

71.590/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNYA₂**A KOLESZTERIN-FELSZÍVÓDÁS CSÖKKENTÉSÉ-
RE ALKALMAS, EMULGEÁLÓSZER TARTALMÚ
SZITOSZTANOL-KÉSZÍTMÉNY****KIVONAT**

A találmány tárgyát a koleszterin-felszívódás csökkentésére alkalmas készítmények képezik. A készítmény kapszula vagy tabletta formájában adagolható, vagy az folyadék, illetve száraz por formájában élelmiszerekbe vagy italokba keverhető. A készítmény egy vizes alapú, homogén, micelláris elegy, melyből szárítással egy finoman elosztatott növényi szterol, előnyösen szitosztanol, és lecitin keverékét kapjuk meg. A növényi szterol, előnyösen szitosztanol, és a lecitin molaránya 1:0,1 és 1:10 között van, a molarány azonban előnyösen legalább 1:2.

Rozsok hi

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNYA₂

71.590/SZE

**A KOLESZTERIN-FELSZÍVÓDÁS CSÖKKENTÉSÉ-
RE ALKALMAS, EMULGEÁLÓSZER TARTALMÚ
SZITOSZTANOL-KÉSZÍTMÉNY**

A fitoszterolok növényi szterolok, amelyek szerkezetileg a koleszterinre hasonlítanak, és amelyekről régóta köztudott, hogy csökkentik a koleszterin felszívódását és a szérum koleszterin-szintjét, miközben ők maguk nem szívódnak fel. A keringés által szállított koleszterin és LDL-koleszterin szintjének csökkentése fontos szerepet játszik a szív- és érrendszeri betegségek, különösen a koszorúsér-megbetegedés, megelőzésében és kezelésében. A koleszterin-felszívódás mértéke az egész szervezet koleszterin-anyagcseréjét meghatározza. A táplálékkal felvett koleszterin és az epében található koleszterin egyaránt a bélbe jut, ahonnan a koleszterin körülbelül 50 %-a szívódik fel [M.S. Bosner, R.E. Ostlund (Jr.), O. Osofisan, J. Grosklos, C. Fritschle, L.G. Lange (1993)]. Így tehát a legegyszerűbben úgy csökkenthetjük a szervezetben található koleszterin mennyiségét, hogy kvantitatív módon megakadályozzuk a koleszterin felszívódását.

Azok a gyógyszerek, amelyeket a koleszterin-szint csökkentésére általánosan használnak, alig vagy egyáltalán nem befolyásolják a koleszterin felszívódását. Például az újonnan kifejlesztett, hatásos hidroximetil-glutaril-koenzim-A-reduktáz-

-inhibitorok elsődleges hatása inkább a koleszterin szintézisének a csökkentése, és nem a koleszterin eltávolítása a szervezetből. Az epesav-megkötő szerek, mint például a kolesztiramin néven ismert ioncserélő-gyanta, a bélben fejtik ki hatásukat, de nem kötik meg a koleszterint, sőt krónikus szedésük növelheti a koleszterin-felszívódás mértékét [D.J. McNamara, N.O. Davidson, P. Samuel és E.H. Ahrens (Jr.): Cholesterol absorption in man: effect of administration of clofibrate and/or cholestyramine. *J. Lipid Res.*, 21: 1058-1064, (1980)]. Habár az orálisan adagolt neomicin hatékonyan csökkenti a koleszterin felszívódását, az toxikus, és további hátránya, hogy mellette folyamatosan egy hatékony antibiotikumot kell szedni [P. Samuel: Treatment of hypercholesterolemia with neomycin. A time for reappraisal. *N. Engl. J. Med.*, 301: 595-597, (1979)]. Az Eli Lilly Co. a magas koleszterin-szint kezelésére kifejlesztett egy Cytellin[®] nevű gyógyszert, amely különböző fitoszterolok keverékének vizes szuszpenziója, de azt 1985 óta nem forgalmazzák. Amint látható, a magas szérum-koleszterin-szint kezelésére jelenleg használatos módszereket a koleszterin-felszívódás újfajta inhibitoraival lehetne kiegészíteni.

Mivel a fitoszterolok nem-toxikus természetes anyagok, melyek az élelmiszer-feldolgozás olcsó melléktermékei, ezért fontos szerepet játszhatnak az enyhén megemelkedett szérum-koleszterin-szinttel rendelkező emberek kezelésében, vagy akár a népelelmezésben is; akár élelmiszerekbe keverve, akár táplálék-kiegészítők formájában. A fitoszterolok használatával csökkenteni lehetne a szisztémásan alkalmazott gyógyszerek felhasználását.

