

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

346-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02. 09. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.08.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/963126**

(33) Země priority: **FI**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(Věstník č. 7/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FI96/00465**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/06405**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/575

(71) Přihlášovatel:

RAISIO BENECOL LTD., Raisio, FI;

(72) Původce:

Wester Ingmar, Raisio, FI;

Palmu Tapio, Raisio, FI;

Miettinen Tatu, Espoo, FI;

Gylling Helena, Helsinki, FI;

(74) Zástupce:

**Guttman Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kompozice obsahující stanol a její použití

(57) Anotace:

Bylo zjištěno, že stanolová kompozice, obsahující kromě sitostanolu jako hlavní složky také významné množství, nejméně 10 % kampastanolu, je účinná při včlenění do požívatin jako prostředek pro snížení hladin sérového cholesterolu. Po esterifikaci je tato kompozice zvláště vhodná pro použití v jedlých tucích a olejích a v potravinách obsahujících tuky.

CZ 346-99 A3

Kompozice obsahující stanol a její použití

Oblast techniky

Vynález se týká kompozice rostlinných stanolů obsahující sitostanol, vhodné zejména jako prostředku pro snižování hladiny cholesterolu v séru. Vynález se rovněž týká odpovídající esterifikované formy této kompozice, kterou lze výhodně použít v jedlých olejích a tucích a v potravinách obsahujících tuky.

Dosavadní stav techniky

Rostlinné steroly jsou základní složky všech rostlin. Jejich funkce v rostlinách se podobají funkcím cholesterolu u savců. V rostlinstvu jsou nejhojněji zastoupenými rostlinnými steroly β -sitosterol, kampesterol a stigmasterol. Chemická struktura těchto rostlinných sterolů je velmi podobná struktuře cholesterolu, od které se liší v postranním řetězci skeletu molekuly. Například v porovnání s cholesterolem postranní řetězec sitosterolu obsahuje další ethylovou skupinu a postranní řetězec kampesterolu další methylovou skupinu.

Od let 1950 je o rostlinných sterolech známo, že účinně snižují hladiny cholesterolu v séru. I když se podávají v relativně malých dávkách (několik gramů denně) tak snižují schopnost absorpce jak biliárního cholesterolu tak cholesterolu z potravy a tím snižují hladiny celkového a LDL-cholesterolu (12, 28, viz také 27, 32). Mechanismus, jakým toto omezení absorpce cholesterolu probíhá ještě není podrobně známo, ale předpokládá se, že rostlinné steroly vytěsňují cholesterol z micelární fáze a tím zabraňují jeho absorpci. V prakticky všech počátečních studiích byl hlavním

rostlinným steroidem jako předmětem studie sitosterol nebo jeho hydrogenovaná forma, sitostanol. Nicméně složení sterolů v testovaných přípravcích nebylo vždy dobře dokumentováno a sterolové přípravky použité ve většině studií také obsahovaly různá množství dalších sterolů.

Rostlinné steroly se pokládají za bezpečný prostředek snižování hladin cholesterolu, protože jsou přirozenými složkami rostlinných tuků a olejů. Navíc jejich absorpce ve střevě zdravých subjektů je omezená, a tato omezená absorbovaná množství jsou vylučována z těla žlučí. Absorpční poměr rostlinných sterolů se u jednotlivců různí a je různý mezi jednotlivými rostlinnými steroly, ale u zdravých lidí se obvykle z trávicího systému absorbuje méně než 5 % rostlinných sterolů (27). Bylo však zjištěno, že se absorbuje až 10 % kampesterolu z potravy (20).

U několika zřídka se vyskytujících nemocí jako je sitosterolemie, se rostlinné steroly absorbují vyjimečně účinně, a také jejich vylučování z těla biliárním systémem je zhoršená. Hladiny sitosterolu, kampesterolu a také jejich nasycených forem, sitostanolu a kampestanolu, v séru jsou vysoce zvýšené. Zvýšené hladiny nasycených stanolů jsou pravděpodobně způsobeny jejich účinnější endogenní syntézou než účinnější absorpcí (10, 27). Není-li sitosterolemie léčena, vede v mladém věku ke xantomatose a koronární chorobě srdce. Pro lidi trpící touto chorobou může podávání nenasycených rostlinných sterolů, v množství větším než je obvykle obsaženo v potravě, vést k vážným zdravotním důsledkům.

Lees a Lees (25) hodnotili účinky tří různých přípravků s obsahem sitosterolu na koncentrace lipidů a lipoproteinu v plasmě. Jedním z těchto přípravků byl obchodně dostupný

přípravek, Cytellin (Eli Lilly Co., USA), který obsahuje 60-65 % sitosterolu a 35-40 % dalších sterolů, hlavně kampesterolu. Podáváním průměrné dávky 18 g/den rozdělené do tří dávek mělo za následek v průměru 10,5% snížení celkového cholesterolu v plasmě a 15% snížení LDL-cholesterolu. Nicméně, jestliže obvykle jsou v plasmě zjišťovány pouze stopy rostlinných sterolů včetně kampesterolu (10, 33), v plasmě subjektů hodnocených ve studii Leese a Leese koncentrace kampesterolu v plasmě kolísaly od 4 do 21 mg/dl (25). V diskuzi autoři zdůrazňovali, že z důvodu že není známá aterogenicita kampesterolu, tak použití sitosterolového přípravku s relativně vysokým obsahem kampesterolu jako je v jejich studii použitý Cytellin, nelze doporučovat.

Dále, Lees a sp. (26) studovali účinnost rostlinných sterolů ze sojového oleje a talového oleje při snižování hladiny krevního cholesterolu. Použili dvě různé fyzikální formy pro každý sterol a to suspenzi a prášek. Sojový sterol obsahuje 60-65 % sitosterolu a 35 % kampesterolu a průměrná denní dávka 18 g sterolů denně (rozmezí 9-24 g) byla podávána ve třech stejných rozdělených dávkách. Do studie byl zahrnut sterolový přípravek z talového oleje obsahující pouze 5 % kampesterolu. Oba přípravky obsahující steroly z talového oleje (prášek a suspenze) byly hodnoceny při aplikaci denní dávky 3 g. Kromě toho bylo hodnoceno podávání dávky 6 g suspenze sterolů z talového oleje.

