



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **302**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **7 C07J 9/00, A61K 31/575,**
A61P 3/06

(12) **Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 97000458
(22) 29.09.95
(31) 314.945
(32) 29.09.94
(33) US
(46) 06.08.2001, Бюл.№2 (22)
(86) PCT/CA 95/00555, 29.09.95
(72) Эгон НОВАК, Джеймс П.КАТНИ, Питер Дж.
ДЖОНС (СА)
(71)(73) ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ БРИТИШ КО-
ЛУМБИЯ (СА)
(56) FR 2510118, 1983
US 3965085, 1974

US 4044031, 1977
Л.ФИЗЕР, М.ФИЗЕР, “Стероиды”, Москва,
“Мир”, 1964, с.363.
(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ФИ-
ТОСТЕРОЛОВ, КОМПОЗИЦИИ, ТЕРАПЕВТИ-
ЧЕСКИЙ ПРОДУКТ
(57) Настоящее изобретение относится к способу
получения и очистки композиции растительных
стеролов из мыла в виде пульпы, включающему
экстракцию из мыла в виде пульпы кремообразного
осадка и очистки этого осадка с получением компо-
зиции.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к получению и выделению композиции стеролов из мыла в виде пульпы, к композициям *per se*, и к использованию этих композиций и их производных в качестве агентов для профилактики и лечения первичной и вторичной дислипидемии.

Предшествующий уровень техники

Прямой причиной сердечного приступа и грудной жабы является разрушающий процесс, известный как атеросклероз. Атеросклероз является следствием ряда наследственных (генетических) факторов и факторов окружающей среды. Проявление данных факторов в нашей цивилизации, среди которых питание представляется наиболее важным, ведет к развитию атеросклероза. Рост атеросклеротических бляшек, заполненных холестерином, ограничивает в конечном счете поступление крови к сердечной мышце, или, альтернативно, к мозгу или ногам, в зависимости положения бляшки в артериальном русле.

Одним из главных факторов риска атеросклероза, который можно модифицировать, является уровень холестерина в крови. Ряд известных исследований показали, что уровень холестерина в крови несомненно является важным свидетельством предрасположенности к вероятности риска сердечного приступа, а также инфарктов. Взаимосвязь между концентрацией холестерина в крови и риском возникновения данных нарушений является постоянной, (варьируя вокруг уровней холестерина) по степени (чем выше уровень, тем больше вероятность заболевания), при отсутствии кажущегося порога (даже путем понижения, так называемых низких уровней, можно дополнительно понизить риск заболевания). Например, у людей старше 40 лет уровень холестерина в крови, составляющий 7,0 ммоль/л, вызывает риск заболеваний коронарных артерий в три - четыре раз больший, чем при уровне холестерина ниже 5,0 ммоль/л.

Взаимосвязь проявляется очень ясно, когда уровни составляют более 5,2 ммоль/л. Например, смертность среди мужчин, имеющих уровни холестерина 8,0 ммоль/л составляла почти в шесть раз меньше, чем среди мужчин, имеющих уровни 4/0 ммоль/л. Совсем недавние наблюдения находятся в соответствии с ранними исследованиями.

Другие крупные клинические исследования четко показали, что путем снижения высоких уровней холестерина можно понизить риск возникновения смертельных и не смертельных инфарктов сердца, грудной жабы, изменений в элек-

5

302

трокардиограммах и операций коронарного шунтирования. Наиболее известным и первым подобным исследованием было клиническое исследование липидов, в котором исследования по первичной коронарной профилактике показали, что на каждый 1% сниже

ния общего уровня холестерина в крови, снижение риска возникновения заболеваний коронарных артерий составляло 2%.

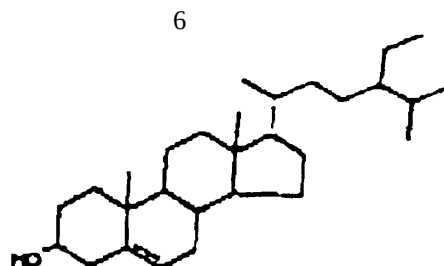
Для любого успешного долгосрочного профилактического лечения гиперхолестеринемии необходимо начинать с относительно раннего возраста и продолжать независимо ни от чего. Несмотря на то, что диета с низким содержанием жира является краеугольным камнем такого долгосрочного лечения, до 60% пациентов через 6 месяцев перестают ее соблюдать. Подобные трудности отмечаются во многих странах Запада, благодаря общему характеру питания с высоким содержанием жира. У многих пациентов плохой профиль холестерина осложняется преобладанием дополнительных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как высокое давление, диабет, ожирение и курение.

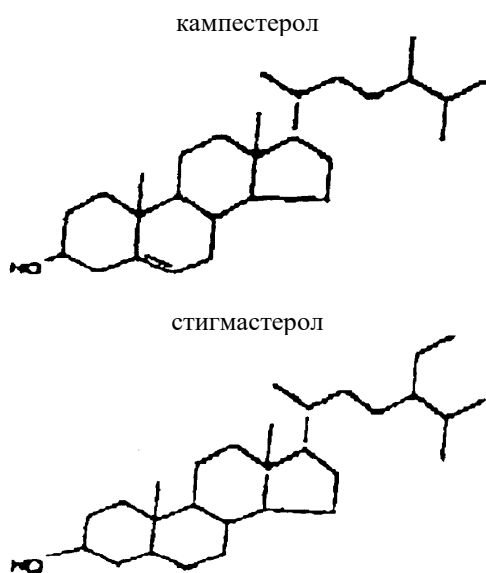
В последние 10 - 15 лет изменение питания для лечения атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний значительно усовершенствовалось. В частности, исследователи обнаружили, что растительные стеролы (фитостеролы) являются эффективными для снижения уровня холестерина в плазме: Lees et al., *Atherosclerosis*, 28 (1977) 325-338; Kudenhodkar et al., *Atherosclerosis*, 28 (1976) 239; Day Artery, 18(3) : 125-132 (1991).

Фитостеролы представляют соединения подобные стеролу, синтезируемые в растениях, не имеющих пищевого значения для человека. В растениях они необходимы для функционирования клеток, по механизму подобному механизму действия холестерина у людей. В среднем питание в странах Запада содержит 360 мг фитостеролов в день. Недавно, на растительные стеролы было обращено серьезное внимание, благодаря их возможностям противораковым свойствам и их способности снижать уровни холестерина при принятии с пищей многими млекопитающими, включая человека.

Химически по структуре фитостеролы подобны холестерину. Основными фитостеролами являются бета-ситостерол, кампестерол и стигмастерол. Другие включают стигмастанол (бета-ситостанол), ситостанол, десмостерол, халинастерол, пориферастерол, клионастерол и брассикастерол. Химические структуры бета-ситостерола, кампестерола и стигмастерола следующие:

бета - ситостерол





Механизм снижения холестерина в крови у животных фитостеролами неизвестен, но, по-видимому, он включает ингибирование абсорбции холестерина из проксимального отдела тощей кишки, посредством конкуренции с холестерином за специфические места связывания. Данные исследований также свидетельствуют, что некоторые фитостеролы не абсорбируются в проксимальном отделе тощей кишки (ситостанол), и если имеется абсорбция (бета-ситостерол), то в очень ограниченных количествах.

На основании результатов данных исследований было широко изучено использование фитостеролов в качестве пищевой добавки для снижения абсорбции холестерина. Lees et al., *supra*; Pollak, *Pharmac. Ther.*, 31 (1985) 177-208; Raicht et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 388 (1975) 374-384.

Lee et al., *supra*, сравнили действие препаратов ситостерола из двух источников, стеролов сои и соснового масла, на холестерин в плазме. Было обнаружено, что препараты растительного стерола эффективны при лечении пациентов с гиперхолестеринемией. Pollak, *supra*, сделал обзор статей по фитостеролам и их влиянию на липиды сыворотки. Raicht, *supra*, дополнительно описал действие бета-ситостерола на баланс стерола и ферменты, лимитирующие скорость метаболизма стерола.

В целом, принято, что фитостеролы представляют собой уникальное сочетание безопасности при долговременной терапии, эффективности и разнообразия при лечении человека. Следующим намерением в отношении фитостеролов является их выделение и очистка из растительных источников и определение дополнительных источников, которые эффективны по цене, приемлемы для разработки в большом масштабе и, которые проявляют гипохолестеринемическое действие.

Обычно, фитостеролы выделяют из таких источников, как масло кукурузы, масло зародыша пшеницы, смолы соевых бобов и смолы кукурузного масла. Аналогично, в качестве источника фитостерола используют смолу соснового масла, которую получают в процессе производства бумаги из древесины, в частности из древесины сосны.

В общем, в этом способе древесная стружка выдерживается с каустической содой для получения пульпы, или "мыла". Мыло затем перегоняют для удаления летучих материалов, получая смолу в виде остатка. Именно из данной смолы исследователи выделили фитостеролы.

У данных традиционных источников фитостеролов имеется несколько существенных недостатков. Смола соснового масла представляет крайне сложный материал, содержащий смолы, жирные кислоты, окисленные продукты, омыленные материалы и фитостеролы. Хотя смола недорога, поскольку она является отходом различных производственных процессов, выделение стеролов с высоким молекулярным весом с хорошими выходами и высокой чистотой, требующейся для фармацевтического использования очень трудно.

Патент США № 3840570, принадлежащий Jullian, описывает способ получения стеролов из смолы соснового масла экстракцией смесью вода-спирт-углеводород, с последующим омылением и последующей очисткой. Исходный материал в настоящем способе представляет смолу соснового масла, из которой экстрагируются фитостеролы и различные примеси. Признается, что в любом способе очистки смолы соснового масла особенно трудно отделить от стеролов примеси спиртов и кислот с длинной углеводородной цепью (которые сами по себе представляют спирты с высоким молекулярным весом).

Другие способы очистки стеролов из смолы соснового масла описаны в Патенте США №2835682, принадлежащему Steiner and Fritz; Патенту США №2715638, принадлежащему Albrecht and Herrlinger; Патенте США №2573891, принадлежащего Christenson. Важно отметить, что в каждом из данных известных способов очистки исходным материалом являлась смола соснового масла, для которой проблемы выделения обсуждены выше.

Предмет настоящего изобретения состоит в том, чтобы избежать или уменьшить вышеуказанные недостатки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение описывает способ очистки и получения композиции фитостерола из мыла в виде пульпы, который включает экстракцию из мыла в виде пульпы кремообразного осадка и очистку настоящего осадка с получением уникальной композиции фитостерола. Более конкретно, кремообразный осадок экстрагируют из мыла в виде пульпы с использованием процесса экстракции растворителем. Затем, очисткой кремообразного осадка путем кристаллизации получают композицию настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает уникальные композиции, которые эффективны для предотвращения или лечения дислипидемии, и которые включают бета-ситостерол, кампестерол и стигмастанол. Композиции фитостеролов, описанные в настоящем изобретении, существенно отличаются от найденных в растениях, пище или маслах. В частности, наличие стигмастанол, по-

видимому, увеличивает эффективность. Настоящие композиции могут дополнительно содержать подобные соединения, которые могут являться фитостеролами или нет. В частности, эти подобные соединения могут включать тритерпены, спирты с длинной углеводородной цепью и другие растворимые в спирте органические соединения.

Настоящее изобретение далее включает использование композиций, описанных здесь для профилактики или лечения первичной или вторичной дислипидемии и атеросклероза, включая заболевания коронарных сосудов сердца, заболевания периферических сосудов и инфаркты у людей и животных.