Annak ellenére, hogy potenciálisan előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, a fitoszterolok használhatósága korlátozott, mert a hatékonyságuk alacsony és bizonytalan, továbbá nagy dózisban kell őket adagolni. Például napi 5-18 g szitoszterol 16-20 %-kal csökkentette a szérum koleszterin-szintjét [J.W. Farquhar és M. Sokolow (1958)]. Egy dózis-válasz vizsgálat azt mutatta, hogy naponta 3-9 g poralakú szitoszterol kellett a szérum koleszterin-szint 12 %-os csökkentéséhez [A.M. Lees, H.Y.I. Mok, R.S. Lees, M.A. McCluskey és S.M. Grundy: Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 28: 325-338, (1977)]. Azért, hogy csökkenteni lehessen a szükséges adagot, az újabb kísérletekben a szitoszterol helyett szitosztanol használtak, mert az nem szívódik fel, és úgy tűnik, hogy hatékonyabb, mint a többi fitoszterol [J. Sugano, H. Morioka és I. Ikeda: A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *J. Nutr.* 107: 2011-2019, (1977)]. Súlyos hiperkoleszterinémiában szenvedő betegeknél napi 1,5 g szitosztanol 15 %-kal csökkentette a szérum koleszterin-szintjét [T. Heinemann, O. Leiss és K. von Bergmann: Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 61: 219-223, (1986)]. Ámbár napi 3 g szitosztanol nem volt hatásos a mérsékelt hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek esetében [M.A. Denke: Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 392-396, (1995)].

Sok kutató különféle módszereket javasolt a fitoszterolok oldhatóságának, illetve biológiai hozzáférhetőségének növelésére, azért, hogy jobban tudjuk hasznosítani ezeket az anyagokat. A patkánykísérletek, és az alapján, hogy a fitoszterol-észterek sokkal jobban oldódnak olajban, mint a szabad szterolok, azt javasolták, hogy a koleszterin-felszívódás csökkentésére olajos fitoszterol-észter készítményeket használjunk [F.H. Mattson, R.A. Volpenhein és B.A. Erickson: Effect of plant sterol esters on the absorption of dietary cholesterol. *J. Nutr.*, 107: 1139-1146, (1977)]. Az U.S. 5,502,045 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti az olajos szitosztanol-észter készítmények felhasználását az emberi hiperkoleszterinémia kezelésében. Azt találták, hogy napi 2,8 g szitosztanol (szitosztanol-észter formájában, margarinba keverve) 16 %-kal csökkentette az LDL-koleszterin szintjét [T.A. Miettinen, P. Puska, H. Gylling, H. Vanhanen és E. Vartiainen: Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N. England J. Med.*, 333: 1308-1312, (1995)]. Ámbár az étkezési zsiradékban oldott szitosztanol-észter hátránya, hogy naponta 23-50 g zsírt kell elfogyasztani, és hogy emberekben az észter a nem észteresített szterolhoz képest 21 %-kal alacsonyabb hatásfokú a koleszterin-felszívódás megakadályozása szempontjából [F.H. Mattson, S.M. Grundy és J.R. Crouse: Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 35: 697-700, (1982)].

Mások a nem észteresített fitoszterolok használhatóságát próbálták növelni. A WO 95/00158 számú nemzetközi közzété-

teli iratban arról olvashatunk, hogy egy komplex, amely szitoszterolból és egy nem felszívódó étkezési rostból (pektinből) állt, hiperkoleszterinémiás embereknek napi 2,1 g mennyiségben adagolva 16,4 %-kal csökkentette azok szérum koleszterin-szintjét. Ámbár nem mérték meg a koleszterin-felszívódásra gyakorolt hatást, továbbá a komplex oldhatósága még erősen lúgos közegben is csak körülbelül az 50 %-os volt, amiből arra következtethetünk, hogy a szitoszterol-komponens biológiai hozzáférhetősége ebben az esetben korlátozott volt.

Az U.S. 5,244,887 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás a koleszterin-felszívódás csökkentésére a sztanolok (mint például a szitosztanol) élelmiszer-adalékként való felhasználását ismerteti. Ezen szabadalmi leírásban azt olvashatjuk, hogy az élelmiszer-adalékok gyártása során a szitosztanolt egy ehető szolubilizáló-szerrel, mint például valamilyen trigliceriddel, egy antioxidánssal, mint például tokoferollal és egy diszpergálószerrel, mint például lecitinnel, poliszorbát 80-nal vagy nátrium-lauril-szulfáttal keverik.

Ámbár az előbb említett leírásban nincsenek adatok arra vonatkozóan, hogy hogyan válasszuk ki a leghatékonyabb összetevőket, illetve hogy milyen mennyiségben alkalmazzuk azokat, továbbá az elkészítés módjáról sem kapunk felvilágosítást. A koleszterin-felszívódásra gyakorolt hatást szintén nem mérték meg. Az előnyös kiviteli forma 25 tömeg-% sztanolt tartalmazott, növényi olajban, de a szterolok oldhatósága olajban csak 2 %-os.

Az U.S. 5,118,671 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szitoszterol-lecitin komplexek előállítását is-

merteti, gyógyszerészeti felhasználás céljára, de a koleszterin-szint csökkentésével kapcsolatban nem említi meg az orális alkalmazást.

A bélben lévő koleszterin egy micella-fázisból szívódik fel, amely epesókat és foszfolipideket is tartalmaz, és amely a bélben található olaj-fázissal van egyensúlyban. A fitoszterolok szilárd por, vagy vizes szuszpenzió formájában történő bevitele nem előnyös, mert ilyen formában rossz a bél folyékony fázisaiban való oldhatóságuk, és az oldódás sebessége is alacsony. Alternatív megoldásként a fitoszterolokat észteresíthetjük, és azokat a táplálék lipid-fázisában vihetjük be a szervezetbe, de ennek az a hátránya, hogy hordozóanyagként valamilyen ehető lipidet kell alkalmazni.