Sterol ze sojového oleje v obou fyzikálních formách a sterol z talového oleje ve formě prášku snížily obsah cholesterolu v plasmě v průměru o 12 % (26). Nicméně poměrně vysoká schopnost absorbovat se, která již byla zjištěna dříve, byla pozorována i v této studii. U 5 testovaných pacientů byly hladiny kampesterolu v plasmě v rozmezí 5 až 21 mg/dl (

průměrně 16 mg/dl). Opět tedy, i když byl ověřen významný účinek sterolu ze sojového oleje na snižování hladiny cholesterolu, autoři nedoporučují jeho použití jako prostředku pro snižování hladiny cholesterolu. Na rozdíl od toho autoři doporučují, aby farmaceutické přípravky obsahující rostlinné steroly obsahovaly minimum kampesterolu a maximum sitosterolu. Z těchto dvou studií které jsou citovány výše lze tedy vyvodit závěr, že použití rostlinných sterolů na bázi rostlinných olejů jako jsou steroly ze sojového oleje, se důrazně nedoporučuje.

Nasycené rostlinné steroly jako je sitostanol a kampestanol jsou ve většině rostlinných olejů přítomné jen ve stopových množstvích. Nicméně steroly z talového oleje obsahují 10-15 % sitostanolu, nenasycené formy sitosterolu. Sitostanol může být také připraven hydrogenací dvojné vazby sitosterolu. V posledních studiích, provedených jak s lidmi tak s pokusnými zvířaty, se ukázalo, že sitostanol je účinnější prostředek pro snižování hladiny cholesterolu než sitosterol (8, 16, 17, 18, 19, 36).

Další výhodou sitostanolu je, že je v podstatě neabsorbovatelný. V několika studiích (např. 9, 16, 17, 21) bylo zjištěno, že sitostanol je prakticky neabsorbovatelný zatímco malá množství (< 5 %) jeho nenasycené formy sitosterolu (33) se mohou absorbovat. Podobně bylo ve studii, kterou zpracovali Armstrong a Carey (6) zjištěno, že cholestanol, nasyčená forma cholesterolu, je více hydrofobní a méně absorbovatelný než cholesterol.

Při přípravě sitostanolu hydrogenací většiny obvyklých rostlinných zdrojů sterolů, se vytváří také další nasycený rostlinný sterol, totiž kampestanol, který vzniká z

kampesterolu. Dosud se poměrně málo ví o schopnosti absorbovat se a možném hypocholesterolemickém účinku tohoto stanolu. Na základě údajů uvedených výše konstatujících, že nasycené steroly jsou méně absorbovatelné než jejich nenasycené formy, lze vytvořit hypotézu, že kampestanol může být prakticky neabsorbovatelný.

Ve studii absorbovatelnosti různých rostlinných sterolů, kterou provedl Heinemann a sp. (20) bylo provedeno srovnání střevní absorpce cholesterolu s kampesterolem, sitosterolem a stigmasterolem, a také s nízkými koncentracemi sitostanolu a kampestanolu intestinálním perfusním způsobem. Z výsledků vyplynulo, že stupeň absorpce různých rostlinných sterolů se liší a je v průměru 4,2 % u sitosterolu, 4,8 % u stigmasterolu, 9,6 % u kampesterolu a 12,5% u kampestanolu. Na deseti subjektech, mužích, byla zjištěna velká variabilita v účinnostech absorpce.

Podle Heinemanna a sp. (20) tedy bylo zjištěno, že kampestanol se účinněji absorbuje než jeho nenasycená forma, kampesterol. To je v rozporu s předpokladem založeným na dřívějších studiích ve kterých se ukazovalo, že nasycené steroly (sitostanol, cholestanol) se absorbují méně než steroly nenasycené. Důvod proč bylo dosaženo tohoto výsledku zůstává nevyjasněný. Heinemann a sp. (20) pokládají za možné, že důvod tohoto konfliktního výsledku může spočívat v tom, že studie kterou zpracovali Amstrong a Carey (6) byla provedena za podmínek in vitro, a že teorie hydrofobicity, která je určujícím faktorem v micelární vazbě a/nebo absorpci nemusí být za podmínek in vivo důležitá. Nicméně v těchto úvahách nebyla vysvětlena skutečnost, že několik studií, ve kterých byla prokázána snížená absorbovatelnost sitostanolu ve srovnání se sitosterolem, bylo provedeno za podmínek in vivo.

Výsledky podle Heinemanna a sp. (20), které jsou v rozporu s předcházejícími výsledky, zůstávají tedy autory nevyvětlené.

Sugano a sp. (34) studovali hypocholesterolemickou aktivitu kukuřičných sterolů (složení: 31 % kampesterolu, 4 % stigmasterolu a 65 % sitosterolu) a kukuřičných stanolů (složení: 31 % kampestanolu a 69 % sitostanolu) získaných hydrogenací směsi sterolů z kukuřičného oleje. Byly provedeny dva pokusy na kryších. Jak steroly, tak stanoly prokázaly hypocholesterolemické účinky v hladinách 0,5–1 % v potravě při příjmu cholesterolu (1 % v potravě). V tomto prvním pokusu nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v hypocholesterolemickém účinku fytosterolů a fytostanolů. Nicméně v druhém pokusu, při stejných dávkách v potravě, se u fytostanolů projevila významně vyšší schopnost snižovat koncentraci cholesterolu v plasmě než u fytosterolů (statisticky významně při $p < 0,02$). Navíc, krysy krmené potravou s obsahem 1,0 % stanolů měly hladiny cholesterolu v plasmě významně nižší ($p < 0,02$) než zvířata krmená potravou prostou cholesterolu. To se neprojevilo u krys krmených potravou obsahující 1 % sterolů.

Sugano a sp. (34) nestudovali rozdíly v hypocholesterolemickém účinku mezi směsmi stanolů s vysokým obsahem sitostanolu a nízkým obsahem kampestanolu (steroly na bázi talového oleje) a směsmi stanolů s podstatně vyšším obsahem kampestanolu (steroly na bázi rostlinných olejů). Srovnávali hypocholesterolemický účinek směsi nenasycených sterolů s odpovídající směsí nasycených stanolů. Pozdější studie této výzkumné skupiny byly zaměřeny na specifický účinek sitostanolu na snížení hladiny cholesterolu ve srovnání se sitosterolem (21, 22, 23, 35). Ve skutečnosti autoři v pozdější publikaci (23), týkající se výše zmíněné studie fytostanolu (34), se zmiňují pouze o hypocholesterolemickém

účinku β -sitostanolu ve srovnání s β -sitostanolem, aniž by se zmínili o případném hypocholesterolemickém účinku nasycených sterolů (včetně kampestanolu) ve srovnání s nenasycenými steroly. V těchto pozdějších studiích uvedených výše byly použity směsi sterolů s typickým složením odpovídajícím hydrogenovaným sterolům talového oleje o vysokém obsahu sitostanolu (>90 %).

