

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092556** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.18

(51) Int. Cl. *A23D 9/00* (2006.01)
A23L 33/115 (2016.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.20

(54) КОМПОЗИЦИИ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, БОГАЩЕННЫЕ ДГК

(31) **18169368.0; 18179081.7**

(72) Изобретатель:
Литтлер Стюарт (AU)

(32) **2018.04.25; 2018.06.21**

(33) **EP**

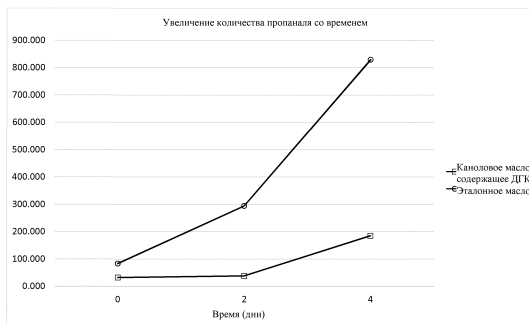
(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(86) **PCT/EP2018/086369**

(87) **WO 2019/206443 2019.10.31**

(71) Заявитель:
НЬЮСИД ПТИ ЛТД. (AU)

(57) В настоящей заявке предложена липидная композиция на растительной основе, содержащая ДГК, АЛК и олеиновую кислоту (обычно в виде сложного эфира жирной кислоты) в конкретных пропорциях. Композиция также содержит низкие уровни ЭПК и пальмитиновой кислоты. Композицию можно получать из одного источника обычными способами обработки, она имеет улучшенные свойства стабильности.



A1

202092556

202092556

A1

КОМПОЗИЦИИ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, ОБОГАЩЕННЫЕ ДГК

Область техники

Варианты реализации, описанные в настоящей заявке, относятся к новым липидным композициям, которые обогащены докозагексаеновой кислотой. Композиции содержат смесь полиненасыщенных жирных кислот, которые обладают рядом преимуществ для здоровья. Композиции могут обеспечивать питательные преимущества и потенциально могут быть получены из одного источника, который является масштабируемым и возобновляемым. Также они обладают повышенной устойчивостью к окислению.

Уровень техники

Длинноцепочечные омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦ ПНЖК) широко признаны в качестве важных соединений для здоровья человека и животных. Такие жирные кислоты можно получать вместе с пищей или в меньшей степени путем превращения линолевой (ЛК, 18:2 ω -6) или α -линоленовой (АЛК, 18:3 ω -3) жирных кислот, которые относят к числу незаменимых жирных кислот в рационе человека.

С точки зрения питания наиболее важными омега-3 жирными кислотами вероятно являются α -линоленовая кислота, эйкозапентаеновая кислота ("ЭПК"; 20:5n-3) и докозагексаеновая кислота ("ДГК"; 22:6n-3). ДГК представляет собой ДЦ ПНЖК, которая является важной для развития мозга и глаз. Прием омега-3 ПНЖК также может способствовать предотвращению коронарных заболеваний. Медицинские исследования ясно показывают, что такие жирные кислоты обладают преимуществами для здоровья, такими как улучшение сердечно-сосудистых и иммунных функций и снижение вероятности рака, диабета и высокого кровяного давления. Результаты клинических исследований показали, что поступление в организм с пищей 5,5 г омега-3 ПНЖК в неделю может быть связано с 50% снижением риска первичной остановки сердца. Следовательно, масло, содержащее омега-3 ПНЖК, пользуется большим спросом в фармацевтических и диетических целях.

Как правило, устойчивость жирной кислоты к окислению заметно снижается при увеличении количества двойных связей углерод-углерод, т.е. степени ненасыщенности. К сожалению, АЛК, ЭПК и ДГК представляют собой полиненасыщенные жирные кислоты, которые легко окисляются. ЭПК (с 5 двойными связями углерод-углерод) значительно больше подвержена окислению, чем АЛК; ДГК (с 6 двойными связями углерод-углерод) подвержена окислению еще больше, чем ЭПК. Как следствие, увеличение содержания

омега-3 приводит к сокращению срока хранения многих продуктов. Указанная проблема становится особенно острой в случае масел, содержащих большое количество ЭПК или ДГК.

В документе US 2015/223483 описаны смеси на основе канолового масла, которые обладают улучшенной устойчивостью к окислению. Устойчивость достигается добавлением одной или более добавок.

В документе US 2011/0027443 описаны жировые и масляные композиции, содержащие конкретные смеси олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты и ДЦ ПНЖК, с улучшенным вкусовым профилем. В документе US 2004/209953 описаны пищевые продукты, содержащие преимущественно моноглицериды и диглицериды ДЦ ПНЖК. В документе US 5130061 описано применение способов переэтерификации и дистилляции для экстракции ДГК из сырых масел. В документе US 9040730 описана очистка липидных смесей, содержащих ПНЖК, для снижения содержания в композиции нежелательных стеролов. В каждом из указанных документов в качестве источника, из которого получают конкретные смеси, применяют рыбий жир или микробные масла.

В международной заявке на патент № 2013/185184 описаны способы получения этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот.

В международной заявке на патент № 2015/089587 и в заявке на патент США № 2015/0166928 описаны растительные липидные композиции, содержащие смесь омега-3 и омега-6 жирных кислот. Генетически модифицированная канола описана в документах WO 2017/218969 и WO 2017/219006.

Перечисление или обсуждение в настоящем описании явно ранее опубликованного документа не следует рассматривать, как признание того, что документ является частью современного уровня техники или является общеизвестным знанием.

Описание изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложена липидная композиция на растительной основе, содержащая:

- докозагексаеновую кислоту (22:6n-3) в количестве от примерно 15 масс.% до примерно 35 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- эйкозапентаеновую кислоту (20:5n-3) в количестве до примерно 5 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- α -линоленовую кислоту (18:3n-3) в количестве от примерно 10 масс.% до примерно 20 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- олеиновую кислоту (18:1n-9) в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 40

масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции; и

- пальмитиновую кислоту в количестве до примерно 1,5 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

где каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты.

Указанные липидные композиции в настоящей заявке называют “композициями согласно настоящему изобретению”.

Настоящее изобретение относится к липидным композициям, содержащим одновременно высокие уровни докозагексаеновой кислоты (ДГК) и α -линоленовой кислоты (АЛК), представленным в виде свободной жирной кислоты, соли, сложного эфира или соли сложного эфира. Было установлено, что указанные композиции можно получать из возобновляемых источников, таких как растительные источники. Также было установлено, что они имеют улучшенный профиль стабильности при хранении, о чем свидетельствует уменьшение разрушения под воздействием окисления при хранении. ДГК, в частности, считают важным соединением для здоровья человека и животных. Указанные композиции можно применять в пищевых продуктах, нутрицевтиках, косметических средствах и других химических композициях. Они также могут подходить для применения в качестве промежуточных продуктов и активных фармацевтических ингредиентов.

Содержание жирных кислот в композициях согласно настоящему изобретению можно определять с применением обычных способов, известных специалистам в данной области. Такие способы включают газовую хроматографию (ГХ) с применением стандартных образцов, например, в соответствии со способами, описанными в примерах. В конкретном способе жирные кислоты превращают в метиловые или этиловые эфиры перед ГХ исследованием. Такие способы описаны в примерах. Положение пика на хроматограмме можно использовать для идентификации каждой конкретной жирной кислоты, а интегральную площадь под каждым пиком можно использовать для определения количества. Если не указано иное, применяемое в настоящей заявке процентное содержание конкретной жирной кислоты в образце определяют путем вычисления площади под кривой на хроматограмме для указанной жирной кислоты в процентах от общей площади жирных кислот на хроматограмме. Полученное значение соответствует массовому проценту (масс./масс.). Идентичность жирных кислот можно подтверждать путем ГХ-МС.

Если не указано иное, ссылки на докозагексаеновую кислоту и “ДГК” в указанном

контексте указывают на $\omega 3$ -форму докозагексаеновой кислоты, т.е. на докозагексаеновую кислоту, имеющую ненасыщенность (двойную связь углерод-углерод) по связи углерод-углерод, находящейся в третьем положении от метильного конца жирной кислоты. Сокращенные формы, которые можно применять взаимозаменяемо, включают “22:6n-3” и “22:6 ω -3”.

В общем, термины “полиненасыщенная жирная кислота” и “ПНЖК” относятся к жирной кислоте, которая содержит по меньшей мере две двойные связи углерод-углерод. Термины “длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота” и “ДЦ ПНЖК” относятся к жирной кислоте, которая содержит по меньшей мере 20 атомов углерода и по меньшей мере две двойные связи углерод-углерод в своей углеродной цепи, и, следовательно, включают ОДЦ ПНЖК. Термины “полиненасыщенная жирная кислота с очень длинной цепью” и “ОДЦ ПНЖК”, применяемые в настоящей заявке, относятся к жирной кислоте, которая содержит по меньшей мере 22 атома углерода и по меньшей мере три двойные связи углерод-углерод в своей углеродной цепи. Обычно число атомов углерода в углеродной цепи жирной кислоты относится к неразветвленной углеродной цепи. Если углеродная цепь разветвлена, указываемое количество атомов углерода не включает количество атомов углерода в боковых группах.

Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты могут представлять собой $\omega 3$ (“омега-3”) жирные кислоты, т.е. жирные кислоты, имеющие ненасыщенность (двойную связь углерод-углерод) по связи углерод-углерод, находящейся в третьем положении от метильного конца жирной кислоты. Альтернативно они могут представлять собой $\omega 6$ (“омега-6”) жирные кислоты, т.е. жирные кислоты, имеющие ненасыщенность (двойную связь углерод-углерод) по связи углерод-углерод, находящейся в шестом положении от метильного конца жирной кислоты. Хотя могут присутствовать другие типы ненасыщенности, формы $\omega 6$ и особенно $\omega 3$ являются особенно важными в контексте настоящего изобретения.

Композиции согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере две различные полиненасыщенные жирные кислоты, включая ДГК и α -линоленовую кислоту (АЛК, 18:3n-3). В одном из вариантов реализации либо ДГК, либо АЛК является жирной кислотой, присутствующей в композиции в наибольшем количестве (по массе от общего содержания жирных кислот в композиции). В другом варианте реализации ДГК и АЛК являются двумя жирными кислотами, присутствующими в композиции в наибольшем количестве.

Компоненты (i) - (v) могут присутствовать в композициях согласно настоящему изобретению в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной

кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты.

Термин “жирная кислота”, применяемый в настоящей заявке, относится к карбоновой кислоте (или органической кислоте), обычно с длинным алифатическим хвостом, насыщенным или ненасыщенным. Как правило, жирные кислоты имеют цепь из связей углерод-углерод, имеющую длину по меньшей мере 8 атомов углерода, более конкретно длину по меньшей мере 12 атомов углерода. Большинство природных жирных кислот имеют четное число атомов углерода, потому что их биосинтез включает ацетат, который содержит два атома углерода. Жирные кислоты могут находиться в свободном состоянии (неэтерифицированном), называемом в настоящей заявке “свободной жирной кислотой”, или в этерифицированной форме, такой как алкиловый эфир, часть триглицерида, часть диацилглицерида, часть моноацилглицерида, ацил-КоА (тиоэфир) или другая связанная форма, или в виде их смеси. Жирная кислота может находиться в этерифицированной форме в виде фосфолипида, такого как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит или дифосфатидилглицерин, хотя предпочтительно она находится в этерифицированной форме в виде сложного алкилового эфира, особенно в виде этилового эфира. Во избежание разночтений, если не указано иное, термин “жирная кислота” охватывает свободные жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот и соли жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот. Если не указано иное, количественные значения, связанные с конкретными жирными кислотами, относятся к количеству (рассчитанному по массе) указанной присутствующей жирной кислоты, независимо от формы (например, свободной кислоты или сложного эфира), в которой она присутствует.

Каждая жирная кислота в композиции также находится в виде соли жирной кислоты, например, соли щелочного металла или соли щелочноземельного металла. Конкретные соли, которые могут являться примерами, включают соли лития и соли кальция. Такие соли обладают потенциальными дополнительными медицинскими преимуществами или улучшают технологические свойства. Аналогично, сложный эфир жирной кислоты может находиться в виде соли сложного эфира жирной кислоты. В композициях согласно настоящему изобретению может присутствовать любая комбинация жирных кислот в виде свободных жирных кислот, солей, сложных эфиров или солей сложных эфиров. Под этим подразумевается, что, например, ДГК может присутствовать преимущественно в виде этилового эфира, АЛК может присутствовать преимущественно в виде кальциевой соли метилового эфира, а олеиновая кислота может присутствовать преимущественно в виде свободной жирной кислоты.

“Насыщенные жирные кислоты” не содержат двойных связей или других

функциональных групп в цепи. Термин “насыщенный” относится к водороду, т.е. к ситуации, когда все атомы углерода (кроме карбоксильной группы [-COOH]) содержат максимально возможное количество атомов водорода. Другими словами, концевой атом в омега-положении (ω) присоединен к трем атомам водорода (CH_3 -), и каждый атом углерода в цепи присоединен к двум атомам водорода ($-\text{CH}_2$ -). Термин “жирная кислота, в целом” включает жирные кислоты во всех формах, будь то насыщенные или ненасыщенные, свободные кислоты, сложные эфиры и/или соли.

Термин “примерно”, применяемый в настоящей заявке в отношении измеряемой величины, такой как количество соединения, масса, время, температура и т.п., относится к отклонениям 20%, 10%, 5%, 1%, 0,5% или даже 0,1% от указанного значения.

Композиции согласно настоящему изобретению, которые могут являться примерами, включают композиции, которые содержат высокую концентрацию омега-3 жирных кислот, многие из которых являются так называемыми “незаменимыми жирными кислотами”, которые считаются особенно важными для здоровья человека. Омега-3 жирные кислоты могут оказывать благотворное влияние на уровни холестерина ЛПВП, поддерживать развитие мозга у молодых людей и, как было показано, приносят пользу психическому здоровью. Указанные жирные кислоты обычно считаются предшественниками эйкозаноидов с противовоспалительными свойствами. Конкретные композиции согласно настоящему изобретению, которые могут являться примерами, включают композиции, в которых общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в липидной композиции составляет по меньшей мере примерно 30 масс.%, например, по меньшей мере примерно 35 масс.%, от общего содержания жирных кислот в композиции. В конкретном варианте реализации общее количество омега-3 полиненасыщенной жирной кислоты в липидной композиции составляет по меньшей мере примерно 40 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции.

Омега-6 жирные кислоты также считаются важными для здоровья человека. В частности, некоторые омега-6 жирные кислоты являются “незаменимыми жирными кислотами”, необходимыми для хорошего здоровья, но организм не способен их синтезировать. Тем не менее, было показано, что омега-6 жирные кислоты являются предшественниками эйкозаноидов с более провоспалительными свойствами, поэтому в случае избыточного выработки указанных эйкозаноидов они могут усиливать воспаление и воспалительное заболевание. Таким образом, может являться желательным минимизировать количество таких жирных кислот в липидных композициях. В целом, считают, что отношение омега-6 к омега-3 жирным кислотам в рационе должно составлять 4:1 или менее. Тем не менее, нормальный западный рацион обычно содержит

более высокую долю омега-6 жирных кислот. Липидные композиции согласно настоящему изобретению преимущественно содержат относительно малые количества омега-6 жирных кислот и при этом содержат относительно большие количества более полезных омега-3 жирных кислот. В одном из вариантов реализации общее количество полиненасыщенных омега-6 жирных кислот в композиции составляет не более примерно 8 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции. В другом варианте реализации отношение общей массы полиненасыщенных омега-3 жирных кислот к общей массе полиненасыщенных омега-6 жирных кислот в композиции составляет по меньшей мере примерно 6:1. В другом варианте реализации отношение общей массы полиненасыщенных омега-3 жирных кислот к общей массе полиненасыщенных омега-6 жирных кислот в композиции составляет по меньшей мере примерно 8:1.

Омега-9 жирные кислоты являются мононенасыщенными жирными кислотами, которые могут синтезироваться в организме. Потребление продуктов, богатых омега-9 жирными кислотами, а не другими типами жирных кислот, может иметь ряд полезных эффектов для здоровья, включая снижение уровней в плазме триглицеридов и “плохого” холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) у пациентов с диабетом, уменьшение воспаления и улучшение чувствительности к инсулину. В одном из вариантов реализации общее количество полиненасыщенных омега-3 и омега-9 жирных кислот в липидной композиции составляет по меньшей мере примерно 50 масс.%, например, по меньшей мере примерно 60 масс. % или по меньшей мере примерно 70 масс.%, от общего содержания жирных кислот в композиции. В другом варианте реализации отношение общей массы полиненасыщенных омега-3 и омега-9 жирных кислот к общей массе полиненасыщенных омега-6 жирных кислот в композиции составляет по меньшей мере примерно 5:1, например, по меньшей мере примерно 10:1.

Липидные композиции, содержащие длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, обычно получают из морских источников (например, рыбы, ракообразных), водорослевых источников или растительных источников (например, льна или эхиума). Исходное органическое сырье сначала обрабатывают, чтобы извлечь масло (обычно называемое “сырым” маслом), содержащееся в нем. В случае семян растений, например, семена измельчают для выделения масла, которое затем отделяют от твердого вещества путем фильтрования и/или декантирования. Сырые масла обычно содержат уровни полиненасыщенных жирных кислот, которые являются слишком низкими для применения (например, в качестве пищевых продуктов), поэтому требуется обогащение. В тех случаях, когда в сыром масле отсутствует один или более основные компоненты, его обычно смешивают с сырыми или обогащенными маслами из нескольких источников

(например, из рыбы и водорослей) для получения желаемой композиции. Альтернативно, обогащение можно проводить путем переработки сырого масла для удаления нежелательных компонентов (например, компонентов, которые оказывают вредное воздействие на цвет, запах или стабильность продукта, или нежелательные жирные кислоты), тем самым максимизируя уровни желаемых компонентов жирных кислот.

Композиции согласно настоящему изобретению преимущественно получают из одного источника. Использование одного источника облегчает эффективную и экономичную обработку сырого масла и производство липидных композиций согласно настоящему изобретению. Под фразой “получаемая из одного источника” (или “полученная из одного источника”) понимают, что липидную композицию можно получать из одного или более организмов из одного таксономического класса. В конкретном варианте реализации липидную композицию не получают из нескольких организмов из разных таксономических классов. Например, липидные композиции могут не представлять собой смеси масел, полученных из комбинации рыб и водорослей или комбинации рыб и растений. Вместо этого липидные композиции согласно настоящему изобретению (или “сырые” масла, из которых можно получать композиции при помощи способов обогащения, таких как переэтерификация и дистилляция) можно получать из одной популяции организмов, например, из одного источника растительного сырья или растительности. Во избежание разночтений фраза “получаемая из одного источника” не исключает использования нескольких организмов одного и того же вида в качестве источника липидной композиции или “сырого” масла, т.е. использование множества рыб, водорослей, растений или семян растений, относящихся к одному виду. Указанные множества организмов предпочтительно относятся к одному виду, к одной селекционной линии, к одному сорту растений или к одной производственной группе или партии.

