 50℃下通过过滤将催化剂分离。将过滤出的催化剂加入 450g 上等轻榨优质橄榄油与 120g 未反应植物甾醇的新混合物中。在 24 小时后第二批也达到了 93%的转化率。重复催化剂的过滤，并将 566g 产物（混合物 A）在室温下静置 20 小时。

在 7500xg，25℃下将混合物 A 离心分离 15 分钟，从而获得混合物 B 和 C。

混合物 B 为膏馏分，重 164 克，而混合物 C 为油馏分，重 402 克。

混合物 A 的组成为：16.3%的甘油二酯，6.18%的甘油一酯，30.5%

的植物甾醇酯和 5% 的游离脂肪酸以及余量的甘油三酯。

如上面所述, 测定馏分 B 和 C 中植物甾醇酯的脂肪酸组成。结果见表 6。

表 6
植物甾醇酯的脂肪酸组成

脂肪酸	油中的% (馏分 C)	膏中的% (馏分 B)
C16	3.0	29.9
C16:1	1.8	1.2
C18	1.2	2.0
C18:1	71.5	51.7
C18:2	20.9	14.1
C18:3	1.4	0.9
C20	0.2	0.1

实施例 3: 通过分子蒸馏将植物甾醇酯和甘油二酯进一步富集。

从低芥酸菜籽油源中获得的一种反应混合物, 其含有: 13wt% 的植物甾醇酯, 20wt% 重量的甘油二酯, 0.1-1wt% 的游离植物甾醇和 5wt% 游离脂肪酸, 将该反应混合物加入分子蒸馏器 (由玻璃制造, 直径为 2 英寸, 实验室设备)。在 180-200℃、0.01-0.001mbar 的条件下实施一级馏出, 从而除去游离植物甾醇和游离脂肪酸。将一级馏出的残留物在不同条件下再次加入, 从而得到如表 7 和 8 所示的多种蒸馏组合物。PSE 指植物甾醇酯。

表 7
馏出物质量和在馏分中植物甾醇酯产率
(0.001-0.005mbar 以及不同温度下)

温度 (℃)	馏出物质量/原料质量	馏出物中 PSE 质量/ 原料中 PSE 质量
235	0.17	0.40
240	0.23	0.58

250	0. 28	0. 62
265	0. 53	0. 95

为获得馏出物相中 90%以上的植物甾醇酯，必要的条件是：260 - 265℃和 0.001 - 0.005mbar。

表 8

蒸馏中获得的馏出物组成 (0.001 - 0.005mbar 以及不同温度下)

温度 (℃)	馏出物组成		
	植物甾醇酯 wt%	甘油三酯 wt%	甘油二酯 wt%
235	27	22	51
240	32	28	40
250	32	25	43
265	27	52	21

在原料余量和从 GC 中获得的相对集合面积的基础上，完成计算。

实施例 4: 通过溶剂结晶作用将馏分 B 和 C 中植物甾醇酯进一步富集

(i) 为富集混合物 C 中植物甾醇酯含量，将 100ml 丙酮加入 10ml 由上面所表述实施例 2 获得的混合物 C 中。将所得混合物冷却到 -20℃，并保持 12 小时。在此期间，从油混合物中沉淀下一种白色的固体沉淀。该固体沉淀 (25g) 用冷过滤方法过滤出，然后用冷的丙酮冲洗几次。

图 6 表示的是混合物 C1 的气相色谱图。该混合物含有不饱和脂肪酸的植物甾醇酯 (16.247, 16.067, 15.934)，来源于油的甘油三酯 (17.119, 16.814)，甘油二酯，植物甾醇 (11.764, 11.486, 11.291)，和少量游离脂肪酸。该混合物中甾醇酯的总量为 30% (w/w)。

(ii) 为进一步富集混合物 C 中植物甾醇酯含量，将 50ml 甲苯加入由上面所述在温热下获得的 20g 固体混合物 C 中。将所得混合物冷却到 -20℃，并保持 12 小时。在此期间，从溶液中沉淀下一种