Miettinen a Vanhanen (30) zjistili, že pro snižování hladin cholesterolu je účinnější sitostanol ve formě esteru s mastnou kyselinou než volný sitostanol. V pozdějších studiích se ukázalo, že použití esterů sitostanolu ve formě součásti denní potravy je účinným způsobem pro snížení koncentrací celkového a LDL-cholesterolu (13, 14, 15, 31, 37, 38). Použití esterů stanolu místo volného stanolu je také prospěšné v tom, že estery stanolu jsou rozpustné v tucích a lze je tedy snadno včlenit do mnoha různých potravin bez změny chuti, vůně nebo fyzikálních vlastností konečného produktu. Způsob přípravy esterů sitostanolu s mastnými kyselinami a použití v tucích rozpustných esterů stanolu je uveden v US patentu č. 5,502,045 (2), který je včleněn do tohoto textu odkazem.

Straub (3) navrhl použití nasycených stanolů (sitostanolu, klionastanolu, 22,23-dihydrobrassikastanolu, kampestanolu a jejich směsí) ve způsobu přípravy potravinových doplňků, kde stanoly se smísí s poživatelným rozpustným prostředkem, účinným množstvím vhodného antioxidačního prostředku a účinným množstvím vhodného dispergačního prostředku. Tyto potravinové doplňky jsou určeny ke snížení absorpce cholesterolu z potravin a nápojů obsahujících cholesterol, například z masa, vajec a mléčných výrobků. Bohužel v tomto patentu nejsou uvedeny ani údaje týkající se případných klinických

20.04.99

výsledků ani údaje týkající se absorpce sterolů přijímaných v potravě.

Eugster a sp. (1) uvádějí použití malých množství sterolů, jejich esterů s mastnými kyselinami a glykosidy při léčbě tumorů. Způsoby přípravy navržené Eugsterem a sp., zahrnují použití nebezpečných chemických prostředků jako jsou N,N'-karbonyldiimidazol, thionylchlorid, a rozpouštědla jako jsou tetrahydrofuran, benzen, chloroform nebo dimethylformamid. Eugster a sp. upozorňují na možné použití těchto substancí jako dietetik a jako potravinových doplňků, ale neuvádějí žádné údaje týkající se hypocholesterolemického účinku a ani neuvádějí žádné patentové nároky zahrnující toto použití. Z vynálezu Eugstera a sp., je těžké udělat si jasný názor, jak se přečistí konečný produkt na dostatečně čistý ester sterolu v množstvích dostatečných pro použití ve formě potravinového doplňku. Jediné uváděné čistící postupy jsou chromatografie na tenké vrstvě a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato skutečnost omezuje způsob uvedený v patentu Eugstera a sp., pouze na omezená malá množství.

V US patentu 3,751,569 (4) je uveden přídavek esterů rostlinného sterolu do oleje pro kuchyňské účely s cílem snížit hladinu cholesterolu v séru u lidí. V uvedeném patentovém spise je navržen pro esterifikaci volných sterolů způsob, který v žádném případě nesplňuje požadavky na přípravu potravinářského produktu. Způsobem podle uvedeného patentového spisu se esterifikace provede s volným steroidem a anhydridem mastné kyseliny s kyselinou chloristou působící jako katalyzátor. Tento katalyzátor a použité reagující činidlo nelze při výrobě potravin akceptovat. Kromě toho se uvedený patentový spis týká pouze esterů přirozeně se vyskytujících sterolů s mastnými kyselinami. Způsob navržený v německém

patentu DE 22 48 921 (5) pro provedení esterifikace sterolů přítomných v olejích a tucích pomocí interesterifikace splňuje kritéria pro potravinářské způsoby. Podle tohoto patentu se volný sterol a přebytek esterů mastných kyselin přidají ke směsi oleje nebo tuku načež se provede interesterifikace veškeré směsi na bázi tuků obvyklými způsoby. Ve výsledné směsi tuků jsou pak prakticky veškeré volné steroly převedeny na estery s mastnými kyselinami. Účelem tohoto způsobu je chránit volné steroly v rostlinných a živočišných olejích proti možným změnám během jejich zpracování.

V časných studiích bylo zjištěno, že kampesterol, jeden z hlavních rostlinných sterolů se absorbuje poměrně účinně. Proto bylo doporučeno, aby se používala pouze směs rostlinných sterolů s minimálním obsahem kampesterolu. To vedlo v praxi k použití sterolových směsí, jako jsou steroly z talového oleje s vysokým obsahem sitosterolu.

Většina prací týkající se stanolů zahrnuje pouze sitostanol. Ve studii provedené Heinemannem a sp. (20), bylo zjištěno, že kampestanol, nasycená forma kampesterolu se absorbuje snadněji než kampesterol nebo sitosterol (12,5 %, 9,6 %, a 4,2 % v příslušném pořadí), což vedlo ke "konsensu", že směsi nasycených sterolů se "zvýšenými" hladinami kampestanolu nejsou bezpečné díky absorpci kampestanolu. Jasný důkaz tohoto tvrzení je v tom, že všechny klinické studie zabývající se použitím stanolů (sitostanol) byly provedeny na základě směsi sterolů s vysokou hladinou sitostanolu a s nízkou hladinou kampestanolu.

Z mnoha studií vyplynula skutečnost (např. 8, 17, 18, 19, 23, 36), že sitostanol, nasycená forma sitosterolu je více účinný než odpovídající nenasyčený sitosterol při snižování

hladiny krevního cholesterolu. Dále, nasycené steroly se absorbují ve velmi omezených množstvích, což činí použití nasycených sterolů bezpečným prostředkem snižování cholesterolu z hlediska obyvatelstva. Z nenasyčených sterolů se zejména kampesterol se absorbuje v množstvích dostatečně vysokých k tomu, aby to vyvolalo důrazná upozornění proti používání směsí sterolů se zvýšenými hladinami kampesterolu (například směsí sterolů na bázi rostlinných olejů) (25, 26).

Z výše uvedených studií vyplynul důrazný předpoklad proti použití kampestanolu ve významnějších množstvích při jeho použití ve formě složky přidávané k potravinám, což výrazně omezilo spektrum surovin obsahujících fytosterol na suroviny obsahující poměrně nízké množství kampesterolu a jeho nasycené složky, kampestanolu.

Podstata vynálezu

Vynález se týká kompozice rostlinných stanolů obsahující jako hlavní složku sitostanol, ale rovněž obsahující významná množství kampestanolu, buď ve volné formě nebo v esterifikované formě jako estery nasycených mastných kyselin, která je určena pro snižování hladiny cholesterolu v krevním séru.

Vynález se dále týká použití kompozice rostlinných stanolů obsahující jako hlavní složku sitostanol, ale také obsahující významná množství kampestanolu, nebo jejich esterů s mastnými kyselinami, v potravinářských produktech ve formě dietetické složky snižující hladiny cholesterolu v krevním séru.