В конкретных липидных композициях согласно настоящему изобретению ДГК присутствует в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% (например, от примерно 22 масс.% до примерно 33 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

Было установлено, что липидные композиции согласно настоящему изобретению содержат высокий уровень ДГК по сравнению с количеством присутствующей ЭПК. Таким образом, в одном из вариантов реализации массовое отношение докозагексаеновой кислоты к эйкозапентаеновой кислоте в липидных композициях составляет по меньшей мере примерно 20:1. В других вариантах реализации массовое отношение докозагексаеновой кислоты к эйкозапентаеновой кислоте в липидных композициях может превышать примерно 25:1, например, может превышать примерно 30:1, и наиболее

предпочтительно может превышать примерно 35:1.

Предпочтительно, количество ЭПК в композициях может являться относительно низким. Композиции согласно настоящему изобретению содержат до примерно 5 масс.% ЭПК от общего содержания жирных кислот в композиции. В конкретных вариантах реализации композиции содержат до примерно 3 масс.%, более конкретно до примерно 1 масс.% ЭПК от общего содержания жирных кислот в композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению содержат α -линоленовую кислоту (АЛК) в количестве от примерно 10 масс.% до примерно 20 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции. АЛК представляет собой незаменимую жирную кислоту, которая важна для полноценного здоровья человека или животного. В конкретных вариантах реализации композиции содержат АЛК в количестве от примерно 12 масс.% до примерно 20 масс.%, более конкретно от примерно 12 масс.% до примерно 18 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции.

Олеиновая кислота является компонентом композиций согласно настоящему изобретению, присутствующим в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 40 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции. Олеиновая кислота является распространенной мононенасыщенной жирной кислотой в рационе человека. Потребление мононенасыщенной жирной кислоты связано с уменьшением холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и возможно с увеличением холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). В одном из вариантов реализации олеиновая кислота присутствует в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции. В другом варианте реализации олеиновая кислота присутствует в количестве от примерно 22 масс.% до примерно 33 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению содержат до примерно 1,5 масс.% пальмитиновой кислоты (16:0) от общего содержания жирных кислот в композиции. В конкретных вариантах реализации композиции содержат до примерно 1,0 масс.%, более конкретно до примерно 0,7 масс.% пальмитиновой кислоты от общего содержания жирных кислот в композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению также содержат по меньшей мере примерно 0,5 масс.% эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК, 20:4n-3) от общего содержания жирных кислот в композиции. В конкретных вариантах реализации композиции содержат по меньшей мере примерно 1,0 масс.%, более конкретно по меньшей мере примерно 1,5 масс.% ЭТК от общего содержания жирных кислот в композиции.

Если контекст не указывает иное, предпочтения и варианты для данного аспекта,

отличительные признаки или варианты реализации изобретения следует считать раскрытыми в комбинации с любыми и всеми предпочтениями и вариантами для всех других аспектов, отличительными признаками или вариантами реализации изобретения. Например, конкретные количества ДГК, ЭПК, АЛК, олеиновой кислоты и пальмитиновой кислоты, указанные в предыдущих абзацах, описаны во всех комбинациях.

Таким образом, конкретная липидная композиция, которая может являться примером, представляет собой такую композицию, которая содержит:

- докозагексаеновую кислоту (22:6n-3) в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- эйкозапентаеновую кислоту (20:5n-3) в количестве до примерно 3 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- α -линоленовую кислоту (18:3n-3) в количестве от примерно 12 масс.% до примерно 20 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;
- олеиновую кислоту (18:1n-9) в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции; и
- пальмитиновую кислоту в количестве до примерно 1,0 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

где каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты.

В композициях согласно настоящему изобретению каждый из компонентов (i) - (v) представляет собой жирную кислоту, которая независимо может присутствовать в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты. В конкретном варианте реализации каждый из указанных компонентов имеет одну и ту же форму, например, они все могут находиться в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты. Если компоненты находятся в виде соли жирной кислоты, сложного эфира или соли сложного эфира, то компоненты могут находиться в виде одной и той же соли, сложного эфира или соли сложного эфира. Например, каждый из компонентов (i) - (v) может находиться в виде этилового эфира жирной кислоты.

В конкретном варианте реализации компоненты (i) - (v) представлены в виде соли сложного эфира жирной кислоты или более конкретно в виде сложного эфира жирной кислоты. Специалисту в данной области известны подходящие формы сложных эфиров жирных кислот. Например, формы сложного эфира жирной кислоты, которые являются питательно приемлемыми и/или фармацевтически приемлемыми, включают этиловые

эфиры, метиловые эфиры, фосфолипиды, моноглицериды, диглицериды и триглицериды жирных кислот. В зависимости от предполагаемого применения липидной композиции могут потребоваться различные сложноэфирные формы. Например, триглицериды особенно подходят для применения в пищевых продуктах, предназначенных для потребления человеком, особенно для младенческого потребления, отчасти из-за вкуса и стабильности указанных сложноэфирных форм при термической обработке (что может потребоваться для таких пищевых продуктов). Этиловые эфиры особенно подходят для применения в пищевых добавках, так как указанные сложноэфирные формы можно производить эффективно и легко, и превращение в триглицеридную форму не является обязательным. Таким образом, в другом варианте реализации каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде этилового эфира жирной кислоты или как часть триглицерида.

Триглицериды представляют собой сложные эфиры, полученные из глицерина и трех жирных кислот. Поскольку настоящее изобретение относится к смесям жирных кислот, компоненты жирных кислот в таких триглицеридах можно смешивать в соответствующих отношениях. Т.е. хотя в композиции может присутствовать смесь различных молекул триглицеридов, общий профиль жирной кислоты в композиции является таким, как определено в пунктах формулы изобретения.

Альтернативно, компоненты жирных кислот могут присутствовать в виде “свободных” жирных кислот, т.е. в виде -COOH-формы жирной кислоты. Тем не менее, конкретные композиции согласно настоящему изобретению содержат относительно низкие уровни жирных кислот в указанной форме, поскольку они связаны с неприятным (часто “мыльным”) вкусом и менее стабильны, чем жирные кислоты, которые находятся в этерифицированной форме. Свободные жирные кислоты обычно удаляют из масел и липидных композиций путем щелочного или физического рафинирования, например, в соответствии со способами, описываемыми в других разделах настоящей заявки. Таким образом, в одном из вариантов реализации общее содержание свободной жирной кислоты в липидных композициях составляет менее 5 масс.% (например, менее 3 масс.%, в частности, менее 2 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

Жирные кислоты в липидных композициях согласно настоящему изобретению обычно являются жирными кислотами (такими как ДГК, АЛК и т.п.) с линейной (т.е. не разветвленной) цепью. Композиции согласно настоящему изобретению, которые могут являться примерами, включают композиции, которые содержат очень низкие уровни жирных кислот с разветвленной цепью и их сложных эфиров, при которых композиция по существу не содержит жирных кислот с разветвленной цепью и сложных эфиров жирных

кислот с разветвленной цепью. Под терминами “низкие уровни” подразумевают, что композиция содержит жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с разветвленной цепью в количестве не более примерно 0,1 масс.% от общего количества жирных кислот композиции.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать другие компоненты (например, компоненты, отличные от жирных кислот), которые содержатся в исходном сырье и не полностью удаляются в процессе экстракции и обогащения. Конкретные вещества, представляющие такие другие компоненты, сильно различаются в зависимости от исходного сырья. Примеры таких компонентов включают фитостерины (например, растительные стеринны и растительные станола), присутствующие в виде свободного стерина или в виде стеролового сложного эфира (такого как β -ситостерин, β -ситостанол, Δ^5 -авенастерин, кампестерин, Δ^5 -стигмастерин, Δ^7 -стигмастерин и Δ^7 -авенастерин, холестерин, брассикастерин, халинастерин, кампестерин, кампестанол и эбурикол). Другие примеры включают антиоксиданты, такие как токоферолы и токотриенолы. Таким образом, конкретные липидные композиции согласно настоящему изобретению, которые могут являться примерами, включают композиции, которые содержат обнаруживаемые количества одного или более фитостеринов (таких как β -ситостерин). Такие стеринны могут присутствовать в количестве по меньшей мере примерно 0,01 масс.%, но обычно не более, чем примерно 1 масс.%, липидной композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению преимущественно получают из растений (“растительных” источников). Под термином “на растительной основе” подразумевают, что по меньшей мере 70 масс.% липидов, присутствующих в композициях согласно настоящему изобретению, получают из растительных источников. Растительные источники включают растения, в частности зерновые культуры, такие как злаковые растения. По меньшей мере в одном из вариантов реализации липиды получают из масел из семян зерновых культур, таких как Brassica, например, Brassica napus или Brassica juncea. Тем не менее, во избежание разночтений, нет необходимости получения композиций исключительно из таких источников, т.е. часть (например, не более 30 масс.%) липидов в композициях согласно настоящему изобретению можно получать из других источников, включая масла из морских источников (например, из рыбы или ракообразных), масла из водорослей и их комбинации. В одном из примеров по меньшей мере 80 масс.%, например, по меньшей мере 90 масс.% присутствующих липидов получают из растительных источников. В конкретных композициях согласно настоящему изобретению по существу все (т.е. по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или

примерно 100%) липиды получают из растительных источников.