白色的固体沉淀(混合物 C2)。该固体沉淀(4g)用冷过滤方法过滤出,然后用冷的甲苯冲洗几次。

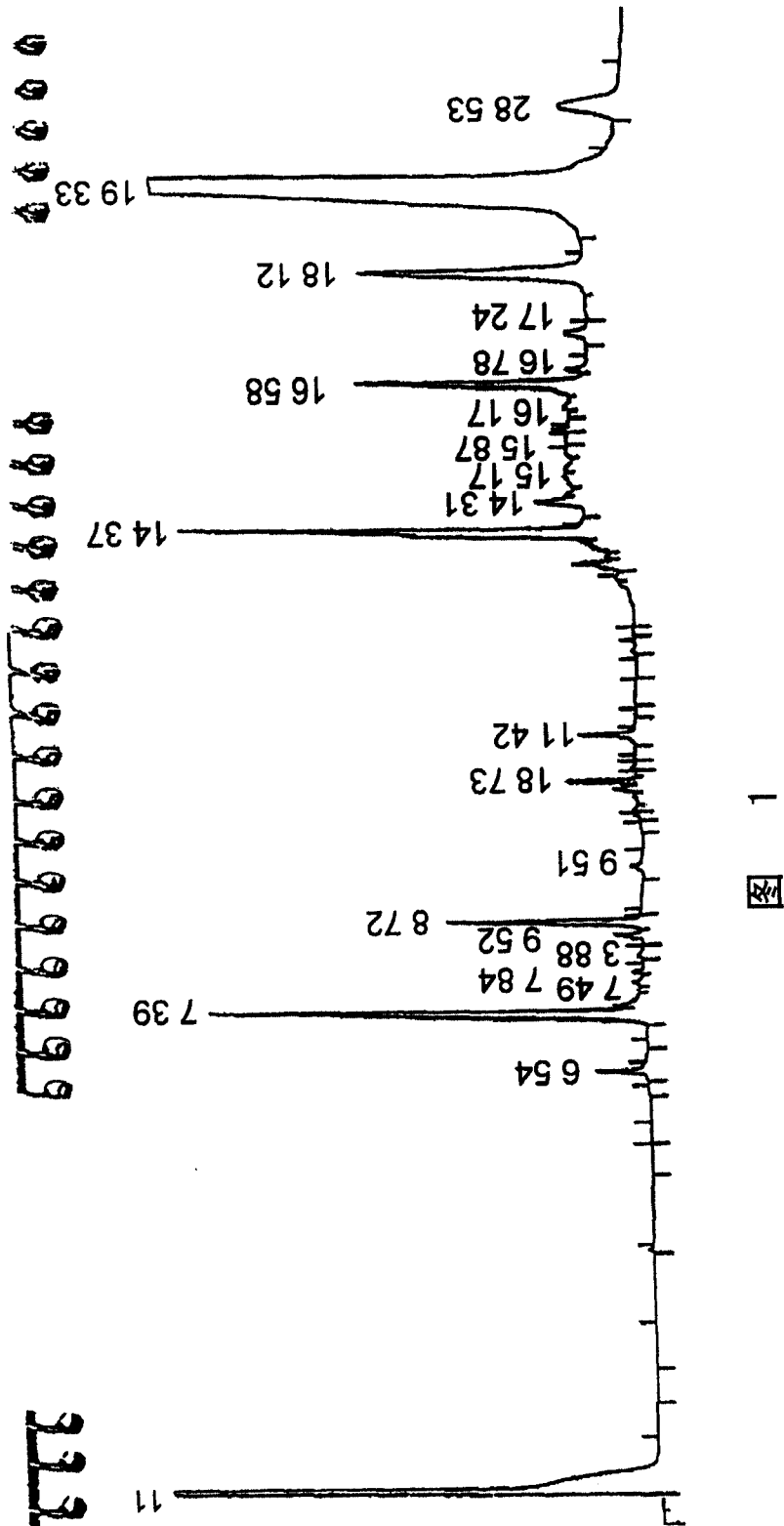
图 7 表示的是混合物 C2 的气相色谱图。该混合物含有不饱和脂肪酸的植物甾醇酯(16.319, 16.125, 15.981),植物甾醇(11.151, 10.850, 10.640),甘油二酯(13.24, 13.01)。该混合物中甾醇酯的总量大于 90% (w/w)。

(i) 为富集混合物 B 中植物甾醇酯含量,将 100ml 己烷加入由实施例 2 所述而获得的 90g 混合物 B 中。将所得混合物冷却到-20℃,并保持 12 小时。在此期间,从溶液中沉淀下一种白色的固体沉淀(混合物 B1)。该固体沉淀(35g)用冷过滤方法过滤出,然后用冷的己烷冲洗几次。

图 8 表示的是混合物 B1 的气相色谱图。该混合物主要含有饱和脂肪酸的植物甾醇酯(15.941, 15.752, 15.612),小量的不饱和脂肪酸的植物甾醇酯(16.335, 16.159, 16.031),来源于油的甘油三酯(17.196, 16.870),甘油二酯,植物甾醇(11.830, 11.553, 11.190),甘油二酯(14.39, 13.97)和少量游离脂肪酸。该混合物中甾醇酯的总量为 50% (w/w)。

(ii) 为进一步富集混合物 B 中植物甾醇酯含量,将 50ml 甲苯加入由实施例 2 中所述在温热下获得的 20g 固体混合物 B 中。将所得混合物冷却到-20℃,并保持 12 小时。在此期间,从溶液中沉淀下一种白色的固体沉淀(混合物 B2)。该固体沉淀(5g)用冷过滤方法过滤出,然后用冷的甲苯冲洗几次。