Cílem vynálezu je rozšířit spektrum surovin rostlinného

20.04.99

původu vhodných pro přípravu složek pro použití v potravinářských produktech, zejména v olejích a tucích pro potravinářské použití a v potravinách obsahujících tuky, které jsou určeny pro řízení hladin cholesterolu v krevním séru. Vynález umožňuje pro tento účel použití surovin, zahrnujících rostlinné oleje a tuky, které obsahují kromě sitosterolu také významná množství kampesterolu.

Vhodné suroviny pro použití při přípravě kompozic podle vynálezu jsou například kukuřice, sojové boby a semeno řepky, ale lze použít také další rostliny obsahující vysoký podíl kampesterolu ve fytosterolech.

Tuto novou kompozici podle vynálezu a zejména její esterifikovanou formu lze včlenit do potravin jako jsou jedlé oleje, margariny, máslo, majonézy, přísady do salátů, tuky do pečiva, sýry (zahrnujících nezrající i zrající) a další potraviny obsahující tuky.

Kompozici podle vynálezu lze také požívat jako takovou.

Podrobný popis vynálezu

Podle předloženého vynálezu kompozice rostlinných stanolů obsahuje kromě své hlavní složky, sitostanolu, také významná množství, nejméně 10 % kampestanolu.

Kompozice výhodně obsahuje od 20 % do 40 % a nejvýhodněji od 25 % do 35 %, například 30 % kampestanolu nebo jeho esteru s mastnou kyselinou, přičemž esterifikovaná kompozice se stane lipofilní.

V tomto popise jsou všechny procentuální údaje pokud není

uvedeno jinak, uvedeny v procentech hmotnostních. V tomto popise čísla v závorkách odpovídají publikacím, jejichž seznam je připojen dále.

Ze získaných údajů překvapivě a proti převládající zaujatosti vyplynulo, že hydrogenovaná stanolová směs obsahující sitostanol jako hlavní složku, ale s významnými množstvími kampestanolu, je nejméně tak účinná jako stanolová směs obsahující nad 90 % sitostanolu a nižší podíly kampestanolu, z čehož vyplývá, že kampestanol je přinejmenším stejně účinný při snižování absorpce cholesterolu jako sitostanol. Navíc z údajů získaných analýzou sterolů z krevního séra bylo jasné prokázáno, že kampestanol se prakticky neabsorbuje a jeho obsah v krevním séru je asi o 40 % menší než obsah sitostanolu. Stanolovou směs obsahující sitostanol jako hlavní složku, ale s významnými množstvími kampestanolu, je tedy nutné pokládat přinejmenším za stejně bezpečnou jako obvyklou stanolovou směs na bázi talového oleje. Tyto údaje jsou v příkrém rozporu s běžně přijímaným názorem týkajícím se účinnosti a neškodnosti stanolových směsí se zvýšenými obsahy kampestanolu (viz 20, 27, 34).

US patent č. 5,502,045 (2) uvádí, že estery sitostanolu s mastnými kyselinami jsou při snižování hladiny krevního cholesterolu účinnější než volný sitostanol. V pozdějších studiích byl jasné potvrzen cholesterol snižující účinek margarínu obsahujícího v tučích rozpustné estery sitostanolu s mastnými kyselinami (např. 31).

Použití esterů stanolu s mastnými kyselinami místo volných stanolů je rozhodující pro jejich široké použití v různých tuky obsahujících potravinářských produktech, protože pouze estery stanolu s mastnými kyselinami jsou rozpustné v

20.04.99

jedlých olejích a tucích v množstvích dostatečně vysokých pro dosažení hladin účinných pro snižování absorpce jak cholesterolu z potravy tak biliárního cholesterolu z trávicího systému.

Rozpustnost esterů stanolu v jedlých olejích a tucích je až 35-40%, zatímco rozpustnost volných sterolů v jedlých olejích a tucích je omezena na pouze 2 % při teplotě 21 °C (24). Vyšší množství by mohlo být včleněno použitím různých povrchově aktivních prostředků, solubilizačních nebo dispergačních prostředků, ale ani použití těchto prostředků nezajišťuje rozpustnost v tucích. Navíc, volné steroly v dávce 1 % ovlivňují fyzikální vlastnosti tuku nebo oleje, což vyvolává změny ve struktuře a ve fyzikálním chování produktu. To se nestává v případě použití esterů stanolu s mastnými kyselinami, protože fyzikální vlastnosti tukové směsi lze snadno modifikovat změnou složení mastných kyselin směsi.

Je zřejmé, že estery stanolu s mastnými kyselinami lze snadno včlenit do dalších potravin než jsou margariny a pomazánky jako uvádí tento vynález. US patent č.5,502,045 (2) poskytuje další příklady možného využití. Pro pracovníky v oboru však bude zřejmé, že estery stanolu s mastnými kyselinami lze přidávat k rozmanitým potravinám, zejména k potravinám obsahujícím tuky.

Bylo již navrženo mnoho způsobů přípravy esterů sterolů s mastnými kyselinami. Nevýhodou těchto způsobů je, že ve většině z nich se používají činidla, která nelze při výrobě produktů, určených jako makronutriční složky potravin, akceptovat. Obvyklé je použití toxických prostředků jako je thionylchlorid nebo mastné kyseliny ve formě svých anhydridů.

20.04.99

Výhodný způsob přípravy esterů sterolů s mastnými kyselinami je popsán v US patentu č. 5,502,045 (2, který je včleněn do tohoto textu odkazem). Tento způsob, který je založen na interesterifikaci, je široce používán v průmyslu výroby jedlých olejů a tuků. Tento esterifikační způsob se výhodně liší od předcházejících způsobů v tom, že se v něm nepoužívají jiné složky než volný stanol, ester mastné kyseliny nebo směs esterů mastných kyselin a interesterifikační katalyzátor jako ethylat sodný. Jedním důležitým rysem tohoto způsobu je, že jedna z reagujících složek, ester mastné kyseliny, se použije v přebytku a působí jako rozpouštědlo, přičemž rozpouští stanol za použitých podmínek (vakuum, 5-15 mm Hg). Reakcí se získá směs esterů mastných kyselin a esterů stanolu s mastnými kyselinami. Estery stanolu s mastnými kyselinami lze snadno zahustit na téměř čisté estery stanolu s mastnými kyselinami destilací ve vakuu, při které se odstraní přebytek esterů mastných kyselin. Alternativně lze směs přidat jako takovou do konečné tukové směsi před provedením dezodorace.