В одном из вариантов реализации композиции согласно настоящему изобретению (и пищевые и фармацевтические композиции, определенные ниже) не имеют животного происхождения (например, из морских животных). Т.е. в таких вариантах реализации липидные композиции не содержат каких-либо компонентов, которые получают из животных, таких как рыба и ракообразные. Полагают, что липидные композиции, в которых отсутствуют компоненты, получаемые из животных, являются выгодными с точки зрения содержания липидов и профиля стабильности, которые можно достигать после стандартных процедур очистки и/или обогащения.

Применение растений в качестве источника липидов или жирных кислот имеет ряд преимуществ. Например, известно, что морские источники масел содержат относительно высокие уровни загрязняющих веществ (таких как ртуть, ПХД и рыбные аллергены (например, парвальбумины)), которые не встречаются в растительных материалах. Также чрезмерный вылов истощил запасы рыбы и ракообразных (например, криля), так что они уже не являются возобновляемыми. Таким образом, в настоящем изобретении предложена масляная композиция, на основе полиненасыщенной жирной кислоты из возобновляемого источника, содержащая относительно низкие уровни нежелательных загрязняющих веществ.

В конкретном варианте реализации композицию согласно настоящему изобретению получают из растения. Растения, из которых получают масла, обычно представляют собой зерна масличных культур, такие как копра, хлопковые семена, лен, пальмовые ядра, арахис, семена рапса, соевые бобы и семена подсолнечника. Таким образом, композиции, получаемые исключительно из растений, можно называть “растительными” маслами или “растительными липидными композициями”. Подходящие растения, из которых можно получать липидные композиции согласно настоящему изобретению, известны специалисту в данной области и включают *Brassica* sp., *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus* sp., *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium* sp., *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana glauca*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*. Конкретный растительный источник, который может являться примером в этом отношении, представляет собой *Brassica* sp.

Подходящие источники (включая морские, водорослевые и растительные источники) могут являться природными или могут подвергаться генетической модификации для повышения их способности продуцировать длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты. Примеры растительных источников, которые

подвергали генетической модификации с указанной целью, т.е. которые происходят из рекомбинантных клеток растений, известны специалисту в данной области и описаны в международных заявках на патенты №№ РСТ/AU2013/000639 (опубликована как документ WO 2013/185184), РСТ/AU2014/050433 (опубликована как документ WO 2015/089587) и РСТ/AU2015/050340 (опубликована как документ WO 2015/196250). Генетически модифицированная канола описана в документах WO 2017/218969 и WO 2017/219006. Описания, приведенные во всех публикациях, указанных в настоящей заявке, включены во всей полноте посредством ссылки.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению можно получать непосредственно из природного источника (например, из животных, водорослей и/или растений). Тем не менее, обычно необходимо обрабатывать масла, полученные из природных источников, для их обогащения. Подходящие способы обогащения приведены в примерах.

Подходящие источники липидных композиций согласно настоящему изобретению или “сырых” масел, которые можно смешивать или обогащать для получения указанных композиций, включают морские виды, водоросли и растения. Способы получения масел из морских источников хорошо известны в данной области.

Растительные источники (например, масличные культуры) особенно подходят благодаря низкому уровню некоторых загрязняющих веществ и превосходной возобновляемости, о чем говорилось выше. Растения, такие как Brassica sp. (например, канола), производят семена, которые можно перерабатывать для получения масла.

Экстракция масел/липидов

Способы, которые обычно применяют в данной области, можно применять для экстракции, обработки и исследования масел, производимых из растений и семян. Как правило, семена растений готовят и прессуют, а затем экстрагируют масло для производства сырого масла. Указанное масло, в свою очередь, можно дегуммировать, рафинировать, отбеливать и/или дезодорировать. Установлено, что комбинация дегуммирования, рафинирования, отбеливания и дезодорирования особенно эффективна для получения липидных смесей, обогащенных ДГК. Таким образом, в одном из вариантов реализации липидную композицию получают из масла из семян, которое дегуммировали, рафинировали, отбеливали и/или дезодорировали. Тем не менее, обработка масла таким образом не является обязательной, и достаточную очистку и обогащение можно обеспечивать без применения указанных процессов.

В целом, способы измельчения семян известны в данной области. Например, масличные культуры можно подвергать тепловой обработке с распылением воды для

повышения содержания влаги, например, до 8,5%, и вальцевать с применением гладкого валика с зазором от 0,23 мм до 0,27 мм. В зависимости от типа семян можно не добавлять воду перед измельчением. Экстракцию также можно осуществлять с применением процесса экструзии. Процесс экструзии можно применять вместо вальцевания, и иногда ее применяют в качестве дополнительного процесса, проводимого до или после отжима на шнековом прессе.

В одном из вариантов реализации большую часть масла из семян выделяют путем измельчения с применением шнекового пресса. Затем твердый материал, выходящий из шнекового пресса, экстрагируют растворителем, например, гексаном, с применением колонки с терморегулятором, после чего растворитель удаляют из экстрагированного масла. Альтернативно, сырое масло, получаемое путем прессования, можно пропускать через отстойный резервуар с дренажной крышкой с прорезями для удаления твердых веществ, которые попадают в масло при прессовании. Отбеленное масло можно пропускать через плиточно-рамный фильтр для удаления оставшихся мелкодисперсных твердых частиц. При желании, масло, извлеченное в процессе экстракции, можно комбинировать с отбеленным маслом для получения смешанного сырого масла. После удаления растворителя из сырого масла прессованные и экстрагированные части объединяют и подвергают нормальной процедуре переработки масла.

Рафинирование и очистка

Термин “очищенный”, применяемый в настоящей заявке в отношении липида или масла согласно настоящему изобретению, обычно означает, что экстрагированный липид или масло подвергали одной или более стадиям обработки для повышения чистоты липидного/масляного компонента. Например, стадии очистки могут включать один или более следующих способов: дегуммирование, дезодорирование, обесцвечивание или сушка экстрагированного масла. Тем не менее, термин “очищенный”, применяемый в настоящей заявке, не включает способ переэтерификации или другой способ, который изменяет композицию жирных кислот липида или масла согласно настоящему изобретению для увеличения процентного содержания ДГК от общего содержания жирных кислот. Другими словами, композиция жирных кислот очищенного липида или масла является по существу такой же, как и в случае неочищенного липида или масла.

Растительные масла можно рафинировать (очищать) после экстрагирования из растительного источника с применением одного или более следующих способов, в частности, с применением комбинации дегуммирования, щелочного рафинирования, отбеливания и дезодорирования. Подходящие способы известны специалистам в данной области (например, способы, описанные в документе WO 2013/185184).

Дегуммирование представляет собой раннюю стадию рафинирования масел, и ее основной целью является удаление из масла большинства фосфолипидов. Добавление к сырому маслу примерно 2% воды, обычно содержащей фосфорную кислоту, при температуре от 70 до 80°C приводит к отделению большинства фосфолипидов вместе со следовыми количествами металлов и пигментов. Удаляемый нерастворимый материал в основном представляет собой смесь фосфолипидов и триацилглицеринов. Дегуммирование можно проводить путем добавления концентрированной фосфорной кислоты к сырому маслу из семян для превращения негидратируемых фосфатидов в гидратируемую форму и для образования хелатных комплексов металлов, которые присутствуют в малых количествах. Смолу отделяют от масла из семян путем центрифугирования.

Щелочное рафинирование представляет собой один из способов рафинирования для обработки сырого масла, иногда также называемый нейтрализацией. Его обычно проводят после дегуммирования и перед отбеливанием. После дегуммирования масло из семян можно обрабатывать путем добавления достаточного количества щелочного раствора для титрования всех свободных жирных кислот и фосфорной кислоты и удаления образовавшихся таким образом мыл. Подходящие щелочные материалы включают гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид лития, гидроксид кальция, карбонат кальция и гидроксид аммония. Щелочное рафинирование обычно проводят при комнатной температуре и удаляют фракцию свободной жирной кислоты. Мыло удаляют путем центрифугирования или экстракции в растворитель для мыла и нейтрализованное масло промывают водой. При необходимости, любую избыточную щелочь в масле можно нейтрализовывать подходящей кислотой, такой как хлористоводородная кислота или серная кислота.

Отбеливание представляет собой способ рафинирования, при котором масла греют при температуре от 90 до 120°C в течение 10-30 минут в присутствии отбеливающей глины (от 0,2 до 2,0%) и при отсутствии кислорода при обработке азотом или паром или при выдерживании в вакууме. Отбеливание предназначено для удаления нежелательных пигментов (каротиноидов, хлорофилла и т.д.), а также при помощи данного способа удаляют продукты окисления, следовые количества металлов, соединения серы и следовые количества мыла.

Дезодорирование представляет собой обработку масел и жиров при высокой температуре (например, примерно 180°C) и низком давлении (от 0,1 до 1 мм рт. ст.). Дезодорирование обычно проводят путем введения пара в масло из семян со скоростью примерно 0,1 мл/мин/100 мл масла из семян. Примерно через 30 минут продувания масло

из семян охлаждают под вакуумом. Указанная обработка улучшает цвет масла из семян и позволяет удалять большинство летучих веществ или пахучих соединений, включая любые оставшиеся свободные жирные кислоты, моноацилглицерины и продукты окисления.

Вымораживание представляет собой способ, который иногда применяют в промышленном производстве масел для разделения масел и жиров на твердые (стеариновые) и жидкие (олеиновые) фракции путем кристаллизации при пониженных температурах. Первоначально вымораживание применяли на хлопковом масле для получения продукта, не содержащего твердой фракции. Вымораживание обычно применяют для снижения содержания насыщенных жирных кислот в маслах.