Ennek megfelelően a jelen találmány célja, hogy a növényi szterolok, leginkább a szitosztanol, számára olyan beviteli rendszert biztosítson, amely nem olaj-fázisú, és amely olyan mértékben tartalmazza a biológiailag hozzáférhető szitosztanolt, hogy az 37 %-kal csökkentse a koleszterin felszívódását; mindemellett egy kiváló ízű emulgeálószerrel használunk, melyet a lehető legkisebb mennyiségben alkalmazunk.

A találmány tárgya továbbá egy vízben oldható készítmény, ahol a szitosztanol nem zsírban van oldva, hanem inkább egy előnyös emulgeálószerrel [nátrium-sztearoil-2-laktiláttal, (SSL)] van keverve, és egy vizes, vezikuláris komplexben helyezkedik el, amely közvetlenül képes belépni a bélben található micella-fázisába, és amelynek ezáltal magas a biológiai hozzáférhetősége.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy fokozott oldékonyságú készítmény, amely egy emulgeálószerrel (amely még a foszfolipideknél is hatékonyabb; ez az emulgeálószer pedig az SSL) kevert növényi szterolt, előnyösen szitosztanolt, tartalmaz, és amelynek vízben való oldhatósága nagyobb, mint 90 %.

A jelen találmány tárgyát képezi még egy olyan eljárás is, amely arra szolgál, hogy csökkentse a koleszterin-tartalmú ételekből történő koleszterin-felszívódást, azáltal hogy egy finomeloszlású, vízben oldható port (amely szitosztanol és SSL vizes, homogén, micelláris elegye) az elfogyasztani kívánt élelmiszerrel keverünk.

A jelen találmány további tárgya egy olyan eljárás, mely arra szolgál, hogy egy száraz, finomeloszlású, vízben oldható port állítsunk elő, amely egy növényi szterolt (előnyösen szitosztanolt) és lecitint tartalmaz, és amely nagyon jól oldódik vízben, így tehát amint egy vizes rendszerrel érintkezésbe kerül, egy vizes vezikuláris komplexet képez, amely közvetlenül képes belépni a bélben található micella-fázisába, és így meg tudja akadályozni a koleszterin-felszívódását.

A találmány alábbi, részletes leírásából világossá válik, hogy miképpen érhetjük el a fenti (vagy egyéb) célokat.

Egy olyan készítményt ismertetünk, amely képes megakadályozni a koleszterin bélből történő felszívódását. A készítmény fitoszterolokat, előnyösen szitosztanolt, tartalmaz, amelyek egy vizes alapú emulgeálószerben, előnyösen SSL-ben, vannak elosztatva. A szterol és az emulgeálószer molaránya 1:0,1 és 1:10 között, előnyösen 1:0,9 és 1:0,5 között lehet.

A fitoszterolból és emulgeálószerből álló komplex előállítás során nagy nyíróerejű keverést alkalmazunk, a fitoszterol és az emulgeálószer vizes elegyét például vortexeljük, keverjük, szonikáljuk vagy egy keskeny nyíláson nyomjuk át. Az elosztatott anyagot ezután rögtön felhasználhatjuk, vagy például liofilizálással, illetve porlasztós szárítással száríthatjuk. A komplexet felhasználhatjuk folyékony formában, anélkül hogy azt szárítanánk, vagy azt az előbb említett módokon száríthatjuk, majd ha azt valamilyen folyadékkal érintkezésbe hozzuk, akkor ismét vizes, vezikuláris komplex képződik, amely közvetlenül képes belépni a bélben található micella-fázisába. Hordozóanyagként nem használunk zsírt, és meglepő módon még szárítás hatására sem változik meg a micelláris elegy fizikai szerkezete, mely elegy vezikulumokat tartalmaz, amelyek nagy része tartalmaz valamennyi növényi szterolt és lecitint.

Amint már előzőleg említettük, a jelen találmány sok lényeges dologban eltér a növényi szteroloknak és a szitosztanolnak a szakmában eddig ismert felhasználásától.

Ezen eltérések az alábbiak:

- A koleszterin-felszívódás csökkentéséhez szükséges adag kisebb, mint az eddigi publikációkban leírt adagok, nevezetesen 25-300 mg szitosztanol.
- Az előnyös készítmény nem tartalmaz triglicerideket vagy olajokat. A fitoszterol nem zsírban van oldva, hanem inkább egy foszfolipiddel van keverve, és egy vizes, vezikuláris komplexet alkot, amely közvetlenül képes belépni a bélben található micella-fázisába.

- A keveréket úgy állítjuk elő, hogy közben elkerüljük a szitosztanol-molekulák egymással való asszociációját, ami például akkor lépne fel, ha a szitosztanolt szerves oldószerekből az oldószer elpárologtatása által kapnánk meg, ahol az oldószer eredetileg szitosztanolt és szolubilizáló anyagokat tartalmazott.

A készítmény hatékony adagja a koleszterin-felszívódás csökkentésére emberben 10-1000 mg, az előnyös adag 100-300 mg. Ez az adag kisebb, mint ami az egyéb, jelenleg használatos készítmények esetén szükséges. A készítmény kapszula vagy tablettá formájában, gyógyszerként vagy táplálék-kiegészítőként alkalmazható. A készítmény emberi fogyasztásra alkalmas élelmiszer-adalék formájában is felhasználható.