Уникальные композиции настоящего изобретения проявляют отличные результаты по понижению общего (ТС) и уровня холестерина в крови содержащей липопротеин с низкой плотностью (LDL) Кроме того, неожиданно было обнаружено, что композиции настоящего изобретения поддерживают или повышают уровень холестерина в плазме крови, содержащей липопротеин с высокой плотностью (HDL) у различных видов животных. Данная особенность настоящего изобретения особенно важна, демонстрируя тот факт, показанный в исследовании, что независимо от уровней ТС, при снижении уровня HDL в плазме, риск атеросклероза увеличивается. Фитостеролы, выделенные из смолы соснового масла, соевых бобов и других источников, согласно настоящему изобретению проявляют данный уникальный эффект HDL.

Хотя известно, что для получения некоторых видов фитостеролов из смолы, отогнанной из мыла, полученного при обработке древесной стружки, тем не менее композиции фитостеролов никогда не получали из компонентов мыла в виде пульпы, которая получалась способом обработки древесных стружек. Смола соснового масла является существенно отличной по составу от мыла в виде пульпы. По-видимому, неожиданное действие композиций настоящего изобретения является следствием, по крайней мере, частично, использования мыла в виде пульпы в качестве исходного материала, и благодаря уникальному способу очистки.

Краткое описание рисунков

Следующие рисунки иллюстрируют различные аспекты изобретения, где:

Фиг.1 представляет собой изображение спектра газовой хроматографии для одной из композиций (далее Forbes-2), входящей в объем настоящего изобретения;

Фиг.2 представляет собой изображение спектра Фиг.1 при времени удерживания от 35 до 45 минут;

Фиг.3 представляет изображение спектра Фиг.1 при времени удерживания от 22 до 27 минут;

Фиг.4 представляет цифровое описание спектра газовой хроматографии Фиг. 1;

Фиг.5 представляет изображение спектра газовой хроматографии для другой композиции

(далее Forbes-3), входящей в объем настоящего изобретения;

Фиг.6 представляет изображение спектра Фиг.5 при времени удерживания от 32 до 48 минут;

Фиг.7 представляет цифровое описание спектра газовой хроматографии Фиг.5;

Фиг.8 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-1 и Forbes-2 на концентрацию ТС у крыс;

Фиг. 9 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-1 и Forbes-2 на концентрацию холестерина LDL у крыс;

Фиг.10 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-1 и Forbes-2 на концентрацию холестерина HDL у крыс;

Фиг.11 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-3 на ТС в сыворотке у хомячков;

Фиг.12 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-3 на холестерин LDL в сыворотке у хомячков;

Фиг.13 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие Forbes-3 на холестерин HDL в сыворотке у хомячков;

Фиг.14 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью различных диет на уровень холестерина в плазме у самцов и самок хомячка;

Фиг.15 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью различных диет на уровень холестерина в плазме у самок хомячка;

Фиг.16 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью различных диет на уровень холестерина в плазме у самок хомячка;

Фиг.17 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью различных диет на уровень триглицеридов в плазме у самцов и самок хомячка;

Фиг.18 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью различных диет на соотношение HDL/апо-В у самцов и самок хомячка;

Фиг.19 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью диеты на уровень общего холестерина у хомячка на 45 день исследования;

Фиг.20 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью диеты на корреляцию холестерина и ситостанола;

Фиг.21 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью диеты на уровень HDL у хомячка на 45 день исследования;

Фиг.22 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью диеты на соотношение не-апоА/апоА у хомячка на 45 день исследования; и

Фиг.23 представляет столбчатую диаграмму, иллюстрирующую действие лечения с помощью диеты на не-апоА стеролы у хомячка на 45 день исследования.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения

Способ настоящего изобретения включает следующие стадии:

- (А) получение или приготовление исходного материала, мыла в виде пульпы, полученного растительного материала;
- (В) экстракция из мыла кремообразного осадка при использовании подходящего растворителя;
- (С) очистка кремообразного осадка с получением композиции фитостеролов.

Имеются многочисленные возможные мыла в виде пульпы, полученного из растительного материала. В общем, в известном способе (способ "Kraft"), древесные стружки обрабатывают каустической содой с получением мыла. Древесные стружки могут включать стружку любой твердой древесины или мягкой древесины, включая, но не ограничиваясь, древесины пихты, кедра, сосны, ели, дуба, тсуги и тополя. Наиболее предпочтительно, стружки поставляют из любого Северо-западного тихоокеанского американского или Европейского леса, в котором встречаются различные виды древесных пород.

На стадии экстракции мыло смешивают с кетоном и водным раствором. Для экстракции стеролов используется углеводородный растворитель. Эту стадию можно провести при температурах обычно от около 25°C до около 150°C, наиболее предпочтительно от около 50°C до около 100°C. Наиболее предпочтительно, эта стадия экстракции продолжается свыше 15-24 часов. Важно отметить, что использование спирта не требуется на стадии экстракции. Процесс экстракции настоящего изобретения проводят при использовании смеси кетон-вода-углеводородный растворитель.

Кетон выбирают из группы, имеющей общую структуру $RCOR^1$, где R и R^1 являются алкильными группами. Предпочтительно, алкильные группы являются C_1 - C_6 группами. Наиболее предпочтительно, кетон является 2-пропанолом (ацетоном). Углеводород может быть выбран из группы, содержащей все C_5 - C_{10} углеводороды. Наиболее предпочтительно, углеводородом является гексан.

Как показано на Фиг.1, продуктом стадии экстракции является кремообразный осадок или остаток, из которого выделяют с помощью очистки композицию фитостерола. Данная стадия очистки может быть проведена кристаллизацией, хроматографическим разделением или любым другим подходящим способом. Наиболее предпочтительно, кремообразный осадок растворяют в спирте, медленно охлаждают, затем (фильтруют и промывают холодным спиртом. Осадок сушат, полученный продукт представляет композицию фитостерола.

В предпочтительном способе, на стадии очистки, используемый спирт выбирается из группы, имеющей общие структуры: $R-CHOHR$, $R-CH_2OH$ и $RCOH$, где R является C_1 - C_2 алкильной группой. Наиболее предпочтительно, спиртом является метанол. Стадия охлаждения может быть

проведена при температурах от 10°C до 0°C, наиболее предпочтительно, от 3 до 4°C в течение 24 часов.

Композиция фитостерола, полученная способом настоящего изобретения, может быть включена непосредственно в пищевые добавки, препараты витаминов и в лекарственные препараты для текущего и профилактического лечения атеросклероза и его последствий, инфарктов, сердечных приступов и заболеваний периферических сосудов. Кроме того, одно из воплощений настоящего изобретения включает, описанные здесь композиции фитостеролов, в виде медикаментов в сочетании с подходящими наполнителями и носителями. Например, настоящие композиции могут быть включены или альтернативно назначены вместе с агентами, понижающими уровень липидов, для снижения необходимой дозировки и, следовательно, токсичности данных последних соединений.

Композиции фитостерола настоящего изобретения проявляют заметную способность к модификации липопротеинов, даже в более низких концентрациях фитостерола, чем в известных составах. Наиболее неожиданно, однако, было обнаружено действие данных композиций по увеличению уровней плазмы липопротеинов высокой плотности (HDL), действие ранее не связанное ни с какими-либо другими композициями фитостеролов, полученными из соснового масла. Предполагается, что причиной данного уникального действия может быть использование мыла в виде пульпы в качестве исходного материала или условие присутствия стигмастана в качестве элемента композиции.

В предпочтительном варианте, композиции настоящего изобретения содержат следующее соотношение фитостеролов: бета-ситостерол (1): кампестерол (0,2-0,4); и стигмастерол (0,2-0,5). Наиболее предпочтительно, кампестерол и стигмастерол вместе составляют, по крайней мере, 50% от общего количества бета-ситостерола. В наиболее предпочтительном варианте, композиции настоящего изобретения включают следующее соотношение фитостеролов в сравнении с фитостеролами, полученными из соевых бобов.

	Приблизительная чистота (%)	Соотношение известных фитостеролов		
		В-Ситостерол	Кампестерол	Стигмастерол
Бобы сои		1	0,640	0,005
Forbes-1	91,0	1	0,354	0,414
Forbes-2	77,0	1	0,330	0,203
Forbes-3	90,0	1	0,268	0,299

Состав и чистота двух других экстрактов, входящих в объем настоящего изобретения, следующая:

	Приблизительная чистота (%)	Состав %		
		В-Ситостерол	Кампестерол	Стигмастерол
Forbes-4	99,0	62,6	16,6	23,2
Forbes-5	98,3	64,7	16,4	17,2

В каждой композиции, описанной здесь, могут присутствовать дополнительные соединения, которые представляют фитостеролами или нет. Например, было обнаружено, что кампестанол, другой фитостерол, может присутствовать в относительно небольших количествах. Кроме того, могут присутствовать жирные спирты с прямой цепью, такие как бегенил (C22) и лигноцерил (C24). Для определения природы данных сопутствующих соединений был проведен газожидкостной хроматографический анализ каждой из наиболее предпочтительных композиций настоящего изобретения. Условия проведения газовой хроматографии для фитостеролов были следующие: начальная температура 80°C, которую поддерживали в течение 1 минуты; линейный подъем до 120°C со скоростью 20°C в минуту, которую поддерживали в течение 15 минут; линейное снижение до 24°C со скоростью 20°C в минуту, которую поддерживали в течение 15 минут; линейный подъем до 26°C со скоростью 20°C в минуту, которую поддерживали в течение 25 минут. В конце каждого этапа температуру линейно повышали до 320°C и поддерживали, как минимум, в течение 5 минут. Температура впрыскивания составляла 300°C и температура детектора составляла 320°C. Скорость потока в колонке составляла 1 мл в минуту и скорость потока в отверстии клапана составляла 4 мл в минуту. Скорость потока продува клапана составляла 4,5 мл в минуту. Газообразный носитель представлял собой гелий. Результаты анализа газожидкостной хроматографии для двух наиболее предпочтительных композиций по настоящему представлены на Фиг.1-7.

Для композиции Forbes-2, наличие известных стеролов проявляется в области 35-45 минуты, на Фиг.1 и 2. Наличие бета-ситостерола проявляется в пике 87, кампестерола проявляется в пике 81 и стигмастанол в пике 84. Пики 65, 66 и 77 на Фиг.2 относятся к сопутствующим соединениям, которые могут обладать гипохолестеролемическим действием. Возможно также, что эти сопутствующие соединения могут иметь синергитическое действие на действие известных фитостеролов в композиции. Аналогично, на Фиг.5 и 6, кампестерол, стигмастанол и бета-ситостерол представлены пиками 6, 7 и 8, соответственно.

Другая предпочтительная композиция, входящая в объем настоящего изобретения, включает следующие компоненты:

Кампестерол 14,1%
 Кампестанол 3,5%
 В-ситостерол 62,8%
 стигмастанол 16,9%
 для общей концентрации фитостеролов 97,3%.

ПРИМЕР 1 - Экстракция и очистка

Партию 3 кг мыла в виде пульпы получили от В.С. Chemicals Inc. Приготовили смесь из 3 л ацетона и 1,5 л воды, к которой добавляли мыло. Смесь непрерывно экстрагировали 4,5 л гексана при 50°C в течение 24 часов при использовании испарителя объемом 18 л. Затем продукт, полу-

ченный экстракцией, сушили над сульфатом натрия и оставляли выпариваться. Получали 460 г остатка или кремообразного осадка.

Кремообразный осадок нагревали и перемешивали, используя магнитную мешалку и медленно добавляли 460 мл метанола. Смесь кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 15 минут и медленно охлаждали в течение 3-5 часов. Смесь охлаждали при 3-4°C в течение ночи и затем фильтровали и дважды промывали 150 мл холодного метанола. Наконец, смесь выдерживали в вакууме в течение 2 дней, получая 100 г смеси с чистотой 82% (то есть, 82 г фитостеролов).