Переэтерификация

Сырые масла обычно содержат желаемые жирные кислоты в виде триацилглицеринов (ТАГ). Переэтерификация представляет собой способ, который можно применять для обмена жирных кислот внутри и между ТАГ или для переноса жирных кислот на другой спирт с получением сложного эфира (такого как этиловый эфир или метиловый эфир). В вариантах реализации согласно настоящему изобретению переэтерификацию проводят с применением химических средств, обычно включающих сильную кислоту или основание в качестве катализатора. Этоксид натрия (в этаноле) является примером сильного основания, которое применяют для получения этиловых эфиров жирных кислот путем переэтерификации. Способ можно осуществлять при температуре окружающей среды или при повышенной температуре (например, до примерно 80°C).

Дистилляция

Молекулярная дистилляция является эффективным способом удаления из сырых масел значительных количеств более летучих компонентов, таких как насыщенные жирные кислоты. Дистилляцию обычно проводят при пониженном давлении, например, ниже примерно 1 мбар. Затем температуру и время можно выбирать для достижения примерно 50:50 разделения между дистиллятом и остатком после времени дистилляции в течение нескольких часов (например, от 1 до 10). Типичные температуры дистилляции, применяемые для получения липидных композиций согласно настоящему изобретению, находятся в диапазоне от 120°C до 180°C, особенно между 145°C и 160°C.

Можно проводить несколько дистилляций, причем каждую из дистилляций считают завершенной, когда достигают примерно 50:50 разделения между дистиллятом и остатком. Применение последовательных дистилляций снижает общий выход, тем не менее, две дистилляции могут давать оптимальные результаты.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предложен способ получения липидной композиции согласно настоящему изобретению, который включает получение смеси этиловых эфиров жирных кислот; подвергание указанной смеси первой стадии молекулярной дистилляции для получения первого остатка; и подвергание первого остатка второй стадии молекулярной дистилляции. Настоящее изобретение также относится к липидным композициям, которые можно получать с применением таких способов дистилляции. Подходящие условия дистилляции включают условия, описанные в настоящей заявке. Например, конкретные температуры дистилляции, которые можно применять на первой и второй стадиях молекулярной дистилляции, находятся в диапазоне от 120 до 180°C, например, между 145 и 160°C. Температуру и время выбирают для достижения примерно 50:50 разделения между дистиллятом и остатком после времени дистилляции, составляющем, как правило, от примерно 1 часа до примерно 10 часов. Неожиданно было установлено, что дистилляцию переэтерифицированных масел на растительной основе можно проводить при такой же или немного более низкой (например, на 3°C) температуре, чем в случае переэтерифицированных масел другого происхождения (особенно таких, которые содержат значительное количество (например, более 30 масс.%) масел морского происхождения), без потери эффективности для разделения. Т.е. время дистилляции не нужно увеличивать, и на самом деле можно уменьшать, сохраняя при этом такую же степень разделения (например, 50:50 разделение по массе) в разумные сроки.

В одном из вариантов реализации сырое масло нагревают на первой стадии дистилляции в течение времени от 4 до 8 часов, например, от 4 до 6 часов. В том же или другом варианте реализации сырое масло нагревают на второй стадии дистилляции в течение времени от 0,5 до 4 часов, например от 1 до 2 часов.

В варианте реализации согласно второму аспекту настоящего изобретения смесь этиловых эфиров жирных кислот получают путем переэтерификации липидного масла на растительной основе, например, в соответствии с любым из описанных выше способов. Липидное масло на растительной основе можно получать из любого из растений, в частности масличных культур, описанных в настоящей заявке или известных в данной области.

Другие способы обогащения

Липидные композиции согласно настоящему изобретению подходят для применения в качестве активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) или в качестве предшественников (или “промежуточных продуктов”) АФИ, которые можно получать из них путем дополнительного обогащения. Такие композиции дополнительно обогащают

полезными ПНЖК, такими как ДГК и/или АЛК.

Концентрацию полиненасыщенных жирных кислот в масле можно увеличивать с помощью различных способов, известных в данной области, таких как, например, кристаллизация вымораживанием, образование комплексов с применением мочевины, сверхкритическая флюидная экстракция и комплексообразование с ионами серебра. Образование комплексов с мочевиной представляет собой простой и эффективный способ снижения уровня насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в масле. Первоначально ТАГ в масле разделяют на их составляющие жирные кислоты, часто в виде сложных эфиров жирных кислот. Затем указанные свободные жирные кислоты или сложные эфиры жирных кислот, которые обычно не изменяются в композиции жирных кислот при обработке, можно смешивать с этанольным раствором мочевины для образования комплексов. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты легко образуют комплексы с мочевиной и кристаллизуются при охлаждении, а затем их можно удалять путем фильтрования. Таким образом, фракцию, не содержащую комплексы с мочевиной, обогащают длинноцепочечными полиненасыщенными жирными кислотами.

Продукты

Липидные композиции согласно настоящему изобретению представляют собой масла, хранящиеся в крупных резервуарах. Т.е. липидную композицию отделяют от исходного материала (например, семян растения), из которого получают некоторые или все липиды.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению можно применять в качестве пищевых продуктов. Т.е. композиции согласно настоящему изобретению можно представлять в форме, подходящей для перорального применения. Для целей настоящего изобретения “пищевые продукты” включают любую пищу или препараты для потребления человеком или животными, которые при попадании в организм обеспечивают питание, рост тканей или получение энергии; и/или поддерживают, восстанавливают или обеспечивают надлежащий пищевой статус или метаболическую функцию. Пищевые продукты включают пищевые композиции для младенцев и/или детей, такие как, например, детское питание. В случае пищевых продуктов жирные кислоты можно представлять в виде триглицеридов, чтобы дополнительно минимизировать любые неприятные вкусы и обеспечить максимальную стабильность.

Пищевые продукты содержат липидную композицию согласно настоящему изобретению, необязательно совместно с подходящим веществом-носителем. Термин “вещество-носитель” применяют в самом широком смысле для охвата любого компонента, который может иметь или не иметь питательную ценность. Как понятно

специалисту в данной области, вещество-носитель должно подходить для применения (или должно применяться в достаточно низкой концентрации) в пищевом продукте таким образом, что оно не оказывает вредного воздействия на организм, который потребляет пищевой продукт.

Композиция пищевого продукта может находиться в твердой или жидкой форме. Кроме того, композиция может содержать съедобные макронутриенты, белки, углеводы, витамины и/или минералы в количествах, желательных для конкретного применения, как хорошо известно в данной области. Количества указанных ингредиентов варьируются в зависимости от того, предназначена ли композиция для применения обычными индивидуумами или для применения индивидуумами, имеющими специальные потребности, такими как индивидуумы, страдающие нарушениями обмена веществ, и т.п.

Примеры подходящих веществ-носителей с питательной ценностью включают макронутриенты, такие как пищевые жиры (например, кокосовое масло, масло бурачника, грибное масло, масло черной смородины, соевое масло и моно- и диглицериды), углеводы (например, глюкоза, пищевая лактоза и гидролизованный крахмал) и белки (например, соевые белки, электродиализированная сыворотка, электродиализированное обезжиренное молоко, молочная сыворотка или гидролизаты указанных белков).

Витамины и минералы, которые можно добавлять к описанным в настоящей заявке пищевым продуктам, включают, например, кальций, фосфор, калий, натрий, хлорид, магний, марганец, железо, медь, цинк, селен, йод, витамины А, Е, D и С и комплекс витаминов В.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению можно применять в фармацевтических композициях. Такие фармацевтические композиции содержат липидную композицию согласно настоящему изобретению, необязательно совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или веществами-носителями, которые известны специалисту в данной области. Подходящие вспомогательные вещества, разбавители или вещества-носители включают забуференный фосфатом физиологический раствор, воду, этанол, многоатомные спирты, смачивающие агенты или эмульсии, такие как эмульсия вода/масло. Композиция может находиться в жидкой или твердой форме, в том числе в виде раствора, суспензии, эмульсии, масла или порошка. Например, композиция может находиться в форме таблетки, капсулы, инкапсулированного геля, жидкости (включая масло или раствор) или порошка для приема внутрь или мази или крема для местного нанесения. Фармацевтическую композицию также можно представлять в виде препарата для внутривенного введения.

Конкретные формы, подходящие для пищевых продуктов и фармацевтических композиций, включают капсулы, содержащие жидкости, и инкапсулированные гели.

Перед применением липидные композиции согласно настоящему изобретению можно смешивать с другими липидами или липидными смесями (в частности, со сложными эфирами жирных кислот на растительной основе и смесями сложных эфиров жирных кислот). Липидные композиции согласно настоящему изобретению можно представлять совместно с одним или более дополнительными компонентами, выбранными из группы, состоящей из антиоксиданта (например, токоферола (такого как альфа-токоферол или гамма-токоферол) или токотриенола), стабилизатора и поверхностно-активного вещества. Альфа-токоферол и гамма-токоферол являются природными компонентами в различных маслах из семян растений, включая каноловое масло.

Также может являться желательным добавлять изотонические агенты, например сахара, хлорид натрия и т.п. Помимо таких инертных разбавителей композиция также может содержать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки. Суспензии в дополнение к липидным композициям согласно настоящему изобретению могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант или смеси указанных веществ.