Stanoly se přirozeně nacházejí například v pšenici, žitě, kukuřici a "tritricale" a mohou se proto vyskytovat v malých množstvích (11, 14) v denní potravě. Stanoly lze snadno připravit hydrogenací směsí sterolů přirozeného původu. Počátkem roku 1996 byly v dostatečné čistotě pro použití v uvedených potravinách dostupné pouze směsi sterolů z talového oleje (obsah sterolů > 98 %). Rostlinné steroly s významnými podíly kampesterolu jako jsou směsi sterolů na bázi rostlinného oleje, lze získat jako vedlejší produkt výroby tokoferolu z destilátů rostlinného oleje. Získané rostlinné steroly lze převést na stanoly již známými způsoby hydrogenace jako jsou způsoby založené na použití PD/C katalyzátoru v organických rozpouštědlech (práce 7, která je včleněna do

tohoto textu odkazem). Pracovníkovi v oboru bude zřejmé, že k provedení hydrogenace lze použít různé Pd katalyzátory a rozpouštědla a že při provedení za optimálních podmínek zůstane pouze malé množství nenasycených sterolů nekonvertováno a tvorba typických dehydroxylovaných vedlejších produktů, stanových a stenových sloučenin zůstane na nízké úrovni (< 1,5 %).

V předloženém vynálezu je provedeno srovnání hypocholesterolemického účinku stanolové směsi obsahující vysoký podíl sitostanolu, který je obecně experty v tomto oboru pokládán za nejbezpečnější a nejúčinnější rostlinný sterol při snižování absorpce cholesterolu a tím hladin cholesterolu v séru, se stanolovou směsí obsahující významný podíl kampestanolu. V tomto popisu jsou poprvé uvedeny hypocholesterolemické účinky stanolů na bázi rostlinných olejů u lidí. V tomto vynálezu bylo poprvé zjištěno, že směs stanolů s významným podílem kampestanolu (nad 10 % a výhodně asi 30 %) je přinejmenším stejně účinná jako směsi stanolů s vysokými podíly sitostanolu. Dále, navíc, výsledky předložené studie jasně ukazují na to, že kampestanol na rozdíl od údajů uváděných Heinemannem a sp. (20), se prakticky neabsorbuje.

Klinické studie

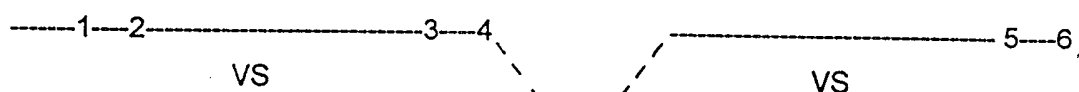
K hodnocení hypocholesterolemických účinků stanolesterového margarínu na bázi rostlinných olejů a stanolesterového margarínu na bázi talového oleje byla navržena 5-týdenní dvojitá slepá zkřížená studie s 2-týdenním vymývacím obdobím. Zkušební uspořádání této studie bylo následující:

Zkušební uspořádání intervenční studie

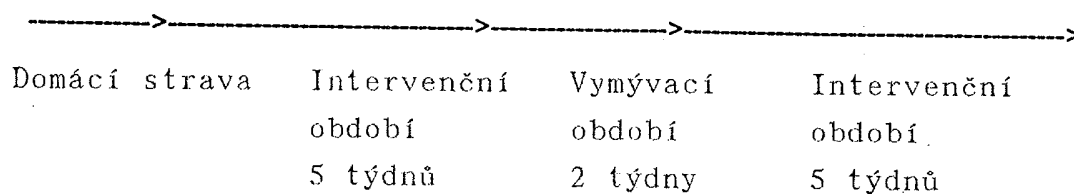
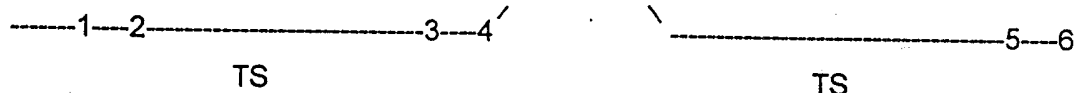
20.04.99

Čísla 1-6 označují odebrané vzorky krve a to při domácí stravě (1,2), po prvním intervenčním období (3,4) a po druhém intervenčním období (5,6). VS = stanolesterový margarín na bázi rostlinného oleje, TS = stanolesterový margarín na bázi talového oleje.

Skupina 1 (n=12)



Skupina 2 (n=12)



Dvacetčtyři dobrovolníků, zdravých, volně žijících žen s mírně zvýšenou hladinou cholesterolu (průměrně $6,12 \pm 0,16$ mmol/l) požívalo v náhodném výběru asi 25 g denně (tuba obsahu 250 g/10 dní) jako součást denní výživy. Byly stanoveny hodnoty obsahu lipidů v séru (celkový cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol a triglyceridy) a obsahy sterolů v séru při domácí stravě a na konci každého zkušebního období. Vzorky krve byly odebírány dvojnásobně, jeden týden po domácí stravě, a na konci každého zkušebního období s margarínem. Získané hodnoty týkající se obsahu lipidů v séru

jsou uvedeny níže v tabulce 1.

Tabulka 1

Koncentrace lipidů v séru (mmol/l, průměr $\pm$ SE) při domácí stravě a po pěti-týdenním ošetřování stanolesterovým margarinem na bázi rostlinného oleje (VS) a stanolesterovým margarinem na bázi talového oleje (TS), (n=24).

	domácí strava	VS	TS
celkový cholesterol	6,12 $\pm$ 0,16	5,77 $\pm$ 0,18*	5,95 $\pm$ 0,23
LDL-cholesterol	4,03 $\pm$ 0,15	3,60 $\pm$ 0,17*	3,76 $\pm$ 0,19*
HDL-cholesterol	1,54 $\pm$ 0,09	1,62 $\pm$ 0,09*	1,63 $\pm$ 0,10*
triglyceridy	1,22 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,15

* $p < 0,05$ nebo méně

Oba margarínové testy vyvolaly příznivé změny v obsahu lipidů v séru. Snížení hodnot LDL-cholesterolu a zvýšení hodnot HDL-cholesterolu bylo statisticky významné ($p < 0,05$ nebo méně). Dále, aplikace esterů sterolu na bázi rostlinného oleje měla za následek statisticky významné snížení celkového cholesterolu. Při aplikaci stanolesterového margarínu na bázi rostlinných olejů bylo získané snížení celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu vyšší než při aplikaci stanolesterového margarínu na bázi talového oleje. Nebyly zjištěny žádné změny v hladinách triglyceridů. Ze získaných výsledků sérových lipidů vyplývá, že stanolesterový margarín na bázi rostlinného oleje obsahující významné množství kampestanolu ve stanolové frakci může být ještě účinnější než stanolesterový margarín na bázi talového oleje. V dřívějších studiích (14, 15, 31) bylo zjištěno, že stanolesterový margarín na bázi talového oleje má významné hypocholesteromické účinky. Na základě výsledků

této zkřížené studie lze tedy vyvodit závěr, že stanoly na bázi rostlinných olejů vykazují přinejmenším stejné hypocholesterolemické účinky jako stanoly na bázi talového oleje.