图 9 表示的是混合物 B2 的气相色谱图。该混合物主要含有饱和脂肪酸的植物甾醇酯(15.371, 15.184, 15.047),较少量不饱和脂肪酸的植物甾醇酯(15.761, 15.588, 15.461),植物甾醇(10.615, 10.310, 10.096)。该混合物中甾醇酯的总量大于 95% (w/w)。



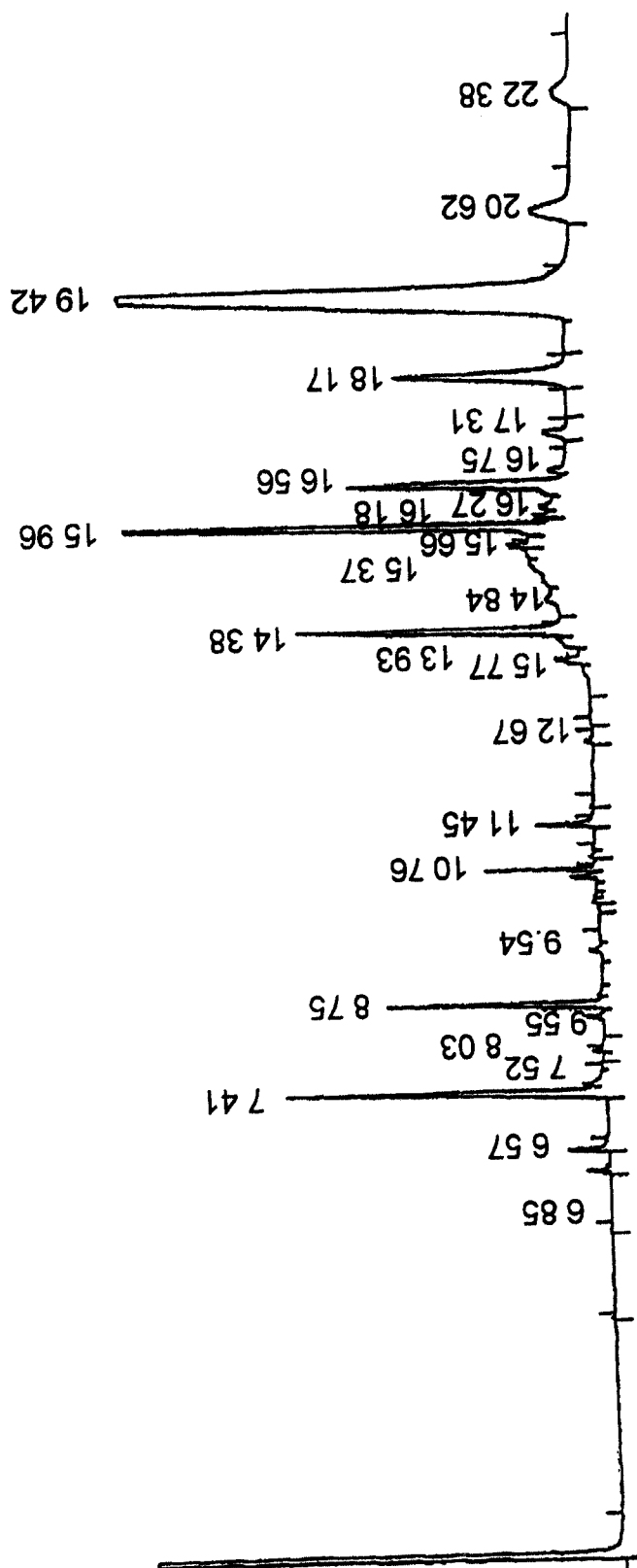


图 2

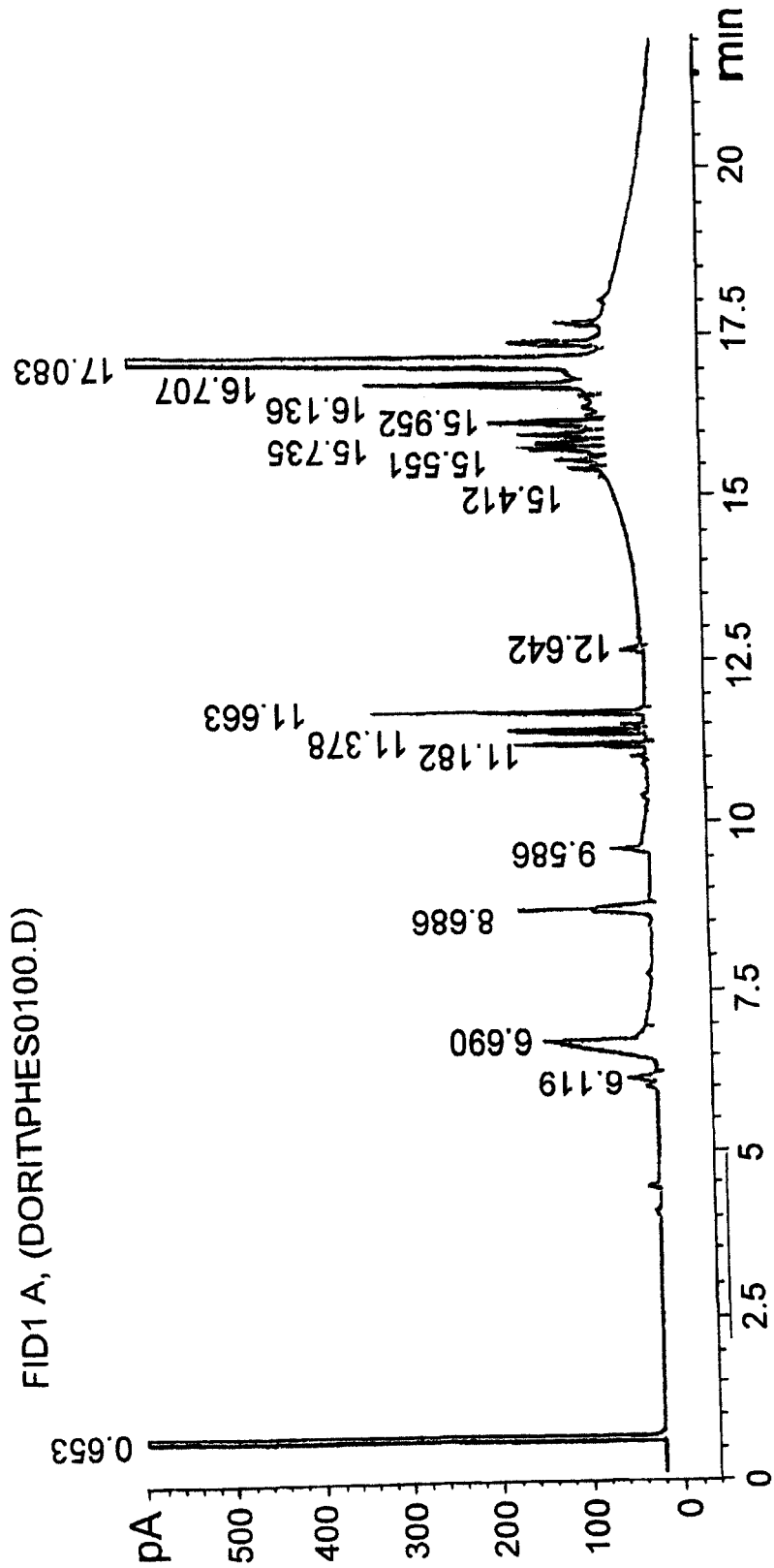


图 3