Твердые лекарственные формы, такие как таблетки и капсулы, можно получать с применением способов, хорошо известных в данной области. Например, жирные кислоты, полученные в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, можно таблетировать с обычными базами для таблеток, такими как лактоза, сахароза и кукурузный крахмал, в комбинации со связующими веществами, такими как аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин, дезинтегрирующими агентами, такими как картофельный крахмал или альгиновая кислота, и смазывающим веществом, таким как стеариновая кислота или стеарат магния. Капсулы можно получать путем внесения указанных вспомогательных веществ в желатиновую капсулу совместно с соответствующей липидной композицией и необязательно одним или более антиоксидантами.

Возможные способы введения фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению включают, например, энтеральное (например, пероральное и ректальное) и парентеральное. Например, жидкий препарат можно вводить перорально или ректально. Кроме того, однородную смесь можно полностью диспергировать в воде, смешивать в стерильных условиях с физиологически приемлемыми разбавителями,

консервантами, буферами или пропеллентами с получением аэрозоля или формы для вдыхания.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению обозначают как фармацевтические средства. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена композиция согласно настоящему изобретению, включая любую из фармацевтических композиций, описанных выше, для применения в качестве фармацевтического средства.

Липидные композиции согласно настоящему изобретению могут обеспечивать ряд преимуществ, которые обычно связаны с длинноцепочечными полиненасыщенными жирными кислотами. Например, липидные композиции согласно настоящему изобретению и фармацевтические композиции, описанные выше, можно применять для лечения или предотвращения сердечно-сосудистых заболеваний, увеличения выживаемости у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, снижения общего уровня холестерина в сыворотке, снижения высокого уровня АД, увеличения отношения ЛПВП:ЛПНП, снижения уровней триглицеридов или снижения уровней аполипопротеина В, что можно определять с применением исследований, которые хорошо известны специалисту. Соответственно, также описаны способы лечения (или предотвращения) заболеваний и состояний, перечисленных выше, с применением липидных композиций согласно настоящему изобретению.

Термины “лечение”, “лечить” и “излечение”, применяемые в настоящей заявке, относятся к инвертированию, облегчению, ингибированию развития заболевания или расстройства, описанного в настоящей заявке, или к задержке, устранению или уменьшению частоты возникновения или начала развития расстройства или заболевания, описанного в настоящей заявке, по сравнению со случаем, который характеризуется отсутствием указанного лечения. Термины “предотвратить”, “предотвращение” и “предотвращать”, применяемые в настоящей заявке, относятся к снижению риска возникновения или развития указанного состояния или к снижению вероятности или ингибированию рецидива указанного состояния у субъекта, который не болен.

Типичная доза конкретной жирной кислоты составляет от 0,1 мг до 20 г, вводимых от одного до пяти раз в день (до 100 г в день) и, в частности, находится в диапазоне от примерно 10 мг до примерно 1, 2, 5 или 10 г в день (вводимых в одной или нескольких дозах). Как известно в данной области, жирную кислоту, особенно ДЦ ПНЖК, желательно вводить в дозе по меньшей мере примерно 300 мг/день. Тем не менее, понятно, что любое количество жирной кислоты является полезным для субъекта.

При применении в качестве фармацевтической композиции дозировка липидной

композиции, вводимой пациенту, может быть определена специалистом в данной области и зависит от различных факторов, таких как масса пациента, возраст пациента, общее состояние здоровья пациента, прошлая история болезней пациента, иммунный статус пациента и т.д.

Композиции согласно настоящему изобретению представляют собой легко получаемые композиции, которые могут иметь улучшенный профиль стабильности и которые могут содержать смесь жирных кислот, в которых относительные пропорции омега-3, омега-6 и/или омега-9 жирных кислот особенно полезны для здоровья человека. Стабильность можно оценивать с применением различных способов, известных специалистам в данной области. Такие способы включают метод с применением прибора "Rancimat", оценку образования пропаналя (особенно подходящую для омега-3 жирных кислот), оценку образования гексаналя (особенно подходящую для омега-6 жирных кислот), метод "пероксидного числа" (например, с применением официального способа AOCS Cd 8-53) и метод "п-анизидинового числа" (например, с применением официального способа AOCS Cd 18-90). В примерах показано, что композиции согласно настоящему изобретению можно получать из исходных смесей, которые не демонстрируют улучшенный профиль стабильности по сравнению с эталонными смесями (эталонными смесями, имеющими сходный состав с точки зрения ключевых ДЦ ПНЖК, но содержащими значительное количество липидов животного (рыбного) происхождения)

Композиции согласно настоящему изобретению также могут иметь преимущество, заключающееся в том, что они могут являться более эффективными, менее токсичными, более долгодействующими, более сильнодействующими, могут приводить к меньшему количеству побочных эффектов, легче поглощаться, и/или могут иметь лучший фармакокинетический профиль (например, более высокую биодоступность при пероральном применении и/или более низкий клиренс) и/или могут иметь другие полезные фармакологические, физические или химические свойства по сравнению с липидными композициями, известными в уровне техники.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами, в которых:

на фиг. 1 показаны данные о высвобождении пропаналя для канолового масла и эталонного масла (после переэтерификации и дистилляции), демонстрирующие улучшенную стабильность канолового масла, описанного в настоящей заявке; и

на фиг. 2 показаны данные о высвобождении пропаналя для канолового масла и эталонного масла (после РОД, переэтерификации и дистилляции), демонстрирующие улучшенную стабильность канолового масла, описанного в настоящей заявке.

Общие способы

Подготовка образцов для ГХ и параметры ГХ

Чистые этиловые эфиры жирных кислот разбавляли до 0,25% (об./об.) в 50:50 смеси хлороформ:метанол и 0,01% БГТ. Растворы этиловых эфиров разбавляли до 2,5 мг/мл в смеси хлороформ:метанол.

Контрольные растворы готовили в виде метиловых эфиров жирных кислот для канолового масла, тунцового жира и смеси 3х каноловое масло-ДГК. Анализ проводили для каждой партии образцов для проверки эффективности ГХ и контроля за любым разрушением ДГК под воздействием системы ГХ.

Метиловые эфиры получали следующим образом:

Чистое масло разбавляли до 0,33% (об./об.) в 50:50 смеси хлороформ:метанол и 0,01% БГТ (бутилированный гидрокситолуол). Добавляли 50 мкл 0,05 н. раствора Meth-Prep II (0,2 н. метанольного раствора гидроксида м-трифторметилфенилтриметиламмония), раствор перемешивали на вортексе и инкубировали при 40°C в течение 30 мин. Конечный раствор был эквивалентен 0,25% (об./об.) масла.

Этиловый эфир (образцы) и метиловый эфир (контроль) исследовали на Shimadzu GC-2010 Plus с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и вводом пробы с делением потока с применением следующих параметров:

Колонка: 30 м ВРХ-70, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм. Объем вводимой пробы: 0,5 мкл.

Результаты рассчитывали путем нормирования площадей (т.е. определяли % площади пиков жирных кислот и исключали пики, отличные от жирных кислот, из суммы площадей всех пиков).

Пики этиловых эфиров идентифицировали путем сравнения хроматограмм этиловых эфиров жирных кислот с хроматограммами метиловых эфиров жирных кислот. Относительный порядок элюирования являлся идентичным, однако этиловые эфиры элюировались группой позже по сравнению с метиловыми эфирами жирных кислот. Порядок элюирования метиловых эфиров жирных кислот заранее идентифицировали с применением стандартных образцов и ГХ-МС.

Примеры

Пример 1 - Экстракция канолового масла, содержащего ДГК, из семян

Вид канолы, описанный в опубликованной заявке на патент США № 2018/0016590 A1, выращивали, как яровую культуру. Семена собирали, а затем хранили при комнатной температуре до измельчения.

Для получения масла, содержащего ДГК, 272 кг семян измельчали с применением шнекового пресса Kern Kraft КК80. Температуру кольцевого нагревателя пресса устанавливали на максимальное значение, допускаемое термостатом. Начальные температуры окружающей среды и дроссельной заслонки составляли 20°C, дроссельную заслонку устанавливали на расстоянии 73,92 мм. Вводили семена и непрерывно собирали масло и измельченные семена, не выключая пресс до полного измельчения семян.

При проведении прессования контролировали скорость вращения шнека, температуру измельченных семян и извлекаемого масла. Время измельчения составляло 4 часа для 270 кг, что соответствует пропускной способности 67,5 кг/час. Получали выход 87,2 кг (32%) сырого масла. После фильтрования для удаления мелкодисперсных частиц получали выход 77,2 кг (28%).

Пример 2 – Эталонная масляная смесь

Чистый рыбий жир содержит низкие уровни АЛК жирных кислот и значительно более высокие уровни ЭПК и ДГК. Эталонную масляную смесь (называемую в настоящей заявке “сырой эталонной триглицеридной масляной смесью” или аналогично) подбирали таким образом, чтобы она была как можно более близка по составу к фильтруемому каноловому маслу, содержащему ДГК, полученному в примере 1. Такой подбор осуществляли путем (а) приведения в соответствие общего уровня ДГК и уровня ДГК в каноловом масле и (b) приведения в соответствие отношения ДГК/(АЛК + ЭПК). Это достигали путем смешивания рыбьего жира, богатого ДГК (тунец), масла, богатого АЛК (льняное масло), и стандартного канолового масла. Полученная эталонная масляная смесь также имела сходное общее содержание омега-3 с каноловым маслом, содержащим ДГК.

Пример 3 - Композиции жирных кислот сырого канолового масла, содержащего ДГК, и эталонной смеси

Исследовали композиции жирных кислот отфильтрованного сырого масла и эталонной масляной смеси. Результаты приведены ниже.