A koleszterin-felszívódás csökkentésére alkalmas, magas biológiai hozzáférhetőségű készítmény előállításnak első lépése

A növényi szterol és az emulgeálószer homogén elegyének előállítására többnyire minden olyan módszer alkalmas, amelyet általában az emulziók előállítására használnak, ezen módszerek önmagukban vagy egymással kombinálva alkalmazhatók. Elfogadható eredményt kaphatunk például a Waring-féle keverőkkel vagy egyéb, nagy nyírőerejű keverőkkel. Mikrofluidizálókat is használhatunk. Ez utóbbi esetben a növényi szterolt és az emulgeálószer nagy nyomással kerámia-kapillárisokon nyomjuk keresztül. Ha az előnyös szonikálást választjuk, akkor körülbelül 1,5-4 percig szonikáljuk az elegyet. Az olyan kísérletekben, ahol kis mennyiségekkel dolgozunk, általában körülbelül 1,5 percig szonikálunk.

A szárítási lépés nem kritikus, feltéve hogy az nem teszi tönkre a növényi szterol és az emulgeálószer kölcsönhatása révén kialakult vezikuláris komplexet. Általában az enyhébb szárítási eljárások az előnyösek, mint például a vákuumos szárítás, a fagyasztva szárítás vagy a környezeti levegőn való szárítás alacsony hőmérsékleten. Abban az esetben, ha hőt alkalmazunk, akkor a hőmérséklet atmoszférikus nyomáson ne lépje túl a 0°C-ot.

Amint előbb már említettük, a száraz por napi adagja 10 és 1000 mg között lehet, az előnyös napi adag pedig 25 és 300 mg között van. A legelőnyösebb adag a koleszterin-felszívódás szignifikáns csökkentésére 100 és 300 mg között van, ezt az adagot napi 1-4 alkalommal kell bevenni.

Az alábbi példák a jelen találmány további illusztrálásra szolgálnak, és nem korlátozzák annak tárgyát.

Az első öt példában fitoszterolként szitosztanolt használtunk, foszfolipidként pedig lecitint, miként az alapbejelentésben is. A 6. példában SSL-t használtunk, a javulás pedig egyértelmű volt.

A fitoszterolok itt szterolokat jelentenek, mint például szitosztanolt, szitoszterolt, kampezterolt, sztigmaszterolt, szaponinokat, lignánokat, aromás és izoprénvázas természetes anyagokat, továbbá ezek származékait, illetve redukciós termékeit. A foszfolipideken itt glicero-foszfolipidek és szfingolipidek, illetve ezek származékai, mint például lizo-foszfolipidek értendők. Nátrium-szteroil-2-laktilát (SSL) alatt magát az említett vegyületet, vagy az ezzel kémiaiilag egyenértékű, alkáli- vagy alkáliföldfémek, zsírsavak és tejsav reakciója során keletkező termékeket is értjük.

PÉLDÁK

1. példa

Kloroformban meghatározott molarányban az alábbi anyagokat kevertük össze egymással: szitosztanol, nyomnyi mennyiségű $[H^3]$ szitosztanol, és a bélben megtalálható egyéb vegyületek, vagy általánosan használt élelmiszer-adalékok. Ezután az elegyből kivettünk egy 1,2 μ mol szitosztanolt tartalmazó alikvotot, majd az oldószert alacsony nyomáson ($<6,666$ Pa) elpárologtattuk. Az alikvothoz ezután 0,5 ml mesterséges epét (8 mM nátrium-taurokolát, 5mM szója-lecitin, 0,15 mM NaCl, pH 7,4) adtunk, majd a csöveket 8 fordulat/perc sebességgel, 37°C-on 30 percig forgattuk. Ezután 1 percig 17000 g-n centri-

fugáltuk a csöveket, hogy leülepedjen a szilárd anyag, majd a felülúszót a radioaktivitás mérésére szcintillációs folyadékhoz adtuk, végül pedig kiszámoltuk, hogy a radioaktivitás hány százaléka maradt a mesterséges epét tartalmazó felülúszóban. Az alábbi, 1. táblázat a szitosztanol keverékek oldhatóságát mutatja mesterséges epesó jelenlétében.

1. táblázat

A kloroform oldatból szárítással kapott szterol- -keverék összetétele	Oldható szterol (%)
Szitosztanol önmagában	2,3
Szitosztanol+Tween-20 1:1 súlyarányban	7,8
Szitosztanol+taurokolát 1:1 súlyarányban	57,7
Szitosztanol+monoolein+diolein 1:1:1 súlyarányban	14,5
Szitosztanol+lecitin 1:1 súlyarányban	38,2
Szitosztanol+lizolecitin 1:1 súlyarányban	8,0
Szitosztanol+lecitin+lizolecitin 1:1:0,5 súlyarányban	97,9