Kvantitativní stanovení koncentrací sterolu v séru bylo provedeno metodou plynové chromatografie podle publikovaného způsobu (29, kde tato práce je včleněna do textu odkazem). Byly vypočteny průměrné hodnoty dvou měření obsahu lipidů v séru ze vzorků krve odebraných v daném časovém období. Údaje týkající se středních koncentrací rostlinného sterolu při domácí stravě a po každém testovacím období a průměrné změny těchto koncentrací jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3 uvedených níže.

Tabulka 2

Koncentrace rostlinných sterolů v séru (průměr $\pm$ SE, μ g/dl) při domácí stravě a po každém období ošetření (n=24). VS = stanolesterový margarín na bázi rostlinného oleje, TS = stanolesterový margarín na bázi talového oleje.

	domácí strava	VS	TS
kampestanol	47 $\pm$ 2	58 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3
sitostanol	94 $\pm$ 3	92 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5
kampesterol	472 $\pm$ 37	337 $\pm$ 25	350 $\pm$ 28
sitosterol	277 $\pm$ 17	198 $\pm$ 12	227 $\pm$ 15

* $p < 0,05$ nebo méně

20.04.99

Tabulka 3

Průměrné změny ($\pm$ SE) koncentrací rostlinných sterolů v séru ($\mu\text{g/dl}$), ($n=24$). VS = stanolesterový margarín na bázi rostlinného oleje, TS = stanolesterový margarín na bázi talového oleje.

	Δ (VS - HD)	Δ (TS - HD)	Δ (VS - TS)
kampestanol	$11 \pm 2^*$	0 ± 2	$11 \pm 2^*$
sitostanol	-2 ± 3	2 ± 4	-4 ± 4
kampesterol	$-134 \pm 19^*$	$-122 \pm 21^*$	-12 ± 13
sitosterol	$-80 \pm 11^*$	$-51 \pm 12^*$	$-29 \pm 8^*$

* $p < 0,05$ nebo méně

V obou margarínových testech se významně projevilo snížení hladin sérového kampesterolu a sérového sitosterolu. Je známé, že koncentrace kampesterolu v séru odráží u lidí absorpci cholesterolu ve střevě (29, 39). Čím nižší je tedy hodnota kampesterolu, tím méně je absorbováno střevního cholesterolu.

Zaznamenané snížení hladin sérového kampesterolu (25-28 %) v průběhu studie indikuje, že oba stanolesterové margaríny margaríny snižují absorpci cholesterolu ve střevě. Dále nebyly patrné žádné difference v koncentracích sitostanolu v séru, zatímco střední koncentrace kampestanolu po období aplikace stanolesteru z rostlinného oleje bylo významně vyšší než po období domácí stravy a po období aplikace stanolesteru z talového oleje. Nicméně absolutní koncentrace kampestanolu činila pouze asi 63 % koncentrace sitostanolu, který je obecně pokládán za prakticky neabsorbovatelný. Tato nízká koncentrace kampestanolu v séru jasně indikuje, že kampestanol se absorbuje velmi omezeně, což je v rozporu s

výsledky uváděnými Heinemannem a sp. (20). Protože směsi stanolů obsahující vysoké podíly sitostanolu se pro přijímání lidmi pokládají za neškodné, směsi stanolů obsahující významná množství kampestanolu je nutné pokládat na základě skutečnosti, že kampestanol je podobně jako sitostanol prakticky neabsorbovatelný, za stejně neškodné.

Podrobněji je příprava stanolesterové kompozice podle vynálezu a margarínů použitých ve výše uvedených klinických studiích uvedena v následujících pracovních příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Hydrogenace směsi sterolů

Obchodně dostupná směs sterolů získaná z destilátu z rostlinného oleje (složení: brassikasterol 2,7 %, kampesterol 26,7 %, stigmasterol 18,4 %, sitosterol 49,1 %, a sitostanol 2,9 %) se hydrogenuje v poloprovozním reaktoru (25 l). Do reaktoru se zavede 26 g vláknitého Pd katalyzátoru (Smop-20; obsah Pd 10 % hmotn., Smoptech, Turku, Finsko), 26 g destilované vody pro aktivaci katalyzátoru a 11,7 kg propanolu. Reaktor se propláchne dusíkem a provede se 30 minutová aktivace katalyzátoru plynným vodíkem při tlaku 1 baru a při teplotě 65 °C. Po aktivaci se směs ochladí na 40 °C a potom se přidá 1,3 kg směsi sterolů.

Směs sterolů v propanolu se zahřeje v atmosféře dusíku na 65 °C, načež se dusík zamění za vodík. Po důkladném propláchnutí vodíkem se provede hydrogenační reakce při tlaku vodíku 1 baru. Obvyklá doba konverze je asi 120 minut. Konverzi lze snadno sledovat odebíráním vzorků, které se

20.04.99

analyzují HPLC.

Pak se tlak vodíku přeruší a reaktor se promyje dusíkem. Vláknitý katalyzátor se odfiltruje pomocí tlaku dusíku. Stanolová směs v propanolu se nechá přes noc při 10 °C vykristalizovat, načež se krystaly stanolu odfiltrují za vakua a koláč se promyje pomocí 0,5 kg chladného propanolu. Získaná směs stanolů se vysuší při 60 °C ve vakuovém boxu. Výtěžek je 75 % a složení získané stanolové směsi pomocí kapilární GC chromatografie bylo následující: kampesterol 0,2 %, kampestanol 28,9 %, stigmasterol 0,1 %, sitosterol 0,2 %, sitostanol 70,1 %. Je třeba poznamenat, že brassikasterol se hydrogenuje na 24- β -methyl-cholestanol, což je epimer kampestanolu, který je však při obvyklém kapilárním plynově chromatografickém stanovení, které neumožňuje separaci na základě chiralit, zahrnut v píku kampestanolu a je obvykle i kalkulován jako kampestanol. Počítáno na původní směs sterolů by obsah 24- β -methyl-cholestanu měl být 2,7 %.