Жирная кислота		Сырое каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%)	Сырое эталонное масло (масс.%)
Пальмитиновая	C16:0	4,3	9,6
Стеариновая	C18:0	1,9	3,8
Олеиновая	C18:1n9c	39,4	30,6
Цис-вакценовая	C18:1n7c	3,6	2,0
Линолевая	C18:2n6c	7,8	11,5
ГЛК	C18:3n6	0,1	0,1
АЛК	C18:3n3	21,9	21,2

Жирная кислота		Сырое каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%)	Сырое эталонное масло (масс.%)
Арахидовая	C20:0	0,7	0,4
СДК	C18:4n3	2,2	0,2
Гондоиновая	C20:1n9c	1,4	0,8
Бегеновая	C22:0	0,3	0,2
ЭТК	C20:4n3	1,0	0,1
Эруковая	C22:1n9c	0,0	0,1
ЭПК	C20:5n3	0,4	1,7
ДПКЗ	C22:5n3	0,9	0,4
ДГК	C22:6n3	10,2	9,8
	Другие	4,0	7,6

Пример 4 - Оценка стабильности масла

Проводили исследование стабильности Rancimat с использованием неочищенного канолового масла, содержащего ДГК, и эталонной смеси, описанных в примерах 1 и 2, соответственно. Способ включал исследование примерно 2,5 г изучаемого материала с применением стандартных процедур Metrohm 743 Rancimat при 90°C.

В приведенной ниже таблице представлены результаты, полученные для указанных масел при 90°C. Эксперименты проводили дважды.

Масло	Время	
Каноловое масло, содержащее ДГК	7 ч 29 мин	7 ч 17 мин
Эталонное масло	10 ч 26 мин	10 ч 11 мин

Каноловое масло, содержащее ДГК, продемонстрировало устойчиво более низкую стабильность по сравнению с эталонным маслом.

Пример 5 - Химическая переэтерификация сырого канолового масла, содержащего ДГК

В сухой, продуваемый азотом химический реактор Buchi CR101, снабженный механической мешалкой, добавляли абсолютный этанол (12,5 л) и сырое триглицеридное каноловое масло ("каноловое масло, содержащее ДГК"), полученное в примере 1 (5,00 кг), и смесь перемешивали.

К вышеуказанной смеси добавляли этоксид натрия (150 г), который промывали в реакторе дополнительным количеством абсолютного этанола (2,5 л), и перемешивание продолжали в течение 16 часов при температуре окружающей среды. ¹H-ЯМР спектр, записанный на образце, взятом из смеси, показал, что реакция завершена.

Процедуру переэтерификации проводили на 5,22 кг сырого канолового масла, содержащего ДГК. К полученной сырой реакционной смеси добавляли петролейный эфир

с температурой кипения 40-60°C (ПЭ, 10 л) и воду (10 л) и смесь при тщательном перемешивании осторожно подкисляли до pH 7 с применением 10% хлористоводородной кислоты (потребовалось 870 мл, индикаторные полоски Merck Universal, pH 0-14).

Полученную смесь оставляли в реакторе, после чего образовывались 2 фазы. ПЭ слой удаляли и водный слой дополнительно экстрагировали ПЭ (3x 5 л). Объединенные ПЭ слои возвращали в реактор и выпаривали в вакууме до небольшого объема (примерно 10 л). Полученный концентрированный раствор выводили из реактора, сушили над безводным сульфатом магния (примерно 1 кг), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением желтого масла (5,13 кг).

Пример 6 - Химическая переэтерификация сырой эталонной масляной смеси

В сухой, продуваемый азотом химический реактор Buchi CR101, снабженный механической мешалкой, добавляли абсолютный этанол (12,5 л) и сырую триглицеридную эталонную масляную смесь, полученную в соответствии с примером 2 (5,00 кг), и смесь перемешивали.

К вышеуказанной смеси добавляли этоксид натрия (150 г), который промывали в реакторе дополнительным количеством абсолютного этанола (2,5 л), и перемешивание продолжали в течение 16 часов при температуре окружающей среды. ¹H-ЯМР спектр, записанный на образце, указывал на малую степень протекания реакции или ее отсутствие. К смеси добавляли дополнительное количество этоксида натрия (57 г) и продолжали перемешивание.

После 5 дополнительных часов ¹H-ЯМР спектр, записанный на образце, указывал на протекание реакции на 75%. К смеси добавляли дополнительное количество этоксида натрия (60 мл 21% раствора в этаноле) и перемешивание продолжали в течение 3 дней, после чего реакция протекала полностью.

Выделение предложенного продукта из сырой эталонной смеси после химической переэтерификации

Процедуру переэтерификации проводили на 5,17 кг сырой эталонной масляной смеси. К полученной сырой реакционной смеси добавляли ПЭ (15 л) и воду (3,3 л) и смесь при тщательном перемешивании осторожно подкисляли до pH 7 с применением 10% хлористоводородной кислоты (потребовалось 910 мл).

Полученную смесь оставляли в реакторе, после чего образовывались 2 фазы. ПЭ слой удаляли и водный слой дополнительно экстрагировали ПЭ (2x 7,5 л). Объединенные ПЭ слои возвращали в реактор и выпаривали в вакууме до небольшого объема (примерно 10 л). Полученный концентрированный раствор выводили из реактора, сушили над безводным сульфатом магния (примерно 1 кг), фильтровали и концентрировали в вакууме

с получением желтого масла (5,39 кг).

Пример 7 - Анализ композиции жирных кислот в переэтерифицированных маслах

Анализировали композиции жирных кислот переэтерифицированных продуктов, полученных в примерах 5 и 6. Результаты приведены ниже.

Жирная кислота		Каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%) (пример 5)	Эталонное масло (масс.%) (пример 6)
Пальмитиновая	C16:0	4,3	9,4
Стеариновая	C18:0	1,9	3,7
Олеиновая	C18:1n9c	39,1	31,2
Цис-вакценовая	C18:1n7c	3,6	2,0
Линолевая	C18:2n6c	7,8	11,9
ГЛК	C18:3n6	0	0
АЛК	C18:3n3	22,0	22,3
Арахидиновая	C20:0	0,6	0,4
СДК	C18:4n3	2,2	0,2
Гондоиновая	C20:1n9c	1,3	0,7
Бегеновая	C22:0	0,3	0,2
ЭТК	C20:4n3	1,0	0,1
Эруковая	C22:1n9c	0,0	0,0
ЭПК	C20:5n3	0,4	1,8
ДПКЗ	C22:5n3	0,9	0,4
ДГК	C22:6n3	10,3	9,7
	Другие	4,1	5,9

Пример 8 - Дистилляция переэтерифицированных каноловых масел

Стандартная процедура удаления более летучих компонентов смесей этиловых эфиров жирных кислот (FAEE) путем вакуумной дистилляции

Проводили дистилляцию сырых этиловых эфиров жирных кислот (FAEE) из сырого канолового масла, содержащего ДГК (полученного в примере 5), в следующих условиях. Разделение методом дистилляции проводили путем пропускания переэтерифицированного сырого масла через 2-дюймовый (50 мм) пленочный испаритель Pore, в котором поддерживали вакуум, оборудованный 2 x 1000 мл колбами-приемниками, в которые собирали дистиллят и остаток. Проводили анализ композиции жирных кислот в каждой из колб.

Вакуум обеспечивали роторным насосом Edwards 3, уровень вакуума измеряли вакуумметром Ebro VM2000.

Масло подавали в испаритель при помощи шлангового насоса Cole-Palmer Instrument Company Easy-load II с расходом 4 мл/мин, при этом двигатель испарителя устанавливали на 325 об/мин и для конденсации дистиллята применяли обратный холодильник с водным охлаждением. Поток подавали до тех пор, пока не заполнялась

первая или вторая колба-приемник.

FAEE из сырого канолового масла, содержащего ДГК, подвергали дистилляции в указанных условиях, при этом нагревательные дуги изначально устанавливали на 147°C. Задачей являлось получение 50:50 разделения дистиллят:остаток. В течение первых 30-45 минут эксперимента температуру нагревательных дуг увеличивали до 154°C для увеличения относительного количества дистиллированного масла, а затем оставляли испаритель для установления равновесия. Через полчаса температуру нагревательных дуг в течение получаса понижали до 149°C. Заключительную стадию дистилляции проводили при 149°C. Общее время дистилляции составляло 350 минут. Из части остатка, полученного при проведении вышеуказанной дистилляции, дополнительно удаляли более летучие компоненты путем дистилляции в стандартных условиях, где температуру нагревательных дуг устанавливали на 149°C. Общее время дистилляции составляло 95 минут.

Дистилляция	Сырье	Дистиллят	Остаток
Первая	1395,4 г	699,5 г	690,5 г
Вторая	376,3 г	211,7 г	160,3 г

Пример 9 - Дистилляция FAEE, полученных из переэтерифицированной сырой эталонной смеси

Проводили дистилляцию сырых этиловых эфиров жирных кислот (FAEE) из сырого эталонной смеси (полученной в примере 6) в условиях, аналогичных описанным в предыдущем примере.