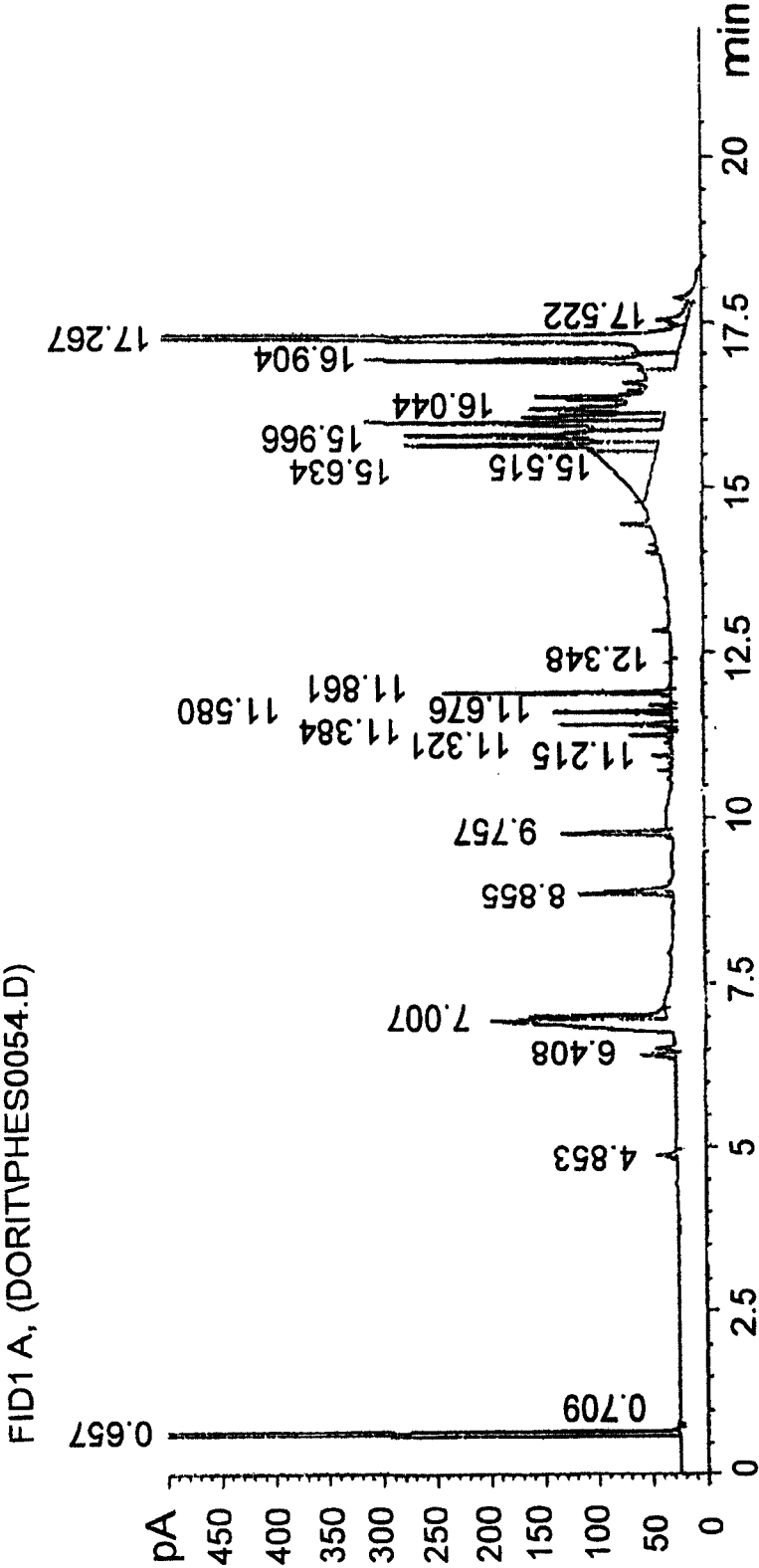


图 4

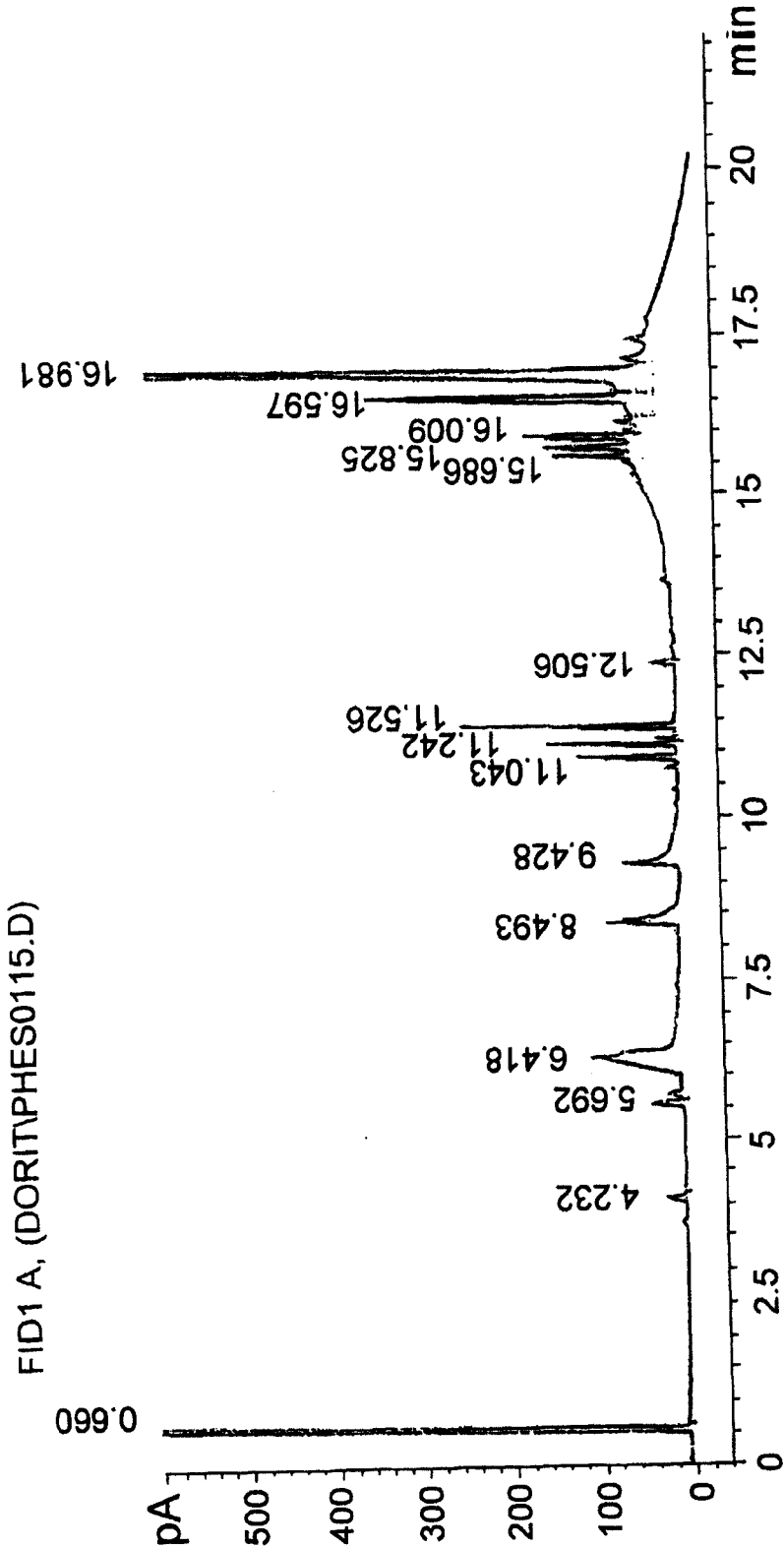


图 5