ПРИМЕР 2 - Оценка действия композиции фитостерола на крысах.

Девяносто самцов крыс Wistar (80-100 г) разделили на 3 экспериментальных группы: используют композицию Forbes-1; используют композицию Forbes-2 и используют композицию, полученную из соевых бобов. Тридцать крыс в каждой группе далее разделили на 5, в зависимости от режима питания, как указано в Таблице 2. Крыс содержали при чередующемся световом цикле и кормили в течение 10 дней базовым получищенным кормом (Таблица 1), дополненным различным количеством холестерина и фитостерола (Таблица 2). В каждой из 5 диетических групп 2 крысам вводили композицию Forbes-1, 2 крысам вводили композицию Forbes-2 и 2 крысам вводили фитостерол, полученный из соевых бобов (Sigma).

Таблица 1.
Состав исследуемого питания

Ингредиенты	%
Казеин	20
Кукурузный крахмал	21,5
Сахароза	35
Фиксированное масло*	18
DL-метионин	0,5
Смесь минералов	4,00
Смесь витаминов	1,00

* Смесь масла сафлоры и свиного топленого сала в соотношении 1:3

Таблица 2.
Режим питания

Группа	Добавленный к основному питанию стерол (%)	
	Холестерин	Фитостерол
1	0	0
2	1	0
3	1	0,2
4	1	0,5
5	1	1

В конце периода кормления крысам внутрибрюшинно вводили оксид дейтерия (0,4 мл) и лишали пищи и воды на, по крайней мере, 2 часа. Затем крыс анестезировали галотаном. Образцы крови отбирали из сердца. Образцы печени, тонко-

го кишечника и мышц быстро удаляли, взвешивали, помещали в жидкий азот и хранили при -80°C до определения синтеза холестерина. Общий холестерин и холестерин LDL и HDL определяли при помощи стандартных наборов (Biorapacific Diagnostic Inc).

Результаты действия композиций фитостерола на общий холестерин, LDL и HDL холестерин представлены на Фиг.8, 9 и 10, соответственно. Из Фиг.9 очевидна эффективность Forbes-1 и Forbes-2 по снижению холестерина LDL, и на Фиг.10 видно увеличение холестерина HDL, в частности под действием Forbes-1. На Фиг.8, добавление холестерина (диетическая группа 2) к основному питанию (группа 1), приводит к увеличению концентрации циркулирующего холестерина. Прогрессивное добавление повышающихся количеств фитостерола (группы 3-5) приводит к нормализации уровней холестерина в группах, получавших Forbes-1 и Forbes-2, но не при введении фитостеролов соевых бобов, что определено путем регрессионного анализа. Фиг.9 показывает, что фитостеролы Forbes-1 и Forbes-2 обладают лучшей эффективностью по снижению холестерина LDL, чем фитостеролы соевых бобов. Фиг.10 показывает улучшенную способность предпочтительных композиций настоящего изобретения в повышении HDL, в частности, Forbes-1, по сравнению с фитостеролами соевых бобов.

ПРИМЕР 3 - Оценка действия композиций фитостерола на хомячках.

Настоящее исследование было проведено для изучения действия пищевых композиций фитостеролов настоящего изобретения на вызванное холестерином, содержащимся в пище, увеличение концентрации холестерина в сыворотке у хомячков.

В целом, 40 самцов хомячков (80-100 г), отдельно размещенных в клетках из нержавеющей стали, кормили кормом для грызунов и акклиматизировали в течение 3 дней в условиях атмосферы комнаты (20-22°C, световой период 17.00 - 05.00). Затем хомячков разделили на пять групп по 8 животных в каждой и кормили в течение 34 дней основным полуочищенным кормом (Таблица 3), дополненным различными количествами холестерина и одной из композиций фитостерола настоящего изобретения (Forbes 3) (Таблица 4).

Таблица 3
Состав исследуемого корма

Ингредиенты	весовой %
Казеин	20
Кукурузный крахмал	28
Сахароза	36,3
Кукурузное масло	5,0
Целлюлоза	5,0
DL-метионин	0,5
Смесь минералов	4,00
Смесь витаминов	1,00
Битарат холина	0,2
Холестерин	0,025, 0,25

Таблица 4
Режим питания

Группы	Холестерин, добавленный к контрольному корму	Фитостерол, добавленный к контрольному корму
	%	%
1	0,025	нет
2	0,25	нет
3	0,25	0,25
4	0,25	0,5
5	0,25	0,1

В конце периода кормления животным внутрибрюшинно вводили оксид дейтерия (0,4 мл) и лишали пищи и воды на, по крайней мере, 2 часа. Затем хомячков анестезировали галотаном. Образцы крови отбирали из сердца. Образцы других тканей, включая печень, тонкий кишечник и мышцы быстро отделяли, взвешивали, помещали в жидкий азот и хранили при - 80°C до определения синтеза холестерина. Общий холестерин и холестерин LDL и HDL определяли при помощи стандартных наборов. Результаты статистически оценивали путем анализа ONEWAY, метода среднего отклонения (SYSTAT).

Хомячки, которых кормили кормом с высоким содержания холестерина, имели значительно более высокий уровень общего холестерина и холестерина LDL в сыворотке, чем те, которые получали обычный корм с содержанием холестерина (0,025%). Добавление фитостерола в количестве 0,5% и 1% заметно снижало данное увеличение, вызванное высоким потреблением холестерина (Фиг.11 и 12). Концентрация холестерина LDL в группе 5 была ниже, по сравнению с его уровнями у хомячков, которым давали корм с нормальным содержанием холестерина (Фиг.12). Более того, наблюдалась отрицательная регрессия соотношения общего холестерина и холестерина LDL уровня фитостерола (Фиг.13).

Добавление фитостерола призывает к небольшому увеличению HDL, но не вызывает существенную разницу (Фиг.13).

ПРИМЕР 4 - Оценка действия композиции фитостерола на хомячков при исследовании в течение 90 дней.

Шесть групп по 20 хомячков (10 самцов и 10 самок) кормили полуочищенным кормом, содержащим 30% жира (отношение полиненасыщенных/насыщенных жиров = 0,3) в течение 90 дней. Корм 1 не содержал холестерин. Корма 2-6 содержали 0,25% (по весу) пищевого холестерина. Корма 3 и 4 содержали 0,5 и 1% фитостеролов Forbes (более, чем 90% чистоты), соответственно. Корма получали из исходных ингредиентов каждую неделю. Уровни жира, фитостерола и холестерина определяли при помощи газожидкостной хроматографии. Все животные имели свободный доступ к воде и корму в течение всего экспериментального периода. Животных ежедневно взвешивали. Ежедневный и средний за неделю прием пищи также определяли путем взвешивания чашек с пищей до и после каждого 24 часового периода

кормления. Через 90 дней кормления животных умерщвляли при использовании галотана и отбирали образцы крови для анализов профиля липопротеина. Определяли уровни общего холестерина, холестерина в частицах, содержащих апоВ, и холестерина HDL, и триглицеридов. Непосредственно перед умерщвлением определяли также скорость синтеза и абсорбции холестерина, используя способ выведения ^{14}C -холестерина из кишечника и включения дейтерия в холестерин ткани, соответственно. Исследовали также включение фитостеролов в ткани кишечника и другие ткани. Кроме того, образцы кишечника и печени хранили для доставки в Bio-Research Laboratories в Senneville, Quebec, для анализа на гистологию, канцерогенность и функцию ферментов.

Результаты:

Результаты представлены на Фиг.14-18. Группы в данных Фиг. часто обозначены номером, который соответствует описанным в схеме эксперимента. Буквы над столбцами в графической диаграмме обозначают значительные различия между группами. Там, где приведены буквы, столбцы с одинаковыми буквами не являются значимо различными, тогда как столбцы с различными буквами являются различными на статистическом уровне $p < 0,05$.

На Фиг.14-16 показаны данные по циркулирующему холестерину для самцов и самок хомячков, потреблявших исследуемый корм в течение более 90 дней. Значительное влияние пола наблюдали для уровней циркулирующего общего холестерина у животных, потреблявших корм 2, основной корм, добавленный только холестерином, и корм 5, содержащий холестерин + фитостеролы соевых бобов. Хотя самки не отличались по уровню холестерина от самцов при принятии основного корма (группа 1), однако проявляли сильный ответ на добавление только холестерина, по сравнению с самцами. Добавление фитостеролов снижает эту разницу, за исключением группы 5.

Данные по уровню холестерина, в зависимости от пола, представлены на Фиг.15 и 16. Для самцов (Фиг.15) добавление только холестерина к основному корму приводит к значительному увеличению уровня циркулирующего общего холестерина. Добавление фитостеролов Forbes в количестве 0,5% приводит к тенденции снижения уровня холестерина, однако, добавление фитостеролов Forbes в количестве 1% выявляет статистически значимое снижение холестерина, до, приблизительно, того же уровня, как в контрольной группе, без добавления холестерина. Когда к корму добавляли фитостеролы соевых бобов в количестве 0,5 и 1%, заметного снижения уровня циркулирующего общего холестерина у самцов не было. Для HDL наблюдали различное действие Forbes по сравнению с соевыми бобами, если кормление с Forbes не вызывает изменения уровня HDL в группе, получавшей только холестерин (группа 2), то кормление соевыми бобами приводит к значительному снижению уровней HDL у обеих исследованных уровней (группы 5 и 6). Не

наблюдали значительных различий в отношении частиц апоВ, содержащих холестерин, однако, имелась тенденция к снижению уровней при кормлении холестерином Forbes в количестве 1%, по сравнению с другими группами.

Данные для самок представлены на Фиг.16. Для общего холестерина и холестерина HDL, имелось заметное влияние добавления только холестерина в пищу. Добавление любого типа источника фитостерола в концентрации 1% приводит к значительному и сходному снижению концентраций общего холестерина и холестерина HDL. На уровни частиц, содержащих апоВ, питание не влияло.

Уровни циркулирующего триглицерида у хомячков, потреблявших исследуемое питание в течение 90 дней, представлены на Фиг.17. Наблюдается увеличение уровня циркулирующего триглицерида у самок животных, получавших основное питание, дополненное холестерином и Forbes в количестве 0,5%, по сравнению с животными, получавшими только основной корм, однако, других различий у обеих полов внутри групп не обнаружено. У самцов никакого влияния питания или тенденции к нему на концентрацию триглицеридов не обнаружено.

В общем виде, порядок результатов по исследованию корма на самцах следующий:

Таблица 5

	Общий холестерин	LDL	HDL
Forbes 0,5%	4	2	1
Forbes 1,0%	1	1	2
Соя 0,5%	2	3-4	4
Соя 1,0%	3	4-3	3

Можно четко видеть преимущество композиций Forbes (настоящего изобретения). Кроме того, подобный порядок был обнаружен для соотношения HDL:АпоВ у самцов (Фиг. 18):

Forbes 0,5%	2
Forbes 0,1%	1
Соя 0,5%	4
Соя 1,0%	3

Было также обнаружено, что соотношение HDL:LDL для композиций Forbes, было больше почти в два раза, чем только для одного В-ситостерола.

ПРИМЕР 5 - Действие композиции фитостерола на кроликов

В настоящем исследовании два кролика были изучены в течение более 43 дней в отношении действия одной из композиций настоящего изобретения (корм с Forbes 1%) на профили общего холестерина. Результаты следующие:

Таблица 6: Профили общего холестерина у кролика (мг/дл)

Дата	Кролик А	Кролик В
14.06.95	95	215
18.06.95	129	162
26.06.95	-	начало кормления с Forbes 1%
07.07.95	75	106
09.07.95	-	начало кормления с Forbes 1%
18.07.95	90	112
25.07.95	82	118
01.08.95	95	119
08.08.95	76	114

Можно было видеть снижение общего холестерина у обоих кроликов А и В в течение двух недель введения композиции фитостерола (Forbes 1%). Данное действие продолжается даже после прекращения введения Forbes 1%. Действие композиции настоящего изобретения по снижению общего холестерина задерживается после начальной фазы введения.