Příklad 2

Příprava esterů stanolu s mastnými kyselinami

Směs esterů stanolů s mastnými kyselinami se připraví v poloprovozním měřítku. 6 kg stanolů získaných spojením několika šarží získaných hydrogenacním způsobem podle příkladu 1 bylo vysušeno přes noc při 60 °C a esterifikováno s methylesterovou směsí z řepkového oleje o nízkém obsahu kyseliny erukové. Sterolové složení použité stanolové směsi bylo následující: kampesterol 0,4 %, kampestanol (+24- β -methyl-cholestanol) 29,7 %, stigmasterol 0,1 %, sitosterol 0,4 %, a sitostanol 68,0 %. Obsah stanolu ve směsi byl 98,2 %. Esterifikace byla provedena následujícím způsobem.

20.04.99

Směs stanolů a methylesterů mastných kyselin z řepkového oleje o nízkém obsahu kyseliny erukové se zahřívá v nádobě reaktoru při 90-120 °C ve vakuu 5-15 mm Hg. Po 1 hodinovém sušení se přidá 21 g Na-ethylátu a reakce se nechá probíhat asi 2 hodiny. Pak se katalyzátor rozloží přidavkem 30 % vody (hmotnostních) při 90 °C. Po rozdělení fází se vodná fáze odstraní a druhá fáze se promyje. Po oddělení vodné fáze se olejová fáze suší při 95 °C ve vakuu za míchání 200 ot/min. Pak se směs stanolů s mastnými kyselinami mírně bělí 20 minut při 30 mm Hg a teplotě 110 °C s 1 % bělící hlínky (Tonsil Optimum FF, Südchemie, Německo) za působení míchání 200 ot/min. Potom se bělící hlínka odfiltruje a získaná směs methylesterů mastných kyselin a esterů stanolu s mastnými kyselinami se může přidat jako taková ke směsím obsahujícím tuky před deodorací nebo se přebytek methylesterů může oddestilovat ve vakuu. Směs lze tedy deodorovat na směs esterů stanolu s mastnými kyselinami která je bez chuti, a lze ji přidávat jako takovou při různých způsobech výroby potravin.

Konverze tohoto esterifikačního způsobu je obvykle > 99 % stanovených rychlou metodou HPLC a výtěžek se pohybuje okolo 95 %.

Příklad 3

Příprava margarínů pro klinické studie

V poloprovozním zařízení Gerstenberg & Agger 3 x 57 byly připraveny 80% margaríny obsahující estery stanolů na bázi talového oleje s mastnými kyselinami a estery stanolů na bázi rostlinného oleje s mastnými kyselinami. Estery stanolů na bázi talového oleje s mastnými kyselinami byly získány z běžné výroby Benecol[®] margarínu, Raisio Margariini, Finsko. Bylo použito obvyklé tukové směsi prosté trans-nasycených mastných

20.04.99

kyselin (složení: 30 % nehydrogenovaného interesterifikovaného rostlinného tuku a 70 % tekutého LEAR oleje) ke které byly přidávány směsi stanolů s mastnými kyselinami. Postup byl proveden tak, aby obsah stanolů v konečném produktu byl 12 g/100 g produktu, což umožnilo denní příjem 3 g stanolů v použité dávce 25 g/den. Produkty byly připraveny s následujícím složením:

-tuková směs obsahující estery stanolu s mastnými kyselinami	80 %
-voda	19 %
-sůl	0,5 %
-emulgátor, Dimodan BP	
-hydrogenuhličitan sodný a kyselina citronová jako prostředky pro úpravu pH	
-β-karoten jako barvivo	
-prostředky pro ovlivnění chuti a vůně	

Získané margariny byly rozplněny do 250 g polypropenových tub, které byly utěsněny hliníkovou fólií. Chuť a struktura těchto produktů byly stejné jako u prodáváných margarínů.

Obsah stanolů na bázi talového oleje v margarínu byl 12,7 g/100 g produktu a obsah stanolů na bázi rostlinného oleje v margarínu byl 12,6 g/100 g produktu. Složení sterolů těchto dvou produktů bylo následující:

20.04.99

stanolový margarín na
bázi talového oleje

stanolový margarín
na bázi rostlinného oleje

brassikasterol	0,3 %	0,4 %
kampesterol	2,2 %	2,4 %
kampestanol	7,5 %	27,6 %
sitosterol	7,4 %	4,2 %
sitostanol	82,5 %	63,8 %
další	0,1 %	1,6 %

Seznam citací

Specifikace US patentů

Citace č.

1. Eugster C., Eugster C., Haldemann W., Rivara G., Sterols, their fatty acid esters and glycosides; processes for their preparation; spontaneously dispersable agents containing these compounds, and their use for treatment of tumors. 1993. US patent č. 5,270,041.
2. Miettinen TA., Vanhanen H., Wester I., Use of stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level. 1996. US patent č. 5,502,045.
3. Straub CD., Stanols to reduce cholesterol absorption from foods and methods of preparation and use thereof. 1993. US patent č. 5,244,887.
4. Clear cooking and salad oils having hypocholesterolemic properties. 1973. US patent č. 3,751,569.

20.04.99

Specifikace dalších patentů

5. Baltes J., Merkle R., Verfahren zur Herstellung eines Gemisches aus pflanzlichen und tierischen Ölen bzw. Fetten und Fettsäureesternestern. German patent DE 22 48 921.

Další publikace

6. Armstrong MJ., Carey MC., Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. J.Lipid.Res. 1987; 28: 1144-1155.
7. Augustine RL., Reardon Jr EJ., 1969. The palladium catalyzed hydrogenation of cholesterol. Org.Prep. and Proced. 1969; 1: 107-109.
8. Becker M., Staab D., von Bergmann K., Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. J.Pediatr. 1993; 122: 292-296.
9. Czubayko F., Beumers B., Lammsfuss S., Lütjohann D., von Bergmann K., A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. J.Lipid.Res. 1991; 32: 1861-1867.
10. Dayal B., Tnt GS., Batta AK., Speck J., Khachadurian AK., Shefer S., Salen G., Identification of 5- α stanols in patients with sitosterolemia and xanthomatosis: stereochemistry of protonolysis of steroidal organoboranes. Steroids 1982; 40: 233-243.
11. Dutta PC., Appelqvist LA., Saturated sterols (stanols) in