Amint a táblázat 1. sorában látható, a szitosztanol önmagában alig oldódik mesterséges epesóban (2,3 %), Tween-20 (egy poliszorbát-típusú, élelmiszerek esetén alkalmazott emulgeálószer) hozzáadása is csak kis mértékben növeli az oldhatóságot (7,8 %, 2. sor). A szitosztanol oldhatósága 25-szörösére, azaz 2,3-ról 57,7 %-ra növelhető, ha azt egy ionos detergens, mint például nátrium-taurokolát (epesó), jelenlétében szárítjuk (3. sor). Mivel az epesók az emésztési folyamatban szerepet játszanak, ezért egyéb vegyületeket is megvizsgáltunk, amelyek megtalálhatóak a bélcsatornában. A monoolein és a diolein a

táplálékkal felvett zsírok emésztése során keletkezik, de amint a 4. sorban látható, ezek csak mérsékelten, azaz 2,3-ról 14,5 %-ra növelték az oldhatóságot. Az epe tartalmaz lecitint, és ez a foszfolipid a szitosztanol oldhatóságát 2,3-ról 38,2 %-ra növelte (5. sor). A lizolecitin azonban, amely a lecitin hidrolízise során keletkezik (a reakciót a foszfolipáz-A₂ katalizálja), csak kis mértékben, azaz 2,3-ról 8,0 %-ra növelte a szitosztanol oldhatóságát (6.sor). Viszont meglepő módon azt tapasztaltuk, hogyha a szitosztanolt egyszerre keverjük lecitinnel, illetve lizolecitinnel, akkor a szterol oldhatósága 97,9 %-ra nő (7. sor). Az adatokat összesítve azt mondhatjuk, hogy a szilárd szitosztanol alig oldódik mesterséges epében, de különböző mértékben oldhatóvá tehető, ha a szilárd elegybe egyéb vegyületeket is belekeverünk. Sőt mi több, egy olyan vegyület (lizolecitin), amely önmagában alig képes a szitosztanol oldhatóságát növelni, más vegyületekkel (lecitinnel) keverve jelentősen növelheti az oldhatóságot.

2. példa

Kloroformban az alábbi anyagokat kevertük össze egymással: szitosztanol, nyomnyi mennyiségű [H³]szitosztanol, és lecitin. Ezután az elegyből kivettünk két alikvotot, melyek mindegyike 1,2 µmol szitosztanolt tartalmazott, majd az oldószert az 1. példában leírtak szerint vákuumban elpárologtattuk. Az egyik alikvotot további feldolgozás nélkül használtuk, a másikhoz 500 µl vizet adtunk, majd azt egy mikroheggyel ellátott Fisher Sonic Dismembrator Model 300 nevű készülékkel, 40 %-os teljesítményen 5 percig szonikáltuk. A mintát ezután száraz-

jég/aceton felhasználásával fagyasztottuk, majd liofilizáltuk, hogy eltávolítsuk a vizet. Fontos, hogy a minta hőmérsékletét a fagyáspont alatt tartsuk, mert így elkerülhető a szitosztanol kicsapódása az elegyből. Ezután az 1. példában leírtak alapján meghatároztuk ezen minták oldhatóságát mesterséges epében, az eredmények pedig az alábbi táblázatban láthatók.

2. táblázat

A minta, és szárításának módja	Oldható szterol (%)
Szitosztanol, kloroformos oldatból, az oldószer elpárologtatásával	2,3
Szitosztanol/lecitin (1:1 molarányban), kloroformos oldatból, az oldószer elpárologtatásával	38,2
Szitosztanol/lecitin (1:1 molarányban), vízben szonikálva, majd liofilizálva	89,7

Az adatokból látszik, hogy a lecitin fontos a szitosztanol szolubilizálásában. Ámbár a szterol oldhatóságát a szitosztanol/lecitin keverék szárításának módja is befolyásolja. Abban az esetben, ha a keveréket közvetlenül a kloroformos oldat szárításával kapjuk meg, akkor a mesterséges epe a szterol 38,2 %-át képes szolubilizálni. Ha viszont szonikáljuk, majd liofilizáljuk az elegyet, akkor a szolubilizáció mértéke 89,7 %-ra nő. Ebből látszik, hogy a szitosztanol/lecitin keverékek előállításának egyik előnyös módja az, ha a szitosztanol és a lecitin keverékét vízben eloszlatjuk, majd utána a vizet eltávolítjuk.

3. példa

Ebben a példában a felhasznált lecitin mennyiségének a hatását vizsgáltuk a szitosztanol szolubilizációja szempontjából, a vizsgálatot az 1. példában leírtak alapján végeztük, azzal a különbséggel, hogy a 37°C-on történő 30 perces forgatást követő centrifugálás alatt leülepedett szitosztanolt kétszer re-extraháltuk, úgy hogy azt további 0,5 ml mesterséges epével vortexeltük, majd újra centrifugáltuk. Az eredmények az alábbi táblázatban láthatók.

3. táblázat

Szitosztanol:lecitin molarány	Oldható szterol (%)
1:1	53,1
1:2	67,9
1:10	67,6

Az adatok azt mutatják, hogy ismételt extrakció és tízszeres mennyiségű lecitin hozzáadása esetén is oldhatatlan maradt a szitosztanol jelentős része (32 %). Abban az esetben, ha jelzett anyagként [H³]foszfatidil-kolint használtunk [H³]szitosztanol helyett, akkor a szolubilizált lecitin mennyisége 93,3 % volt. Ez azt jelenti, hogy a szárított szitosztanol/lecitin komplexből a lecitin majdnem kvantitatívan kioldódott, miközben jelentős mennyiségű szitosztanol maradt oldhatatlan. Így tehát ha mesterséges epében kívánjuk a szitosztanolt szolubilizálni, akkor számítani kell arra, hogy mindig marad valamennyi oldhatatlan szitosztanol. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a szitosztanol/lecitin keveréket olyan oldat szárításával állítottuk

elő, melyhez polárosabb (például etanol), illetve kevésbé poláros (például hexán) oldószert használtunk.