ПРИМЕР 6 - Действие композиции фитостерола на апо-Е дефицитных мышей.

Животные: Девятнадцать 5-ти недельных самцов апо-Е дефицитных мышей были получены от Jackson Laboratory, США. Животных случайным образом разделили на две группы, 9 животных в контрольной группе и 10 животных в экспериментальной группе с Forbes. После 5 дней периода адаптации у мышей отбирали кровь из хвостовой вены в капиллярную трубку и отделяли плазму путем центрифугирования крови. Определяли липиды плазмы мышей.

Питание: Корм для мышей с низким содержанием жира, низким содержанием холестерина получали от Jamieson's Pet Food Distributors Ltd., Vancouver, B.C. Фитостеролы, полученные из соснового масла экстрагировали из мыла соснового масла, используя способ настоящего изобретения. При помощи газожидкостной хроматографии оценивали чистоту и процентный состав каждого отдельного фитостерола в смеси конечного продукта. Конечный продукт имел до 95% чистоты и содержал 69% ситостерола, 15% кампестерола и 16% стигмастерола. Корм для мышей размолотили до состояния мелкого порошка. К этому порошку добавляли 0,01-5% (по весу) холестерин (Sigma) и хорошо перемешивали. Часть данного дополненного холестерина корма повторно гранулировали, сушили и использовали для кормления контрольной группы мышей, а к другой его части добавили 2% (по весу) фитостеролов, экстрагированных из соснового масла, повторно гранулировали, сушили и использовали для кормления экспериментальной группы мышей.

Биомедицинское исследование: Уровень общего холестерина плазмы и триглицерда определяли при помощи ферментативного набора (Boehringer Mannheim), а холестерин HDL, ранее опубликованным способом, с использованием полиэтиленгликоля 6000.

Вес тела и потребление пищи. Вес тела мышей и потребление пищи измеряли еженедельно.

Таблица 7: Средний вес тела мышей (г), (представлены только ежемесячные измерения).

Дата	Группа Forbes	Контрольная группа
20.06.95	21,42	21,02
24.07.95	29,82	28,00
22.08.95	32,12	29,73
12.09.95	34,16*	30,78
*p<0,05		

Таблица 8: Среднее еженедельное потребление пищи мышами (г), (представлены только измерения за месяц)

Дата	Группа Forbes	Контрольная группа
26.06-03.07.95	19,61	21,21
01.08-08.08.95	32,62*	29,20
15.08-22.08.95	29,32	27,10
05.09-12.09.95	35,56	30,25
*p<0,05		

Другие обнаружения: В отношении нового корма никаких побочных эффектов не обнаружено. Все животные из обеих групп выглядели нормально, имели нормальное поведение, включая нормальное в отношении пищи. Одна мышь из контрольной группы была обнаружена мертвой 11.07.95. Поскольку вес тела не был сохранен, аутопсию не проводили. У другой мыши из группы Forbes была обнаружена дегидратация с потерей веса. Животное было умерщвлено и причиной его заболевания была обнаружена аномалия прикуса (избыточный рост зубов).

Статистический анализ: Результаты анализировали, используя t-тест для двух образцов, предполагающий равные средние отклонения.

Результаты:

Результаты, полученные к настоящему времени, суммированы в следующих Таблицах.

Таблица 9: средний уровень общего холестерина в плазме мышей (мг/дл).

Дата	Группа Forbes	Контрольная группа
20.06.95	606,28	599,61
18.07.95	1027,96*	1622,56
06.09.95	1168,57*	1508,63
*p<0,0001		

Таблица 10: Средние значения уровня триглицерида в плазме (мг/дл).

Дата	Группа Forbes	Контрольная группа
20.06.95	110,97	120,31
18.07.95	210,17	143,71
06.09.95	224,48	152,25

Таблица 11: Средние значения уровня холестерина HDL (мг/дл).

Дата	Группа Forbes	Контрольная группа
08.07.95	42,00*	18,29
*p<0,001		

Данные результаты показывают, что группа, принимающая композицию Forbes, проявляет значительное (33%) снижение общего холестерина, незначительное увеличение триглицеридов и значительное увеличение холестерина HDL (>100%).

ПРИМЕР 7 - Действие композиции фитостеролов на хомячков - 45-и дневное исследование.

Пятьдесят хомячков GS выдерживали в течение двух недель в помещении для ухода за животными перед началом кормления полнорационным кормом в течение 45 дней. Их разделили на пять групп кормления с 0,25% холестерином и смесями с одним из четырех растительных фитостеролов: из соевых бобов, соснового масла, чистого ситостанола и искусственной смеси, представляющей фитостеролы соснового масла. Контрольная группа получала только 0,25% холестерина. Потребление пищи регистрировали в течение периода исследования на каждый третий день. Вес тела измеряли каждую неделю и во время сбора образцов ткани. За три дня до умерщвления хомячков GS слегка анестезировали диэтиловым эфиром и через яремную вену вводили 0,4 мл Intralipid, содержащего 0,18 мг ¹³C-холестерина. Сразу после инъекции животных кормили через желудочный зонд 0,6 мл смесью липидов (кокосового, оливкового и подсолнечного масла), содержащих 0,44 мг ¹³C-холестерина. Затем хомячков GS содержали в их проволочных клетках в течение 72 часов, обеспечивая водой и пищей по потребности.

В день умерщвления каждому хомячку GS в/б вводили 1 мл дейтерированной воды и оставляли на один час перед умерщвлением. Животных анестезировали диэтиловым эфиром и отбирали образцы крови путем кардиопунктуры. Собирали печень и желчный пузырь, тонкий кишечник, толстый кишечник и сердце, замораживали жидким азотом и хранили замороженными при -80°C. Их трупы и фекалии хранили при -20°C для дальнейшего анализа липидов и стеролов.

Измерение потребления пищи, веса тела и печени:

Потребление пищи хомячками измеряли каждые три дня. Статистический анализ не показал существенных различий среди пяти групп в потреблении пищи. Среднее дневное потребление пищи в пяти группах варьировалось от 8,84 до 9,34 г в день, значение p=0,4. Животные имели значительное увеличение веса тела с, около, 25 до 40 г в течение периода исследования, значение p<0,05 (парный t-тест). Конечное измерение веса тела было в интервале от 112,5 до 154,3 г. Никакой статистической значимости не было отмечено среди различных обработанных групп, значение p=0,43.

Вес печени значительно различался среди различных групп. Группа, получавшая ситостанол имела самый низкий вес печени по сравнению с контрольной и другими группами, получавшими 0,25% холестерина, и различные фитостеролы, соответственно. Кроме того, группа, получавшая соевые бобы, показала значительную разницу, подобную разнице группы, получавшей только ситостанол, при статистическом анализе данных при использовании Newman-Keuls теста. В целом, все группы, получавшие растительные стеролы, имели более низкий вес печени, по сравнению с контрольной группой, получавшей один холестерин, значение p=0,01. Хомячки GS, получавшие стеролы масла сосны и ситостанол, имели в среднем вес печени на 15% и 20% меньше, чем контрольная группа, соответственно. Природное масло сосны и искусственно приготовленное масло сосны имели сходные значения по весу печени, что позволяет предположить, что соединение, отсутствующее в соевых бобах, растительный стерол ситостанол играет важную роль в снижении содержания стерола в печени.

Анализ липидов: I. Общий холестерин:

Величину общего холестерина определяли, используя стандартный набор ферментативных реактивов на автоанализаторе VP. Образцы крови исследовали дважды и в окончательном статистическом анализе использовали среднее значение из двух. Для анализов различных липидов использовали методы Newman-Keuls и Bonferroni по способу ANOVA. Ситостанол значительно на 34% понижал уровни общего холестерина в плазме хомячков GS по сравнению с контролем. Среднее значение для контрольной группы составляло 226,9 мг/дл, и для одной из групп, принимающей ситостанол составляло 151,2 мг/дл, значение p=0,007. Фитостеролы масла сосны и смеси искусственного масла сосны показывают сходное снижение холестерина в плазме (17,5%), 118,4 мг/дл и 186,1 мг/дл, соответственно. Однако, если исключить из анализа значение одного из образцов, выходящих из шкалы, фитостеролы масла сосны (Forbes) проявляли значительное снижение значения общего холестерина (175,2 мг/дл), значение p<0,02 в группе масла сосны, в сравнении с контрольной (только 0,25% холестерин) группой. Корреляция между присутствием ситостанола и низким уровнем плазмы было значительным, значение p<0,0001, и r=0,46.

II. Холестерин HDL:

Доля апоА липопротеинов, присутствующих в холестерине HDL, не имеет никаких существенных изменений своего значения из пяти различных групп, значение p=0,18. Наблюдалось значительное снижение на 15% среднего значения HDL в группе, получавшей ситостанол. Тем не менее, данный элемент не оказывает действия на значительное снижение общего холестерина, которое составляло 34%. Отношение не апоА липопротеинов к апоА. липопротеинам (HDL) существенно не изменялось между группами. Запутывающее дей-

ствие по незначительному снижению значения HDL в группах, получающих ситостанол и масло сосны, вносит вклад в получение несущественного результата в величине соотношения не апоА/апоА (HDL) В общем, различные типы фитостеролов несущественно изменяют уровень холестерина HDL в плазме хомячков GS.

III. LDL и/или не апоА стеролы.

Ситостанол проявляет эффективность по снижению не апоА стеролов в плазме. Было показано снижение на 55% не апоА липопротеинов, значение $p=0,02$. Подобно их действию на общий холестерин, масло сосны и искусственная смесь масла сосны снижали уровень не АпоА стеролов на 21%, соответственно, что снова свидетельствует о имеющейся строгой корреляции между содержанием ситостанола в фитостеролах и их полезным действием по снижению уровней холестерина в плазме хомячков GS. Однако, данное снижение не было статистически значимым из-за вариабельности значений триглицерида.

IV. Триглицерид:

При использовании метода ANOVA для определения величины триглицерида, они не подходили для нормального теста. Хомячков GS забивали в условиях отсутствия голодания (важное состояние для будущего анализа синтеза холестерина, кинетики и абсорбции). Из-за подобной ситуации, различные значения выпадали из шкалы. Согласно ANOVA по Ranks, уровни триглицерида не показывают какого-либо статистического различия среди групп. Растительные стеролы не влия-

ли на уровень триглицерида в плазме у хомячков GS.

Таблица 12: Ряд эффективности

	Общий холестерин	HDL	LDL	ТГ
Контроль	С	С	С	С
β-ситостанол	4	1	3-4	1-4
соевых бобов				
Масло сосны	2-3	2-2	2-3	1-4
(Forbes)				
Сигмастанол	1	4	1	1-4
Искусственное	3-2	3-2	4-3-2	1-4
масло сосны				

В заключение композиция по маслу сосны, полученная из мыла настоящего изобретения имеет наиболее предпочтительный профиль, благодаря увеличению холестерина HDL и снижению общего холестерина. Это действие на HDL не наблюдается у искусственной композиции масла сосны. Подобным образом, общее действие ситостанола не благоприятно, благодаря значительного увеличения HDL.