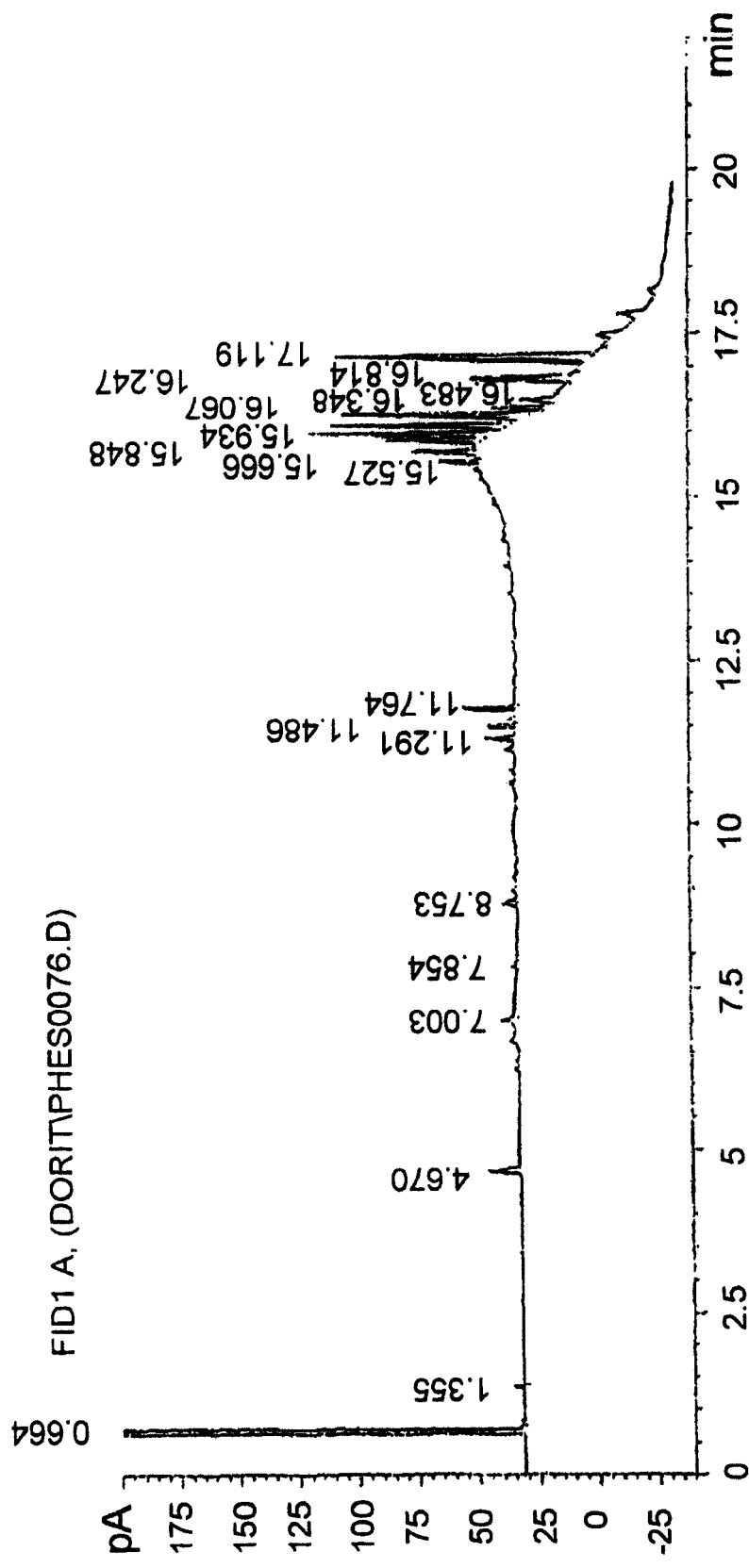


图 6

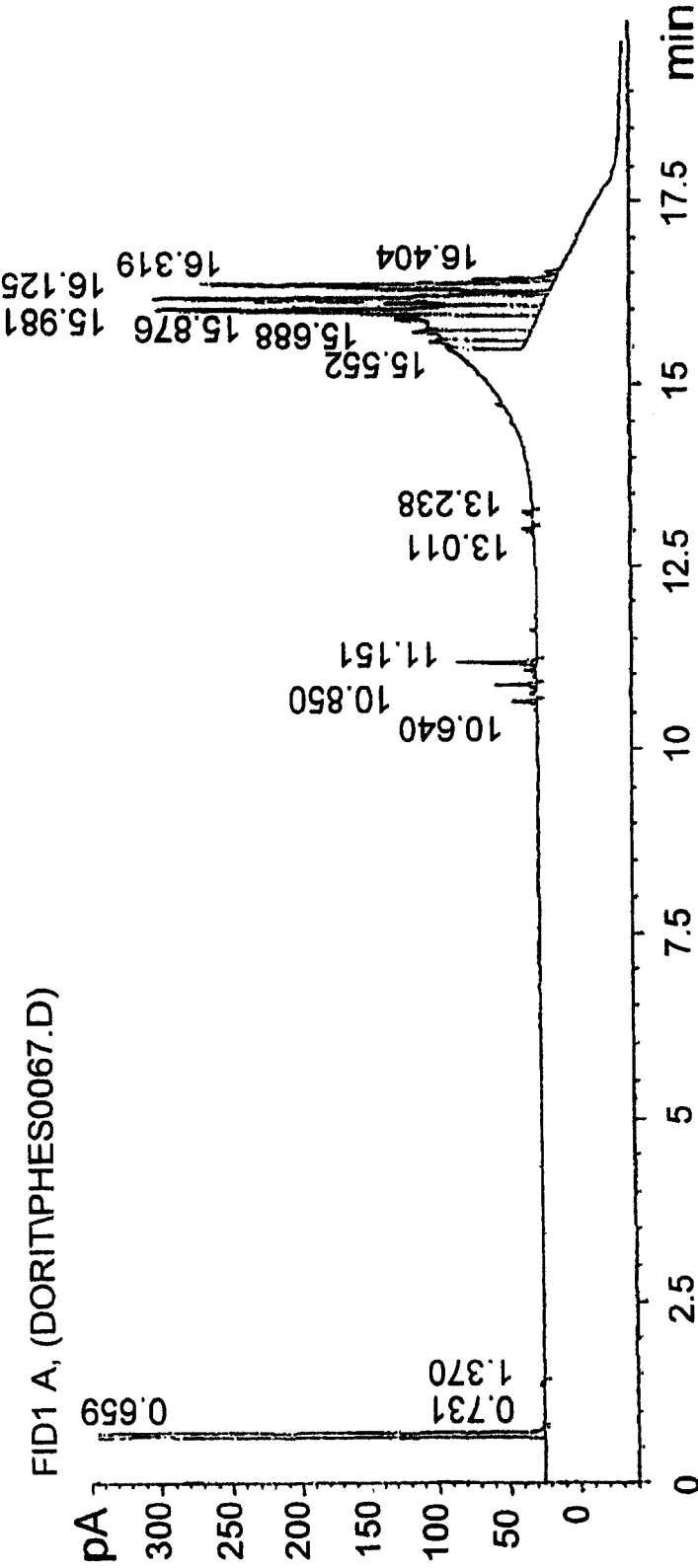


图 7