4. példa

Itt a szonikált szitosztanol/lecitin vezikulumok, illetve a szonikált lecitin mellett adagolt szitosztanol hatását vizsgáltuk az ember koleszterin-felszívódására. A szitosztanolt úgy vízmentesítettük, hogy kloroformban oldottuk, majd az oldószert elpárologtattuk, utána ezt az oldást/szárítást ismét elvégeztük, majd az így kapott anyagot dörzsmozsárban porrá törtük. Ahhoz, hogy a vezikulumok 1:3 molarányban tartalmazzák a szitosztanolt, illetve a lecitint, ahhoz egy 150 ml-es főzőpohárba 2,00 g szterolt és 11,3 g tisztított szója-lecitint adtunk. Keverés mellett kloroformot adagoltunk, azért hogy mindkét komponenst szolubilizáljuk, majd a főzőpoharat 65°C-os homokfürdőben inkubálva elpárologtattuk az oldószert. A szitosztanol nélküli szója-lecitint (11,3 g) ugyanilyen módon preparáltuk. Amikor az összes oldószert elpárologtattuk, a főzőpoharakat egy liofilizáló edénybe raktuk, majd a maradék kloroformot vákuumban párologtattuk el (minimum 24 óra). Ezután a főzőpoharakban maradt szilárd anyagot spatulával fellazítottuk, majd 120 ml ioncserélt vizet adtunk hozzá, és végül a szuszpenziót egy órán keresztül erősen kevertettük. A vezikulumokat úgy képeztük, hogy a főzőpoharak tartalmát egy kis hegygel felszerelt Branson Sonifier nevű készülékkel (7-es fokozatra állítva) szonikáltuk. Szonikálás közben a főzőpoharakat szobahőmérsékletű vízfürdőben tartottuk. Azok a vezikulumok, amelyek csak lecitint tartalmaztak, 15-30 perc alatt alakultak ki, de a lecitin plusz szterol tartalmú vezikulumok kialakulásához 30-45 perc kellett. A mintákat ezután 10 percre centrifugáltuk 10000 g-n, majd azokat egy 5 µm-es szűrőn átszűrtük. Egy 250 nm-es standarddal kalibrált Zeta-

sizer nevű berendezéssel meghatároztuk a vezikulumok átlagos átmérőjét, amely a lecitin-vezikulumok esetén 204,7 nm, a szitosztanol/lecitin-vezikulumok esetén pedig 247,2 nm volt. A szitosztanol koncentrációját enzimatikusan határoztuk meg. A vezikulumokat a preparálást és a jellemzést követően egy éjszakan át egy 4°C-os hűtőben tároltuk. A minták térfogatát a következő napon vízzel 60 ml-re egészítettük ki, majd a mintákhoz 500 mg, citrom ízesítésű Crystal Light-ot (Kraft Foods, Inc.) adtunk. Személyenként három U.S.P. gyomor-kapszulát összesen 1 g szitosztanol porral, vagy összesen 1 g glükózzal (placebo) töltöttünk meg.

Hat egészséges személlyel véletlenszerű sorrendben három koleszterin-felszívódási tesztet végeztünk, melyeket 2 hetes időtartamok választottak el egymástól. A vizsgálatban résztvevő személyek mindegyik teszt során 8 napon keresztül egy „National Cholesterol Education Program Step 1” nevű diétát fogyasztottak, a teszt első napjától kezdve. A 4. napon az emberek egy standardizált teszt-reggelit kaptak, amely 240 ml narancsléből, 240 ml teljes tejből, 21 g kukoricapehelyből és 60 g péksüteményből állt, a péksüteménybe jelzett anyagként 2,5 ml kukoricaolajjal 40 mg [26,26,26,27,27,27-²H₆]-koleszterint kevertünk. Ezenkívül mindegyik személy még egy további italt (amely vagy szitosztanol/lecitin vezikulumokat vagy lecitin-vezikulumokat tartalmazott) és három kapszulát (amelyek vagy szitosztanol-porral vagy glükózzal voltak töltve) is elfogyasztott. A vérplazmában lévő, deutériummal jelzett koleszterin koncentrációját a 7. és a 8. napon mértük, metánnal végzett negatív ion kémiai ionizációs gázkromatográfia/tömegspektromet-

ria segítségével. A koleszterin-felszívódás mértékét úgy számoltuk ki, hogy a 7. és 8. napon mért koleszterin(deutériummal jelzett)-koncentrációk átlagát elosztottuk azon teszt mérési eredményeinek az átlagával, amely tesztben a kísérleti személyek csak lecitin-vezikulumokat és glükóz-tartalmú kapszulákat kaptak. Ebből kiszámoltuk a koleszterin-felszívódás gátlásának mértékét, az adatokat, százalékban megadva az alábbi táblázat tartalmazza.