Хотя окончательно не ясно, представляется, что в отношении растительных стеролов, относительно гидрофильные стеролы в большей степени ингибируют абсорбцию общего холестерина, тогда как относительно гидрофобные стеролы имеют большее влияние на уровень HDL. Композиции фитостеролов настоящего изобретения являются уникальными, поскольку имеют оба данных эффекта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения композиции фитостеролов, включающей β-ситостерол, кампестерол и стигмастанол из мыла в виде пульпы, получаемого обработкой древесной стружки, который включает: на первом этапе, смешивание мыла в виде пульпы со смесью растворителей, содержащей кетон, выбранный из группы, имеющей общую структуру $RCOR_1$, где R и R_1 являются алкильными группами, алифатический углеводород, выбранный из C_5 - C_{10} углеводов и воды и не содержащей спирта, при температуре, обычно, от 25°C до 150°C, с образованием кремообразного осадка; и на втором этапе, очистку кремообразного осадка с получением композиции фитостеролов.

2. Способ по п. 1, **отличающийся** тем, что кремообразный осадок очищают кристаллизацией из спирта с получением композиции фитостеролов.

3. Способ по п. 1, **отличающийся** тем, что мыло в виде пульпы получают из древесных стружек, включающих стружки кедр, ели, сосны, пихты, дуба, тсуги и тополя.

4. Композиция фитостеролов, понижающая холестерин, содержащая кампестерол и стигмаста-

нол в количестве, по крайней мере, 50% от количества β-ситостерола, за исключением композиций, полученных из соевых бобов.

5. Композиция фитостеролов, понижающая холестерин, в которой соотношение β-ситостерола, кампестерола и стигмастанола составляет 1,0 к от 0,2 до 0,4 к от 0,2 до 0,5, соответственно, за исключением композиций, полученных из соевых бобов.

6. Композиция по п. 5, **отличающаяся** тем, что соотношение β-ситостерола, кампестерола и стигмастанола составляет 1,0 : 0,354 : 0,414, соответственно.

7. Композиция по п. 5, **отличающаяся** тем, что соотношение β-ситостерола, кампестерола и стигмастанола составляет 1,0 : 0,330 : 0,203, соответственно.

8. Композиция по п. 5, содержащая следующее соотношение фитостеролов:

1,0 β-ситостерола к
0,268 кампестерола к
0,299 стигмастанола.

9. Композиция фитостеролов, полученная способом по п. 1.

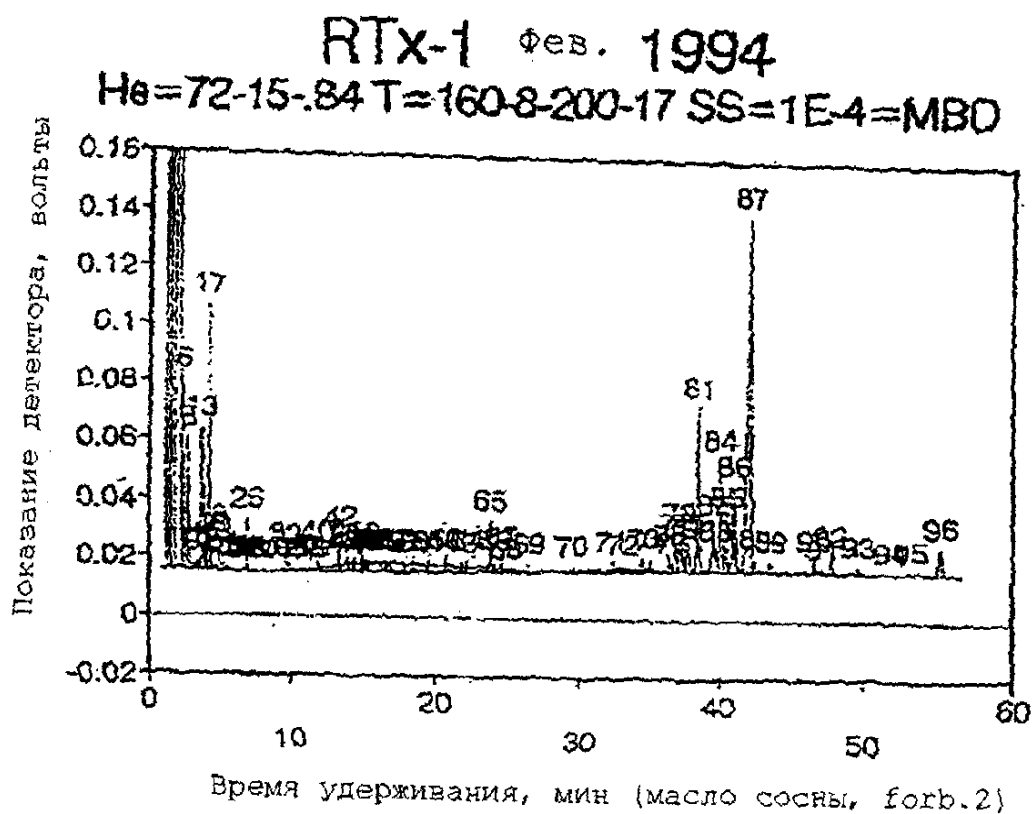
10. Композиция по п. 4 для снижения концентрации холестерина в сыворотке крови.

11. Продукт терапевтически эффективный для предотвращения или лечения первичной и вторичной дислипидемии и атеросклероза, вклю-

чающий композицию по п. 4 и фармацевтически эффективный носитель.

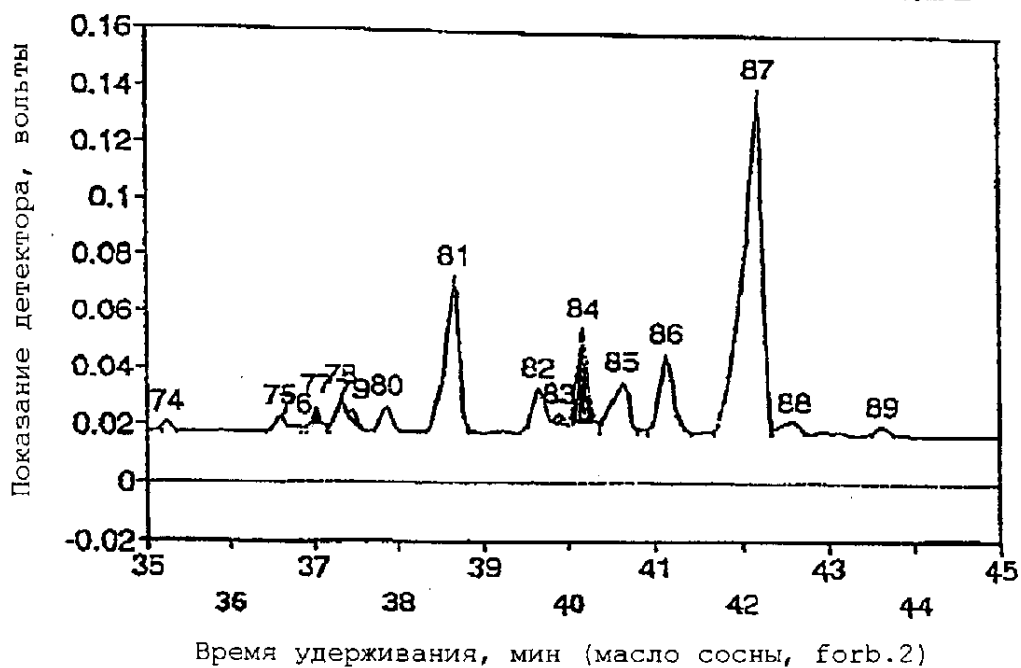
12. Композиция по п. 9, которая дополнительно включает тритерпены, спирты с длинной цепью и органические соединения, растворимые в спиртах.

302



Фиг. 1

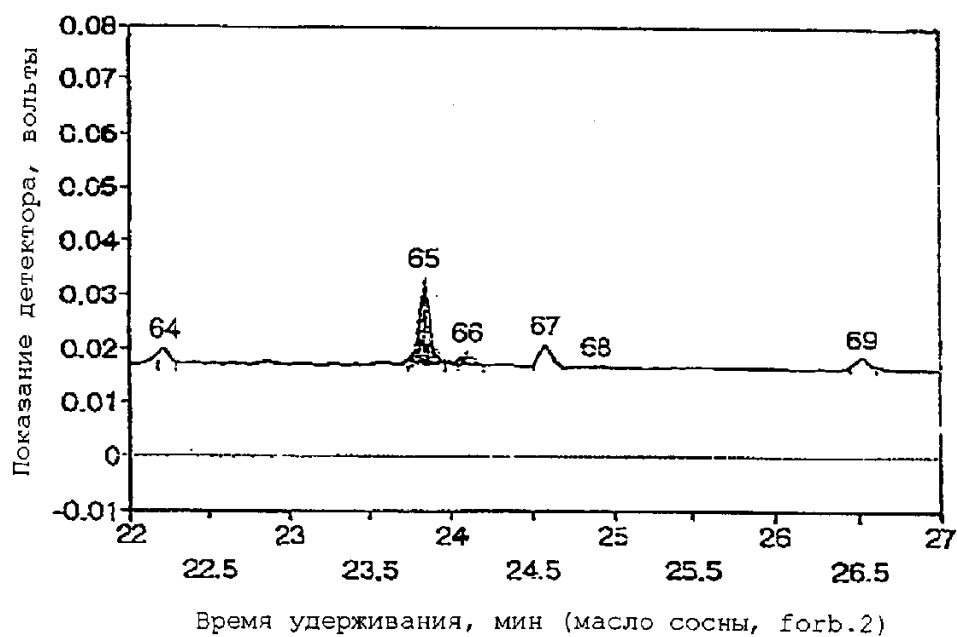
RTx-1 Фев. 1994
 He=72-15-84 T=160-8-200-17 SS=1E-4=MBD



Фиг. 2

302

RTx-1 Фев. 1994
 He=72-15-84 T=160-8-200-17 SS=1E-4=MBD



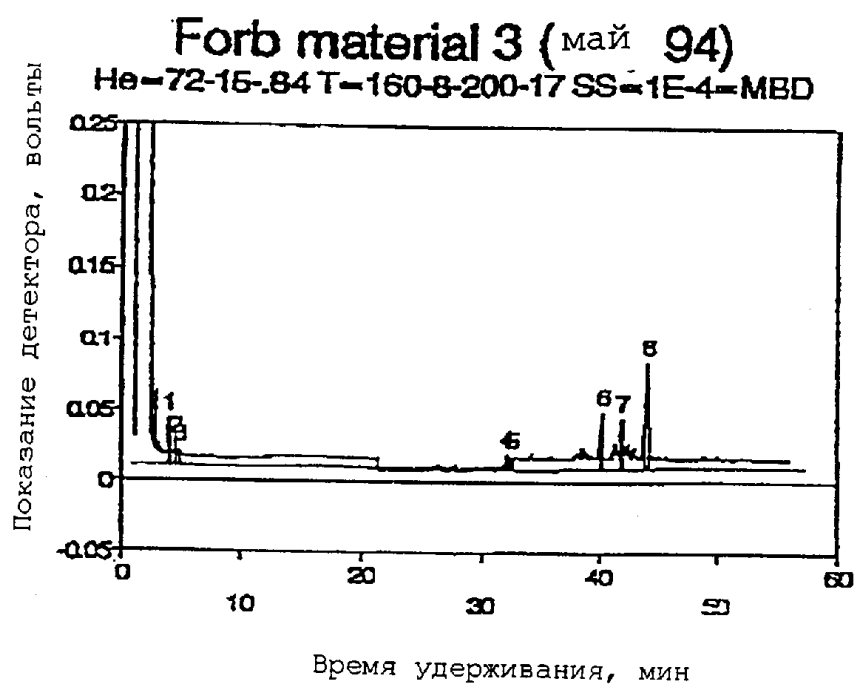
Фиг. 3

Индекс	Время мин	Область $V \cdot S$	Область %	Фон V	Высота $\bar{V}$	Истинный%
73	34.65	0.039	0.051	0.016	0.005	0.890674
74	35.267	0.029	0.037	0.016	0.004	0.646175
75	36.629	0.087	0.114	0.017	0.007	1.990919
76	36.808	0.004	0.005	0.019	0.001	0.087321
77	37.054	0.093	0.121	0.017	0.011	2.113168
78	37.354	0.16	0.208	0.017	0.014	3.632553
79	37.492	0.018	0.024	0.022	0.003	0.419141
80	37.879	0.094	0.123	0.017	0.01	2.148096
81	38.688	0.615	0.798	0.017	0.057	13.93643
82	39.675	0.24	0.311	0.017	0.017	5.431366
83	39.908	0.021	0.027	0.021	0.003	0.471533
84	40.208	0.377	0.49	0.017	0.039	8.557457
85	40.675	0.269	0.35	0.017	0.02	6.112469
86	41.154	0.33	0.428	0.017	0.03	7.474677
87	42.229	1.862	2.416	0.017	0.124	42.1935
88	42.625	0.088	0.114	0.017	0.005	1.990919
89	43.646	0.039	0.05	0.017	0.004	0.87321
90	46.742	0.045	0.059	0.017	0.004	1.030388