20.04.99

- unhydrogenated and hydrogenated edible oils and in cereal lipids. *J.Sci.Food Agric.* 1996; 71: 383-391.
12. Grundy SM., Mok HYI., Effects of low dose phytosterols on cholesterol absorption in man. Greten H. (Ed.), *Lipoprotein metabolism*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 112-118.
 13. Gylling H., Miettinen TA., Serum cholesterol lowering by dietary sitostanol as associated with reduced absorption and synthesis of cholesterol and decreased transport of LDL apoprotein B in Men with type II diabetes. Gotto jr AM., Mancini M., Richter WO., Schwandt P., (Eds). *Treatment of severe dyslipoproteinemia in the prevention of coronary heart disease*. 4th Int.Symp., Munich 1992, Karger, Basel 1993: 57-59.
 14. Gylling H., Miettinen TA., Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholestrolemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment. *Diabetologia* 1994; 37: 773-780.
 15. Gylling H., Siimes MA, Miettinen TA. Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia. *J.Lipid.Res.*1995; 36: 1807-1912.
 16. Hassan AS., Rampone AJ., Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β -sitostanol in the rat. *J.Lipid Res.*1979; 20: 646-653.
 17. Heinemann T., Leiss O., von Bergmann K., Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with

20.04.99

- hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1986; 61: 219-223.
18. Heinemann T., Pietruck B., Kullack-Ublick G., von Bergmann K., Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption. *Agents Actions* (Suppl) 1988; 26: 117-122.
 19. Heinemann T., Kullak-Ublick G-A., Pietruck B., von Bergmann K., Mechanism of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1991; 40: 59-63.
 20. Heinemann T., Axtmann G, von Bergmann K., Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different sterols in man. *Eur.J.Clin.Invest.* 1993; 23: 827-831.
 21. Ikeda I., Sugano M., Comparison of absorption and metabolism of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *Atherosclerosis* 1978; 30: 227-237.
 22. Ikeda I., Tanabe Y., Sugano M., Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J.Nutr. Sci. Vitaminol* 1989; 35: 361-369.
 23. Ikeda I., Kawasaki A., Samezima K, Sugano M., Antihypercholestrolemic activity of β -sitostanol in rabbits. *J.Nutr.Sci.Vitaminol* 1981; 27: 243-251.
 24. Jandacek RJ., Webb MR., Mattson FH., Effect of aqueous phase on the solubility of cholesterol in an oil phase. *J.Lipid Res.* 1977; 18: 203-210.
 25. Lees RS., Lees AM., Effects of sitosterol therapy on

20.04.99

- plasma lipid and lipoprotein concentrations. Greten H., (Ed). Lipoprotein metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 119-124.
26. Lees AM., Mok HYI., Lees RS., McCluskey MA., Grundy SM., Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with cholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977; 28: 325-338.
 27. Ling WH., Jones PHJ., Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences* 1995; 57: 195-206.
 28. Matson FH., Grundy SM., Crouse JR., Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am.J.Clin.Nutr.* 1982; 35: 697-700.
 29. Miettinen TA., Koivisto P., Non-cholesterol sterols and bile acid production in hypercholesterolaemic patients with ileal bypass. Paumgartner G., Stiehl A., Gerok W., (Eds). *Bile acid and concentration in health and disease.* MTP Press, Boston 1983: 183-187.
 30. Miettinen TA., Vanhanen H., Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis* 1994; 105: 217-226.
 31. Miettinen TA., Puska P., Gylling H., Vanhanen H., Vartiainen E., Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *New Engl.J.Med.* 1995; 333: 1308-1312.

20.04.99

32. Pollak OJ., Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis. *Pharmac.Ther.* 1985; 31: 177-208.
33. Salen G., Ahrens jr. EH., Grundy SM., Metabolism of β -sitosterol in man. *J.Clin.Invest* 1970. 49: 952-967.
J.Nutr.Sci Vitaminol 1981; 27: 243-251.
34. Sugano M., Kamo F., Ikeda I., Morioka H., Lipid Lowering activity of phytosterols in rats. *Atherosclerosis* 1976; 24: 301-309.
35. Sugano M., Morioka H., Ikeda I., A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *J.Nutr.* 1977; 107: 2011-2019.
36. Vanhanen HT., Miettinen TA., Effects of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents. *Clin.Chim.Acta* 1992; 205: 97-107.
37. Vanhanen HT., Blomqvist S., Enholm C., Hyvönen M., Jauhiainen M., Torstila I., Miettinen TA. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J.Lipid Res.* 1993; 34: 1535-154.
38. Vanhanen HT., Kajander J., Lehtovirta H., Miettinen TA. serum levels, absorption efficiency, faecal elimination and synthesis of cholesterol during increasing doses of dietary sitostanol esters in hypercholesterolaemic subjects. *Clin.Sci.* 1994; 87: 61-67.

20.04.99

39. Tilvis RS., Miettinen TA., Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. Am.J.Clin.Nutr. 1986; 43: 92-97.

P A T E N T O V É N Á R O K Y ~~změněné~~

1. Kompozice rostlinných stanolů určená k použití jako prostředek pro snížení hladiny cholesterolu v séru, obsahující sitostanol, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje nejméně 10 % kampestanolu, s touto výhradou, že tato kompozice neobsahuje 31 % kampestanolu a 69 % sitostanolu.

2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje od 20 % do 40 %, výhodně od 25 % do 35 % kampestanolu.

3. Kompozice podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje od 50 % do 80 % sitostanolu.

4. Kompozice esterů rostlinných stanolů s mastnými kyselinami obsahující ester sitostanolu s mastnou kyselinou určená pro použití jako prostředek pro snižování hladiny cholesterolu v séru, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tato kompozice dále obsahuje nejméně 10 % esteru kampestanolu s mastnou kyselinou.

5. Kompozice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje od 20 % do 40 % , výhodně od 25 % do 35 % , například asi 30 % esteru kampestanolu s mastnou kyselinou.

6. Kompozice podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje od 50 % do 80 % esteru sitostanolu s mastnou kyselinou.

7. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 6 jako takové nebo ve formě součásti potravy, například jako součásti potravin obsahujících tuky, pro snížení hladin sérového cholesterolu.

20.04.99

8. Potravinářská substance obsahující kompozici rostlinného sterolu v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sitostanol nebo jeho ester s mastnou kyselinou účinný při snižování hladin sérového cholesterolu, a kde tato kompozice dále obsahuje významná množství kampestanolu nebo jeho esteru s mastnou s kyselinou tak, že hmotnostní poměr kampestanolu nebo jeho esteru s mastnou kyselinou k sitostanolu nebo jeho esteru s mastnou kyselinou je 1 : 9 až 4 : 6 s výhradou, že stanolová kompozice neobsahuje volné stanoly obsahující 31 % kampestanolu a 69 % sitostanolu.

9. Potravinářská substance podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený poměr je v rozmezí od 2 : 8 do 3,5 : 6,5.

10. Použití fytosterolové směsi, obsahující kromě sitosterolu významné množství kampesterolu, jako suroviny pro přípravu kompozice nebo potravinářské substance pro snižování hladiny cholesterolu v séru podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, 8, 9.