4. táblázat

Alkalmazott kezelés	A koleszterin-felszívódás gátlásának mértéke
1000 mg szitosztanol-por	11,3 $\pm$ 7,4 % (p=0,2)
700 mg szitosztanol/lecitin vezikulum	36,7 $\pm$ 4,2 % (p=0,003)

Az adatokból látható, hogy az 1000 mg szitosztanol-por a placebohoz képest nem csökkentette szignifikánsan a koleszterin-felszívódást. Ez egybevág a korábbi közleményekkel, amelyekben azt olvashatjuk, hogy csak több grammnyi mennyiségű szitosztanol képes a koleszterin-felszívódást csökkenteni. Viszont 700 mg szitosztanol/lecitin vezikulum 37 %-kal csökkentette a koleszterin-felszívódás mértékét, ami arra utal, hogy a megfelelő készítmény formájában jelen lévő szitosztanol hatékony és biológiailag hozzáférhető.

5. példa

A szitosztanol/lecitin vezikulumokat a 4. példában szereplő 6 ember közül 5-nek további négy koleszterin-felszívódási

tesztben kisebb mennyiségben is adagoltuk, hogy megmutassuk, hogy a szitosztanol/lecitin vezikulumok farmakológiai értelemben dózis-válasz módon csökkentik a koleszterin-felszívódást. 300 mg szitosztanol (szitosztanol/lecitin vezikulumok formájában) lecitin-placeboval hasonlítottunk össze, illetve 150 mg szitosztanol (szitosztanol/lecitin vezikulumok formájában) egy másik lecitin-placeboval hasonlítottunk össze. Szilárd szitosztanol-, illetve glükóz-tartalmú kapszulákat nem adtunk. Az eredményeket az alábbi táblázat mutatja.

5. táblázat

Alkalmazott kezelés	A koleszterin-felszívódás gátlásának mértéke
300 mg szitosztanol/lecitin vezikulum	34,4 $\pm$ 5,8 % (p=0,01)
95 mg szitosztanol/lecitin vezikulum	5,6 $\pm$ 7,2 % (nem szignifikáns)

A 300 mg-os adag közel ugyanannyival csökkentette a koleszterin-felszívódás mértékét, mint a 700 mg-os adag, ami arra utal, hogy ez a telítési adag. Ez egybevág a korábbi kísérletek eredményeivel, amelyekből az derül ki, hogy a fitoszterolok nem gátolják teljes mértékben a koleszterin-felszívódást. A 95 mg-os adag nem befolyásolja szignifikáns módon a koleszterin felszívódását.

6. példa

Az SSL (nátrium-sztearoil-2-laktilát) alkalmazása

Ebben a példában a sok szempontból előnyös SSL alkalmazását ismertetjük. 1998 májusa óta, vagyis amióta benyújtot-

tuk az alapbejelentést, sok az élelmiszeriparban általánosan használt emulgeálószeret vizsgáltunk meg. A szitosztanol szolubilizálására az SSL a legalkalmasabb. A SSL potenciális jelentősége nagy, mert sokfajta élelmiszerben alkalmazzák, beleértve a sütőipari termékeket is, és bármelyik élelmiszer esetén nagyon elfogadható íze és állaga van.

Az alábbi kísérletekben, amelyeket együttesen 6. példának hívunk, a nyomnyi mennyiségű $[H^3]$ szitosztanol tartalmazó szitosztanol kloroformos elegyből szárítással kaptuk meg (ahol a kloroformos elegy valamilyen szolubilizálószer is tartalmazott) a szárítás után a maradékot vízben szonikáltuk (a szitosztanol koncentrációja 2,4 mM volt), majd az elegyet fagyasztottuk, és végül liofilizáltuk. Ezek után mesterséges epét (8 mM nátrium-taurokolát, 5mM PC, 0,15 M NaCl, 15 mM nátrium-foszfát, pH 7,4) adtunk a mintákhoz, majd a csöveket 37°C-on 30 percig forgattuk. Ezután 1 perces centrifugálás következett 17000 g-n. A csapadékot egyszer mostuk, majd az egyesített felülúszók és a csapadék radioaktivitását külön-külön megmértük. A három párhuzamosban végzett kísérletek eredményei a 6. táblázatban láthatók.

6. táblázat

Az elegy összetétele	Mólarány	Oldhatóság (%)
1. Szitosztanol+SSL	1:0,90	95,0 $\pm$ 0,1
2. Szitosztanol+SSL	1:0,68	94,5 $\pm$ 0,1
3. Szitosztanol+SSL	1:0,45	92,8 $\pm$ 0,6
4. Szitosztanol+lecitin	1:1	89,1 $\pm$ 1,2
5. Szitosztanol+Precept 8160 Central	1:1,2	95,7 $\pm$ 0,08

Soya PC/LPC ^a		
6. Szitosztanol+etoxilezett MG ^b	1:1 (súlyarány)	82,5±4,0
7. Szitosztanol+Tween [®] 20 ^c	1:1 (súlyarány)	51,3±2,8
8. Szitosztanol+GMS ^d	1:1	A szonikálás után újra aggregálódott
9. Szitosztanol+MO ^e	1:1	46,4±1,2

^a PC/LPC=lecitin/lizolecitin

^b MG=monoglicerid

^c a Tween[®] egy bejegyzett védjegy, és polioxietilén-szorbítán-monolaurátot jelent

^d GMS=gliceril-monosztearát

^e MO=1-monoolein

A 6. táblázat 4. és 5. sora az alapbejelentés előnyös elemeinek az adatait tartalmazza. Látható, hogy ugyanolyan oldhatóság eléréséhez az SSL-ből kevesebb kell, mint valamilyen egyéb, kellemes ízű emulgeálószerből. Tehát arra következtethetünk ezekből a kísérletekből, hogy az SSL ugyanolyan hatékonyan szolubilizálja a szitosztanolt, mint a lecitin és a lizolecitin együtt. A monogliceridek, az etoxilezett monogliceridek és a poliszorbát 20 kevésbé hatékony anyagok.