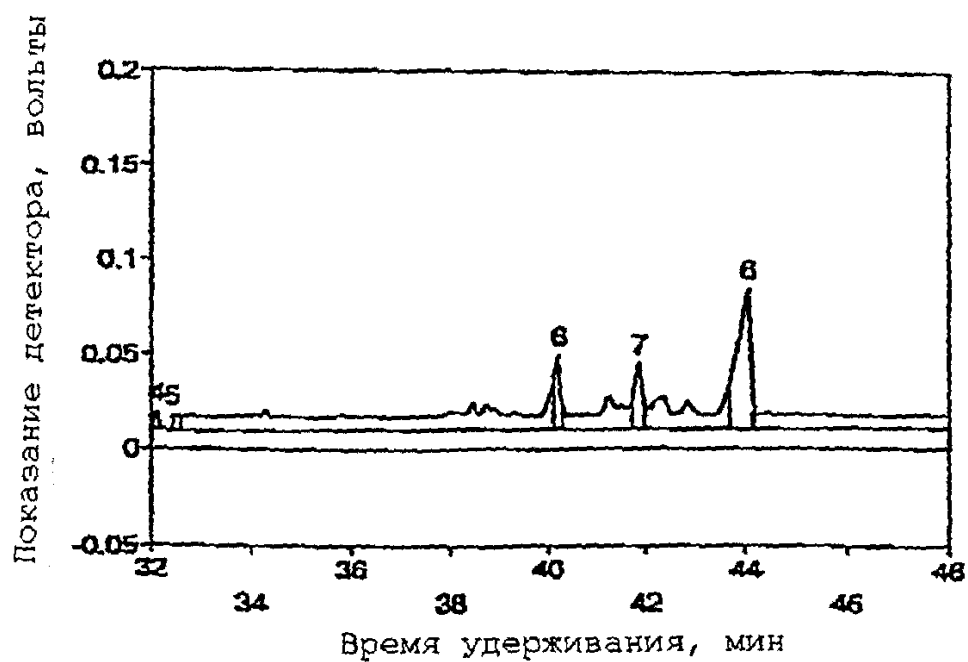
Фиг. 4

302

АНАЛИЗ КОМПОЗИЦИИ FORBES 3 ПРИ ПОМОЩИ ГЖХ



Фиг. 5



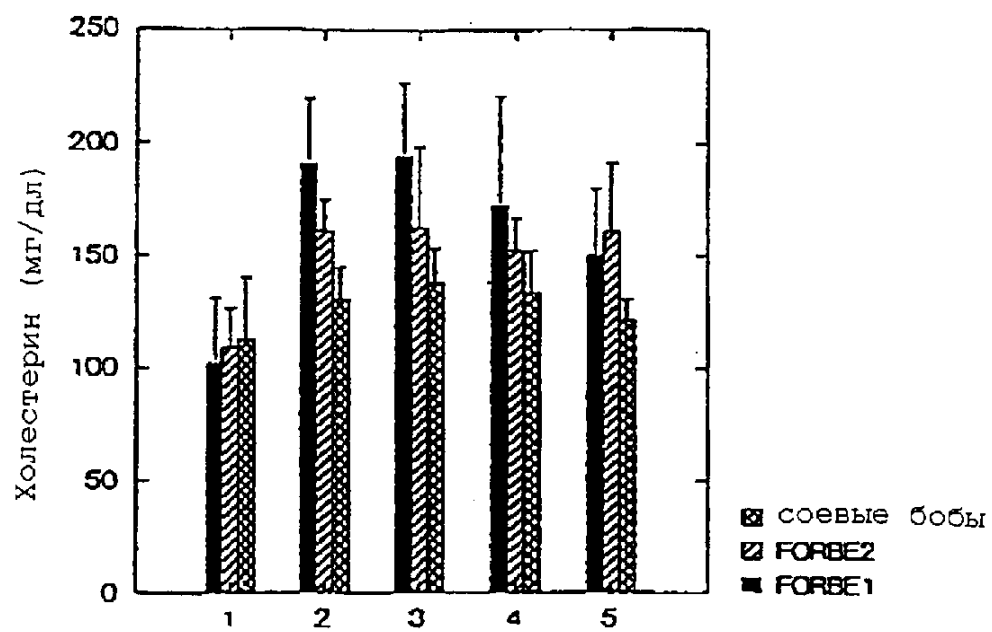
Фиг. 6

302

Индекс	Время мин	Область $V \cdot s$	Область %	Фон V	Высота V
1	4.012	0.078	3.224	0.011	0.033
2	4.486	0.161	6.649	0.011	0.017
3	4.775	0.007	0.289	0.018	0.004
4	32.117	0.05	2.077	0.009	0.011
5	32.433	0.093	3.856	0.009	0.009
6	40.217	0.347	14.328	0.01	0.041
7	41.879	0.389	16.064	0.01	0.036
8	44.058	1.297	53.532	0.01	0.074