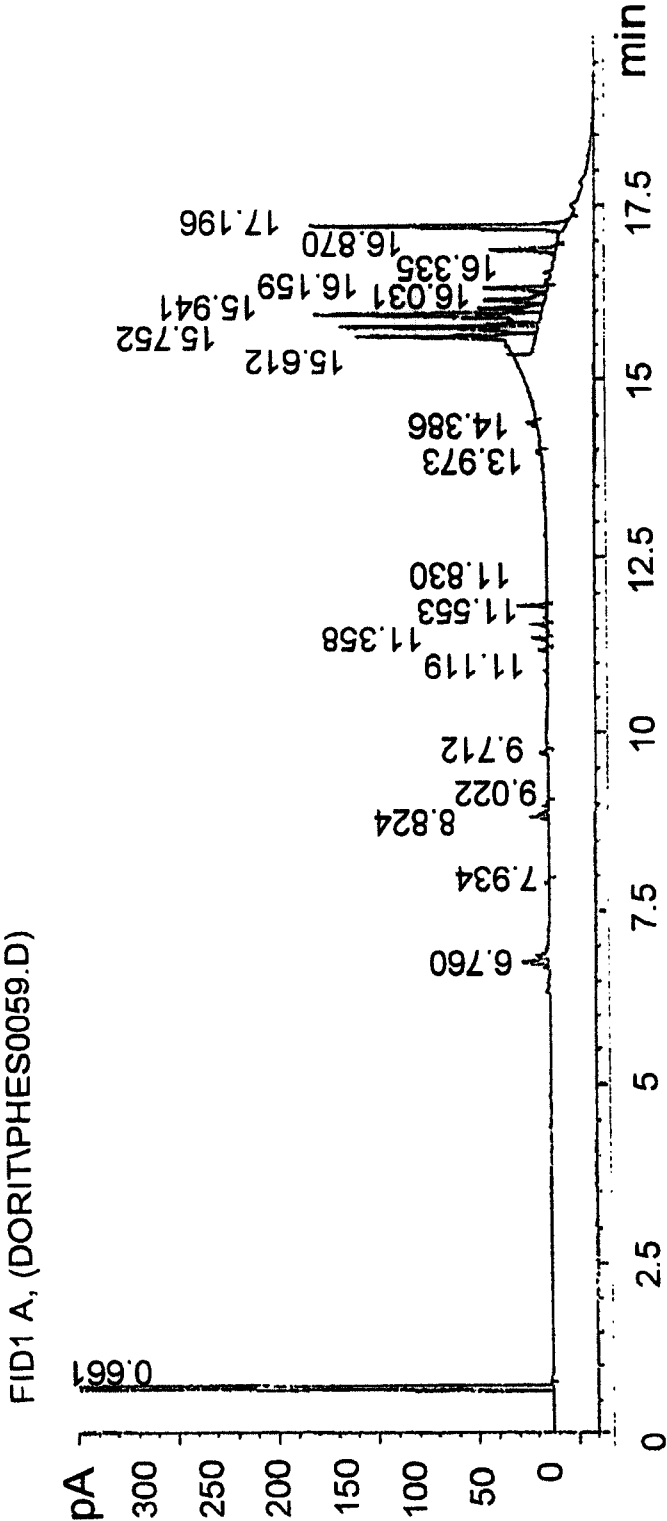


图 8

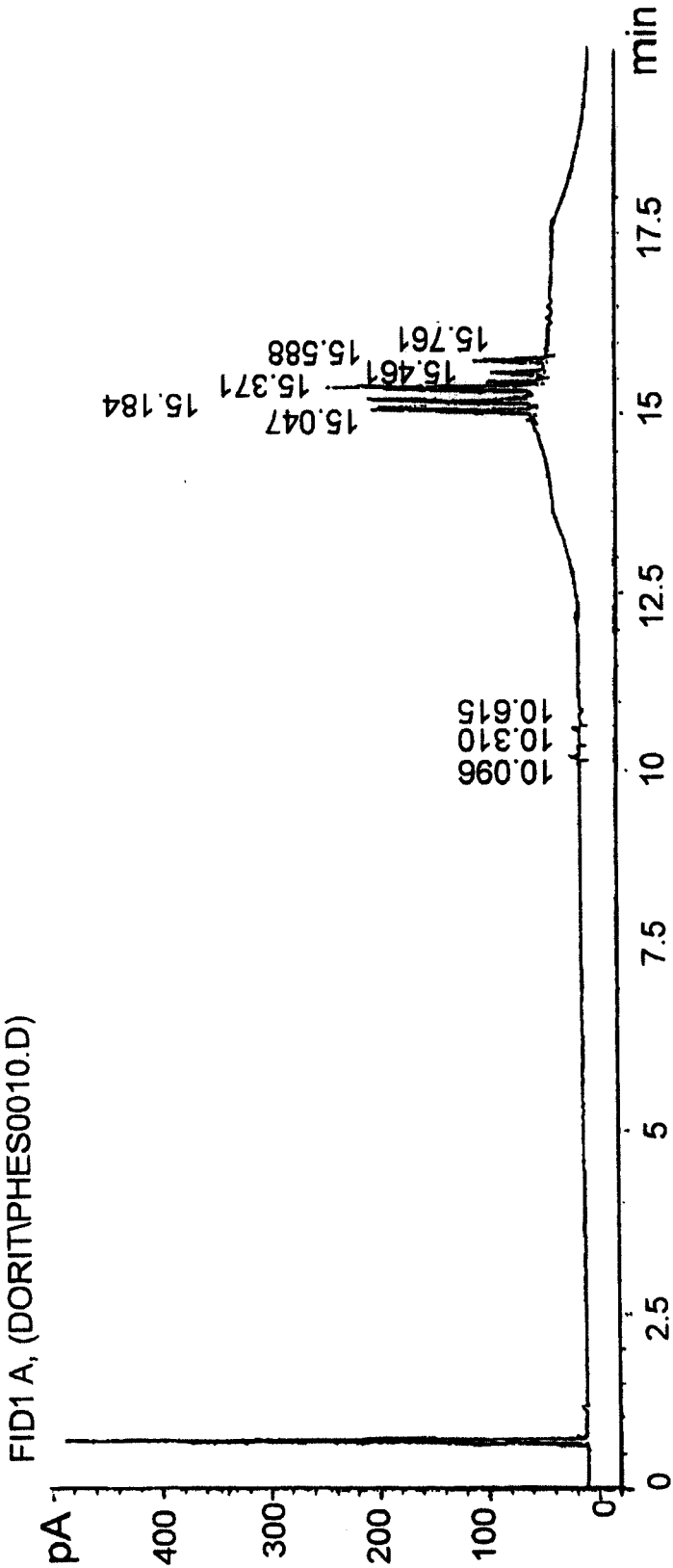


图 9