A fenti példák alapján látható, hogy a jelen találmány szerint előállított készítmény *in vitro* biológiailag hozzáférhető (oldódik mesterséges epében), ezenkívül szignifikánsan csökkenti a koleszterin-felszívódás mértékét, és általában véve azt mondhatjuk, hogy a találmány az összes kitűzött célt elérte.

Nyilvánvaló, hogy a szakember az itt pontosan közölt eljárásokon és készítményeken bizonyos módosításokat végez-

het, ezek a módosítások azonban szintén a jelen találmány tárgyát képezik, amelyet az alábbi igénypontok határoznak meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A koleszterin-felszívódás csökkentésére alkalmas készítmény, amely az alábbiakból áll: egy növényi szterol és lecitin vizes, homogén, micelláris elegye, amelyből szárítással egy finomeloszlású, vízben oldható port állítottunk elő; az említett növényi szterol és a lecitin molaránya 1:1 és 1:10 között van.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a növényi szterol és a lecitin molaránya legalább 1:2.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a növényi szterol és a lecitin molaránya 1:2 és 1:4 között van.

4. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a micelláris elegy vezikulumok keveréke, melyek nagy része tartalmaz valamennyi növényi szterolt és valamennyi lecitint.

5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a növényi szterol a szitosztanol.

6. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely még lizolecitint is tartalmaz, a lizolecitin és a lecitin molaránya legalább 0,2.

7. Eljárás az élelmiszerekből történő koleszterin-felszívódás csökkentésére, azzal jellemezve, hogy az élelmiszerhez egy finomeloszlású, vízben oldható port keverünk, amelyet egy növényi szterol és lecitin vizes, homogén, micelláris elegyének szárításával állítottunk elő; az említett porban az említett növényi szterol és a lecitin molaránya 1:1 és 1:10 között van; az említett élelmiszerhez pedig annyit adunk az említett porból, amely körülbelül 100-1000 mg szitosztanol tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adag 100 és 300 mg közötti, és ezt az adagot naponta legalább 2-3 alkalommal adagoljuk.

9. Élelmiszer-készítmény, mely az alábbiakból áll: egy koleszterin-tartalmú élelmiszer, és egy élelmiszer-adalék, ahol az élelmiszer-adalék szitosztanol és lecitin vízben oldható, homogén, micelláris elegye, mely elegyben a szitosztanol és a lecitin molaránya 1:1 és 1:10 között van.

10. A 9. igénypont szerinti készítmény, ahol az élelmiszer egy szilárd élelmiszer.

11. A 9. igénypont szerinti készítmény, ahol az élelmiszer egy ital.

12. Eljárás egy növényi szterol és egy foszfolipid vizes, homogén, micelláris elegyének az előállítására, azzal jellemez-

ve, hogy a növényi szterolt, a foszfolipidet, valamint a vizet nagy nyíróerővel keverjük, amíg el nem érjük a homogenitást.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, nagy nyíróerejű keverés a szonikálás.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett növényi szterol a szitosztanol.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett foszfolipid a lecitin.

16. A koleszterin-felszívódás csökkentésére alkalmas készítmény, amely az alábbiakból áll: egy növényi szterol és egy emulgeálószer vizes, homogén, micelláris elegye, amelyből szárítással egy finomeloszlású, vízben oldható port állítottunk elő; az említett emulgeálószer a tejsav és valamilyen zsírsav reakciótermékének alkáli- vagy alkáliföldfém sója; valamint az említett növényi szterol és az emulgeálószer molaránya 1:0,1 és 1:10 között van.

17. Eljárás az élelmiszerekből történő koleszterin-felszívódás csökkentésére, azzal jellemezve, hogy az élelmiszerhez egy finomeloszlású, vízben oldható port keverünk, amelyet egy növényi szterol és egy emulgeálószer vizes, homogén, micelláris elegyének szárításával állítottunk elő; az említett emulgeálószer a tejsav és valamilyen zsírsav reakciótermékének alkáli- vagy alkáliföldfém sója; az említett porban az említett növényi

szterol és az emulgeálószer molaránya 1:0,1 és 1:10 között van; az említett élelmiszerhez pedig annyit adunk az említett porból, amely körülbelül 100-1000 mg szitosztanol tartalmaz.

18. Élelmiszer-készítmény, mely az alábbiakból áll: egy koleszterin-tartalmú élelmiszer, és egy élelmiszer-adalék, ahol az élelmiszer adalék szitosztanol és nátrium-sztearoil-2-laktilát -emulgeálószer- vízben oldható, homogén, micelláris elegye, mely elegyben a szitosztanol és az emulgeálószer molaránya 1:0,1 és 1:10 között van.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám l.
szabadalmi ügyvivő
az IPR-GyK Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323