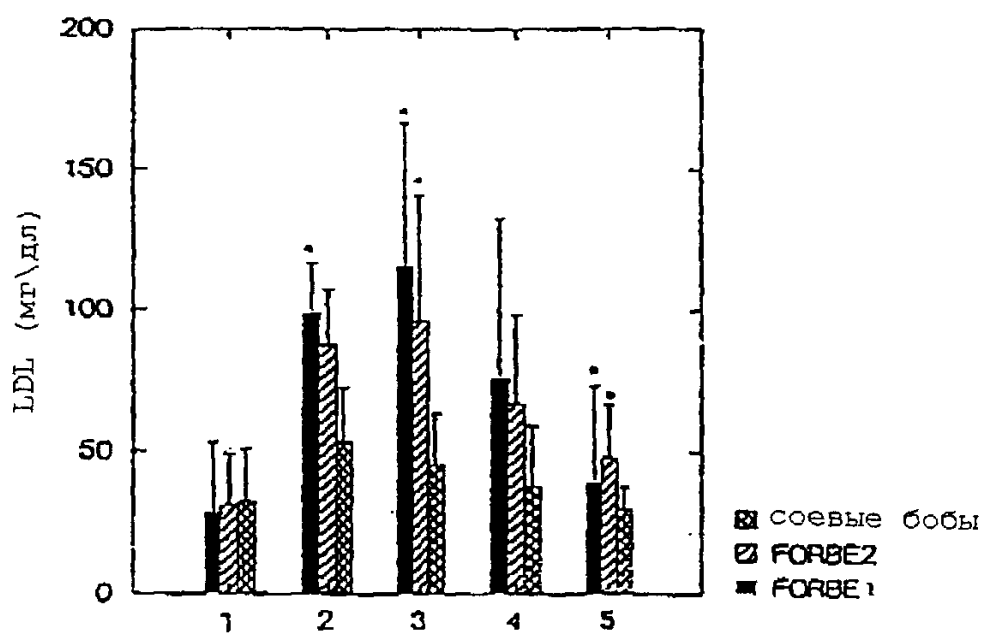
Фиг. 7

Действие ФИТОСТЕРОЛА НА ОБЩИЙ ХОЛЕСТЕРИН



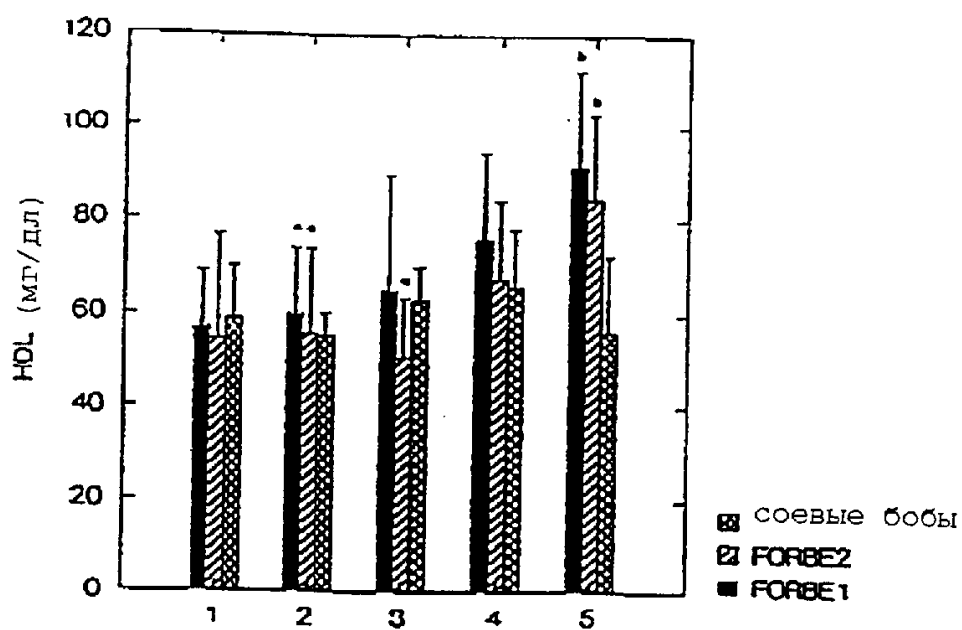
Фиг. 8

Действие фитостерола на холестерин LDL

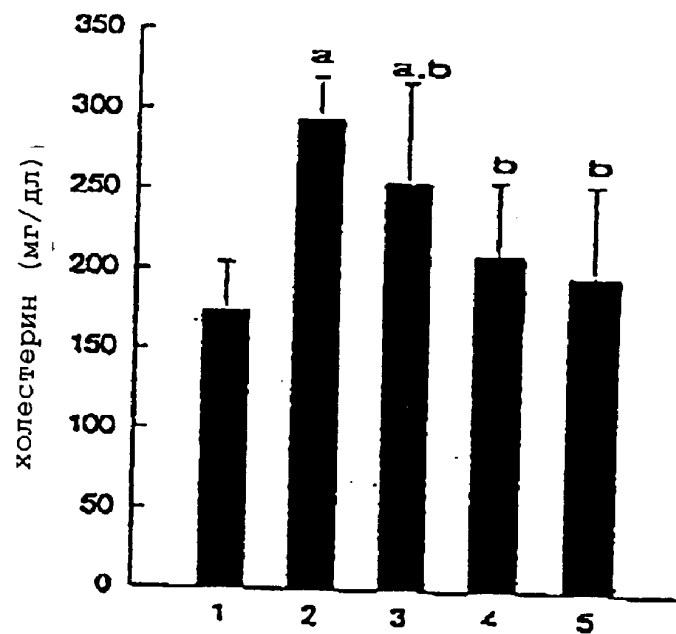


Фиг. 9

Действие ФИТОСТЕРОЛОВ НА HDL

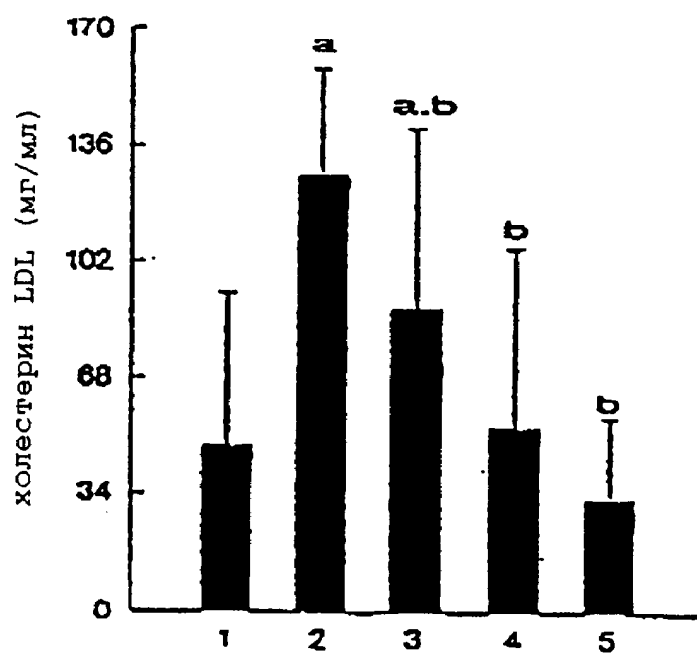


Фиг. 10



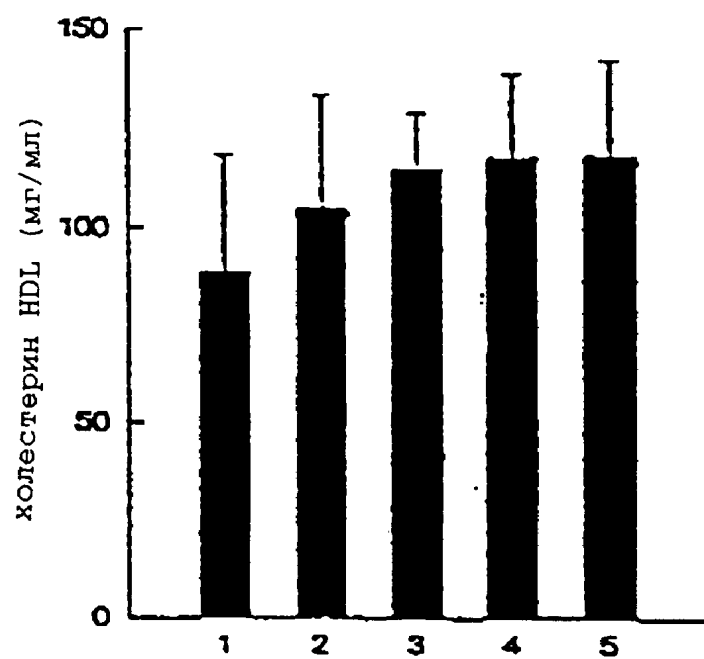
Фиг. 11

Действие фитостерола на холестерин LDL сыворотки

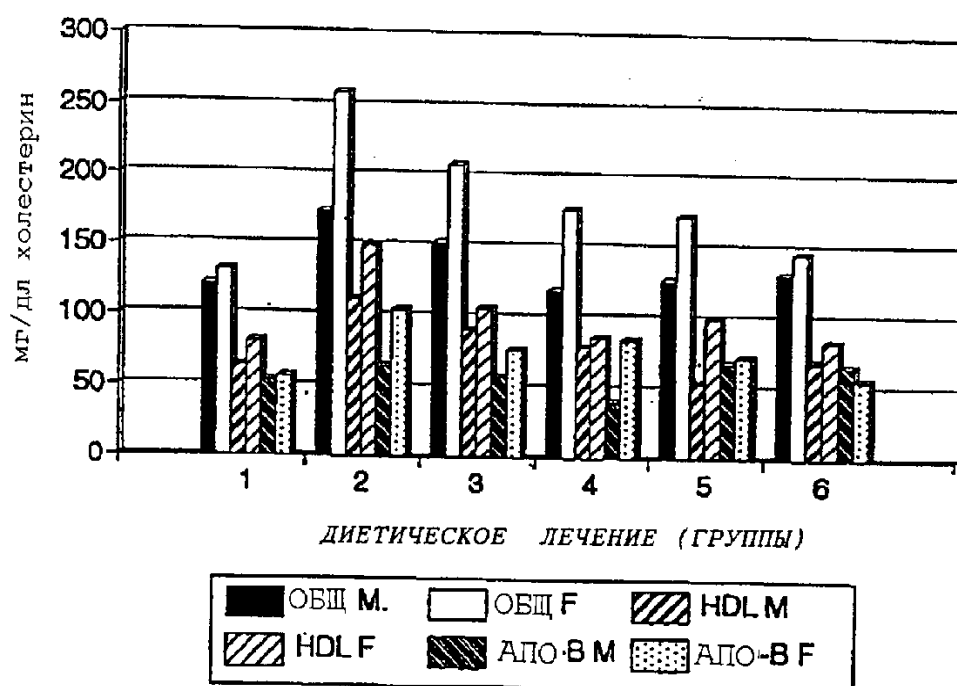


Фиг. 12

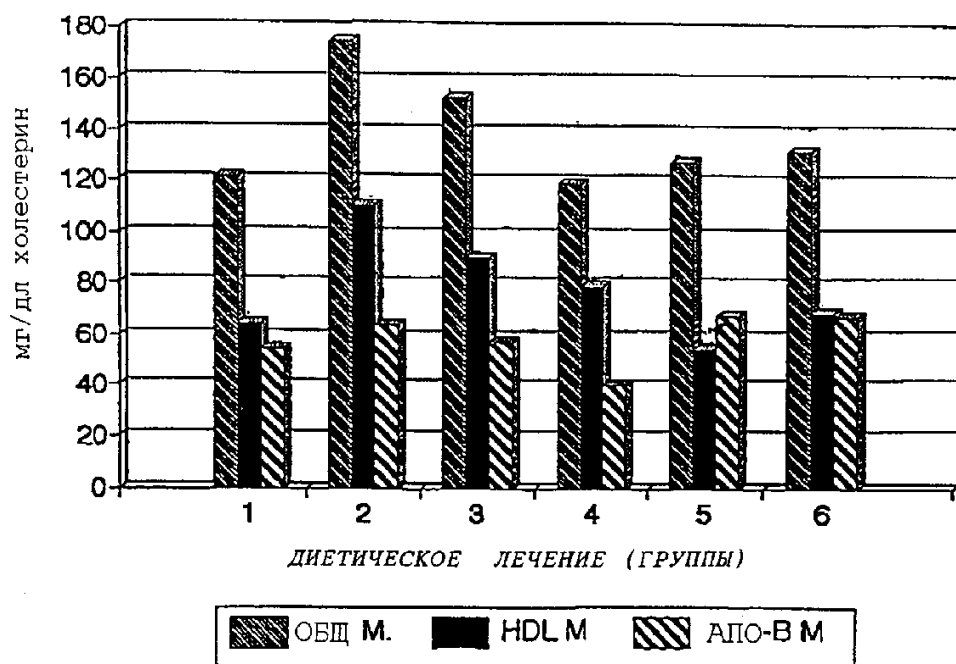
Действие фитостерола на холестерин HDL сыворотки



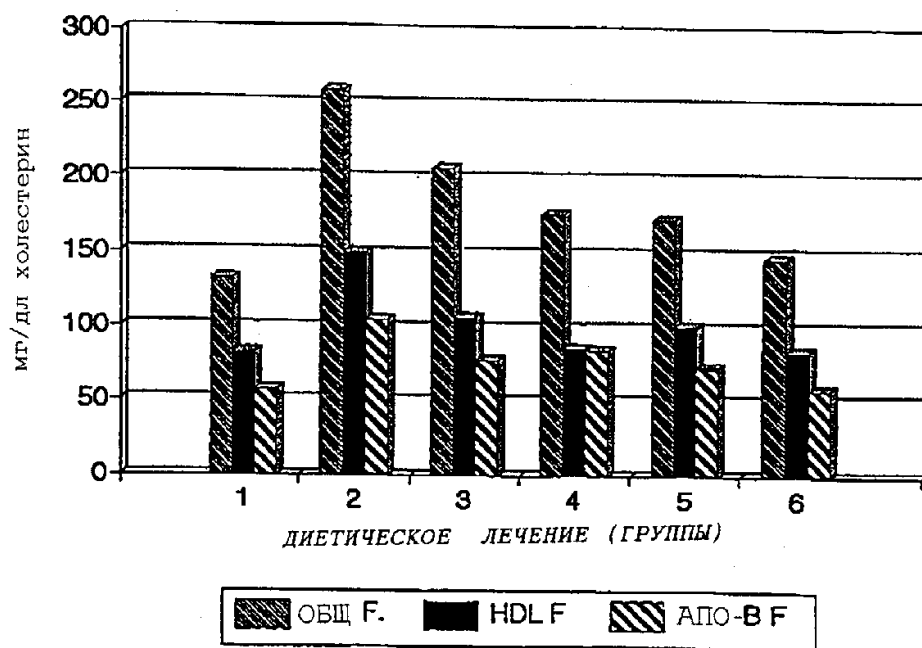
Фиг. 13



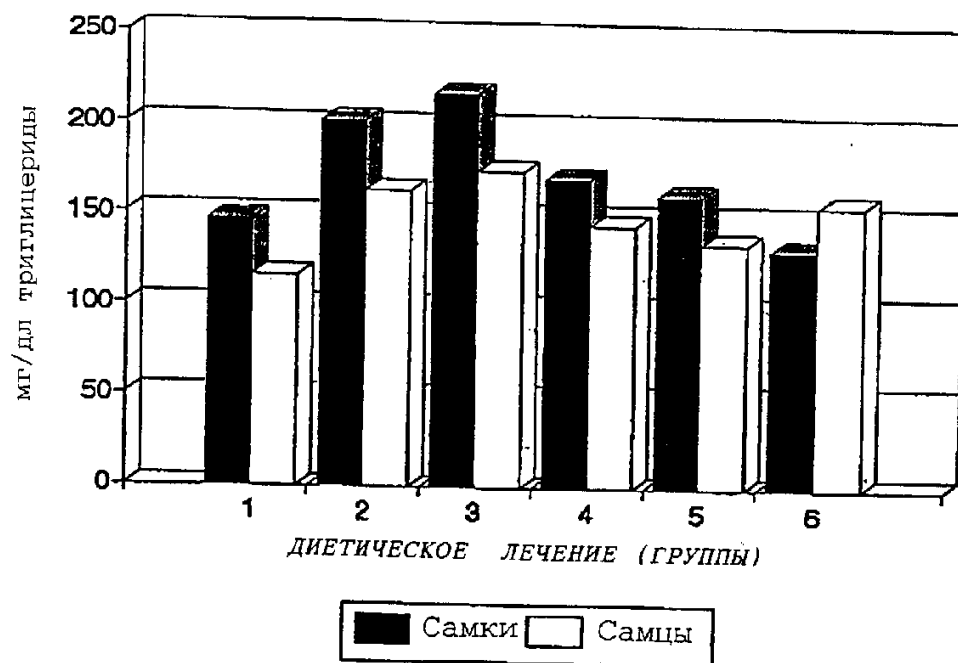
Фиг. 14



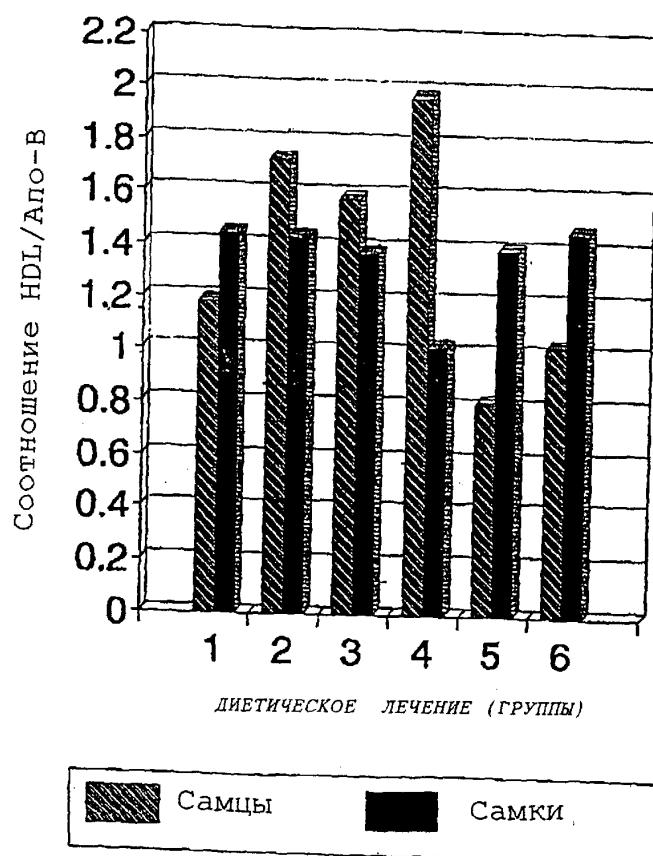
Фиг. 15



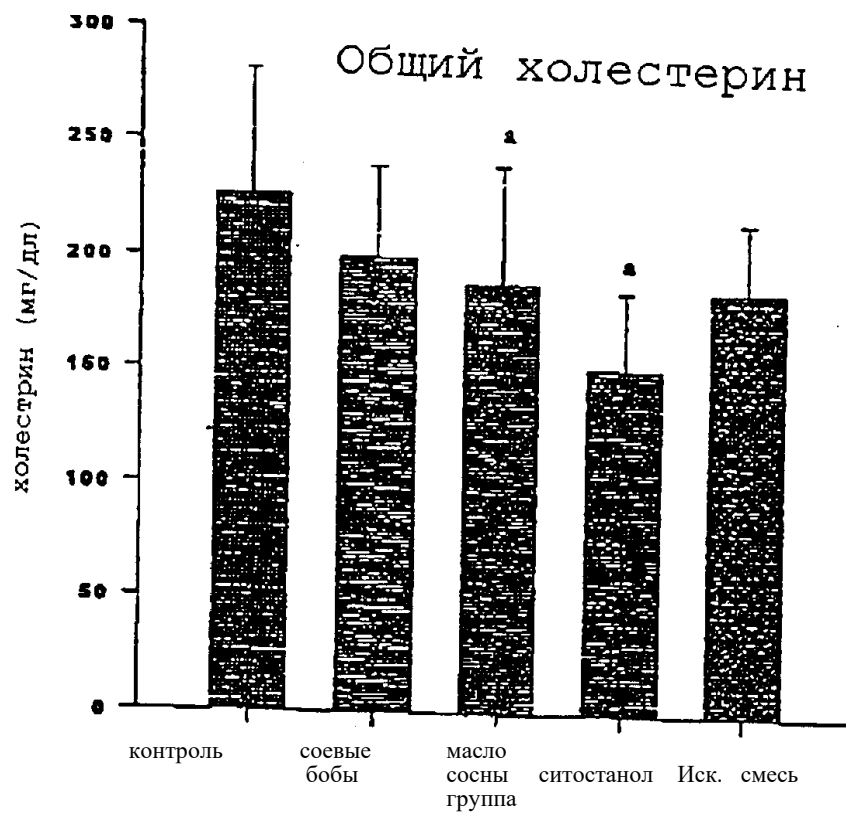
Фиг. 16



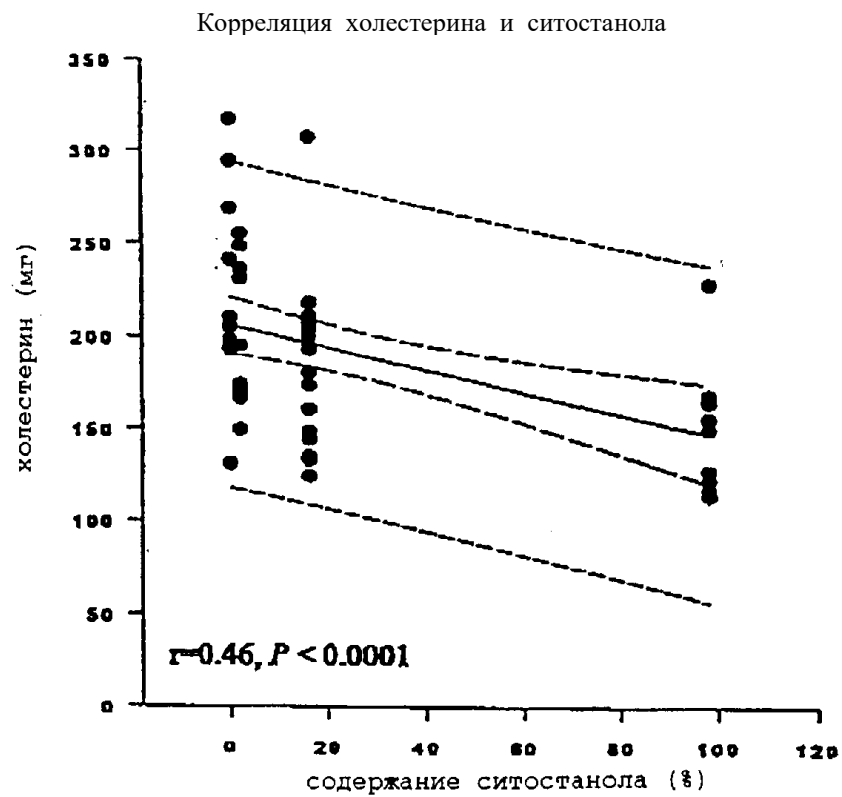
Фиг. 17



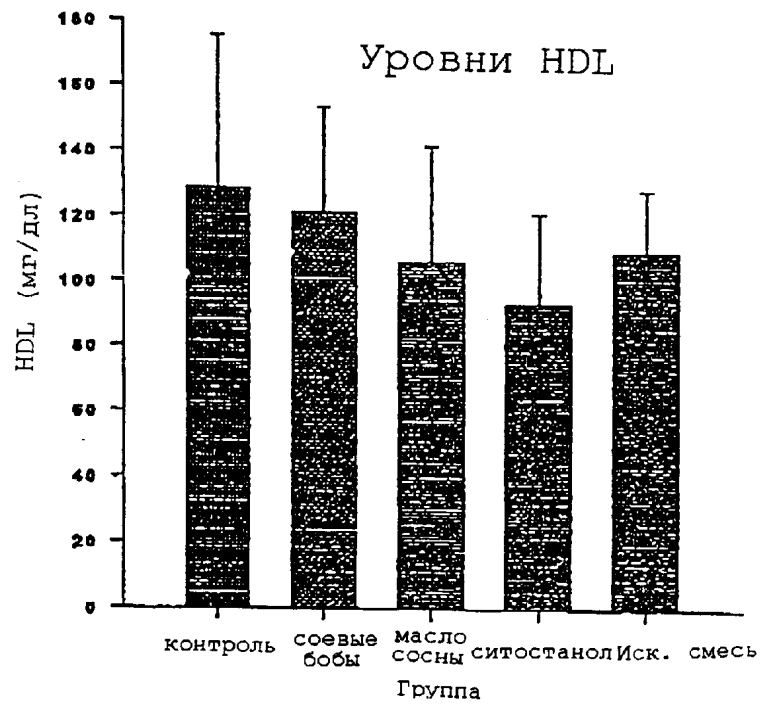
Фиг. 18



Фиг. 19

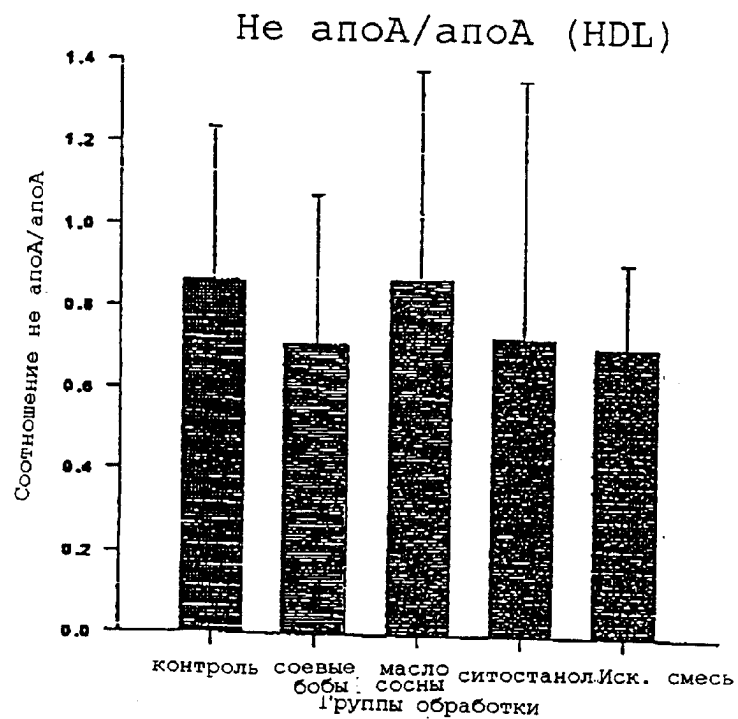


Фиг. 20



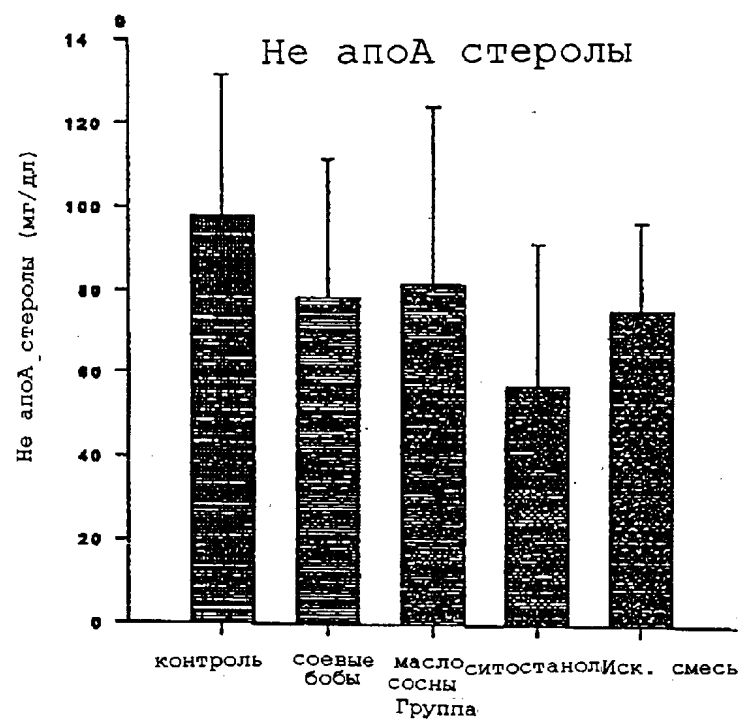
Нет значительной разницы между группами

Фиг. 21



Значительной разницы не наблюдается

Фиг. 22



Группа ситостанола
ниже, чем другие группы

значительно

Фиг. 23