FAEE из сырой эталонной смеси подвергали дистилляции в указанных стандартных условиях, при этом нагревательные дуги изначально устанавливали на 152°C. Задачей являлось получение 50:50 разделения дистиллят:остаток. Через 20 минут температуру нагревательных дуг устанавливали на 154°C для увеличения потока дистиллята. Еще через час температуру нагревательных дуг изменяли до 153°C, а затем до 152°C в течение следующего часа. В последний час дистилляции температуру нагревательных дуг устанавливали на 153°C. Общее время дистилляции составляло 380 минут. Из остатка, полученного при проведении вышеуказанной дистилляции, дополнительно удаляли более летучие компоненты путем дистилляции в стандартных условиях. Задачей являлось получение 50:50 разделения дистиллят:остаток. Дистилляцию в основном проводили при температуре нагревательных дуг 150-151°C. Общее время дистилляции составляло 195 минут.

Дистилляция	Сырье	Дистиллят	Остаток
Первая	1515,7 г	729,6 г	775,1 г
Вторая	768,5 г	399,7 г	363,3 г

Пример 10 - Анализ композиции жирных кислот в дистиллированных маслах

Анализировали композиции жирных кислот дважды дистиллированных продуктов, полученных в примерах 8 и 9. Результаты приведены ниже.

Жирная кислота		Каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%) (пример 8)	Эталонное масло (масс.%) (пример 9)
Пальмитиновая	C16:0	0,7	1,54
Стеариновая	C18:0	1,56	3,30
Олеиновая	C18:1n9c	26,15	22,36
Цис-вакценовая	C18:1n7c	2,52	1,49
Линолевая	C18:2n6c	5,07	8,23
ГЛК	C18:3n6	0,00	0,00
АЛК	C18:3n3	15,04	16,28
Арахидиновая	C20:0	1,44	0,88
СДК	C18:4n3	1,41	0,12
Гондоиновая	C20:1n9c	2,63	1,50
Бегеновая	C22:0	1,16	0,84
ЭТК	C20:4n3	1,75	0,21
Эруковая	C22:1n9c	0,00	0,10
ЭПК	C20:5n3	0,75	3,33
ДПКЗ	C22:5n3	2,81	1,18
ДГК	C22:6n3	30,65	30,53
	Другие	6,36	8,12

Пример 11 - Оценка стабильности масла

Исследование стабильности путем парофазной ГХ-МС

Проводили парофазный анализ обогащенных продуктов, описанных выше, для оценки количества пропаналя, который высвобождался в специфических условиях. Повышенный уровень высвобождения пропаналя свидетельствовал о пониженной стабильности исследуемого материала.

Способ ТФМЭ (твердофазная микроэкстракция):

Отбирали 65 мкм волокно PDMS/DVB StableFlex (набор волокон Supelco 57284-u)

Перед использованием волокна выдерживали в течение 10 минут при 250°C в системе кондиционирования проб Triplus RSH

Образцы инкубировали при 40°C в течение 1 минут перед экстракцией.

Экстрагировали в течение 1 минуты из пробирки для парофазного анализа

Можно ожидать, что указанный способ эффективен для улавливания широкого диапазона летучих компонентов.

Способ ГХ:

Газовый хроматограф Thermo Scientific TRACE 1310 GC

Колонка Thermo Scientific TR-DIOXIN 5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, 30 м пленка 0,1 мкм

Ввод пробы с делением потока 250°C, показатель разделения 83, 1,2 мл He/мин

Изменение температуры ГХ: от 40°C в течение 1 минуты до 100°C со скоростью 5°C/мин, затем до 300°C со скоростью 50°C/мин

Для парофазного анализа применяли универсальные колонки для МС с хорошей синергией. Медленное начальное увеличение температуры применяли для максимизации разделения летучих веществ, после чего увеличивали скорость до максимума для сохранения эффективности колонки. Ввод проб с делением потока применяли для того, чтобы не проводить требуемое в ином случае криогенное охлаждение входного отверстия колонки и увеличить разрешение колонки.

Разделение стандартов являлось неполным из-за частичного наложения пиков, но все равно позволяло проводить количественную оценку. По результатам калибровки по 3 стандартам (0,1, 0,01 и 0,01%) для детектирования пропанала использовали молекулярный ион m/z 56. Базовый пик при m/z 58 использовали для детектирования гексанала.

Способ МС:

ГХ-МС высокого разрешения Thermo Scientific DFS

Низкое разрешение (1000), полное сканирование 35-350 Да, 0,5 сек/скан

Стандарты: - Стандартные растворы пропанала и гексанала разбавляли в поставляемом каноловом масле, содержащем сложные эфиры ДГК. Затем 540 мкл указанных стандартных смесей добавляли в 20 мл пробирки для парофазного анализа.

Применяли режим полного сканирования, что позволяло отслеживать все продукты, а не только специфические молекулы.

Результаты исследования стабильности путем парофазного анализа:

Ниже в таблице приведены результаты для канолового масла после двойной дистилляции, полученного в примере 8, и эталонного масла после двойной дистилляции, полученного в примере 9, в период T от 0 до 4 дней. Исследуемые образцы выдерживали в течение указанного периода при температуре окружающей среды в светонепроницаемом боксе при свечении флуоресцентной трубки. В анализе детектировали молекулярный ион с m/z 58 и на масс-хроматограмме отчетливо наблюдали появление пика пропанала с RT 1,37 мин. Результаты количественной оценки высвобождения пропанала приведены в таблице ниже и данные представлены на фигуре 1. Каноловое масло, содержащее ДГК, высвобождало значительно более низкое количество пропанала, что свидетельствует об улучшенной стабильности канолового масла по сравнению с эталонным маслом.

Время (дни)	0	2	4
Каноловое масло, содержащее ДГК (ppm пропаналя)	32,000	38,000	185,000
Эталонное масло (ppm пропаналя)	83,000	294,000	829,000

Каноловое масло, содержащее ДГК, демонстрирует превосходную устойчивость к окислению по сравнению с эталонным маслом.

Пример 12 - Очистка канолового масла, содержащего ДГК

Часть канолового масла, полученного в примере 1, очищали перед проведением дальнейшего обогащения. Процесс очистки включает дегуммирование, щелочное рафинирование, отбеливание и дезодорирование.

Кислотное дегуммирование

Дегуммирование представляет собой удаление из масла негидратируемых и гидратируемых фосфатидов. Высушенное сырое масло, полученное в примере 1, нагревали до $53 \pm 2^\circ\text{C}$ и добавляли 0,2% 50% раствора лимонной кислоты. Примерно через 30 минут перемешивания добавляли 2,0% нагретой ($53 \pm 2^\circ\text{C}$) умягченной воды и смесь перемешивали примерно 30 минут. Масло нагревали до $67 \pm 3^\circ\text{C}$ в процессе выдерживания, а затем центрифугировали.

Предварительная обработка кислотой/рафинирование

Рафинирование представляет собой удаление свободных жирных кислот путем омыления щелочью для придания им растворимости в воде и последующего удаления путем центрифугирования. Для содействия гидратации фосфатидов применяли стадию предварительной обработки кислотой. Дегуммированное масло нагревали до $65 \pm 5^\circ\text{C}$, добавляли 0,1% 85% фосфорной кислоты и смесь перемешивали в течение 30 минут. После завершения добавления кислоты и выдерживания добавляли гидроксид натрия с плотностью 20 Be' (Боме; 14,4%, масс./масс.) для нейтрализации свободных жирных кислот с избытком 0,05% (масс./масс.). Затем щелочь и масло перемешивали в течение дополнительных 15 минут. Масло нагревали до $62 \pm 2^\circ\text{C}$ в процессе выдерживания в течение 15 минут, а затем центрифугировали.

Предварительная обработка диоксидом кремния марки Trisyl

Предварительную обработку диоксидом кремния марки Trisyl проводили для дополнительного удаления мыл до уровней, подходящих для отбеливания. Предварительную обработку с применением Trisyl объединяли со стадией отбеливания. Рафинированное масло нагревали до $68 \pm 5^\circ\text{C}$ и обрабатывали 0,3% раствором Trisyl 300. Смесь масло/Trisyl перемешивали в течение примерно 15 минут, а затем продолжали отбеливание.

Отбеливание

Рафинированное масло обрабатывали адсорбирующей глиной для удаления пероксидов, фосфатидов, окрашивающих веществ и следовых количеств мыла. Для содействия гидратации фосфатидов применяли стадию предварительной обработки кислотой. Масло, предварительно обработанное Trisyl, перемешивали с 0,2% (масс./масс.) 50% раствора лимонной кислоты. После 15 минут перемешивания добавляли 2% (масс./масс.) отбеливающей глины Tonsil Supreme 126 FF. Затем смесь нагревали до $90 \pm 2^\circ\text{C}$ в вакууме и выдерживали примерно 30 минут. Масло охлаждали до $60 \pm 2^\circ\text{C}$, вакуум заменяли атмосферой азота, добавляли 1,0 кг вспомогательной фильтрующей добавки и смесь фильтровали. Сосуд, стойкий к давлению: 500 л сосуд Cherry-Burrell, стойкий к давлению, паровая или охлаждающая водяная рубашка, конструкция полностью выполнена из нержавеющей стали 316 и оборудована лопастью и барьерами для перемешивания, производственный серийный номер #E-227-94. Фильтр-пресс: 24" полипропиленовый фильтр-пресс Speggy, емкость фильтра 4,8 куб.фута (136 л), использовали бумажные и тканевые подложки.

Дезодорирование

Отбеленное масло подвергали продуванию паром при высокой температуре и низком давлении для удаления пахучих компонентов, вкусоароматических компонентов и дополнительных свободных жирных кислот. Также снижали интенсивность цвета путем отбеливания при повышенных температурах. Половину отбеленного масла дезодорировали при $180 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 60 минут с применением 1% барботажного пара, и отслеживали композицию жирных кислот (FAC). Сосуд дезодоратора (OD4): 400 л сосуд Coppersmithing, стойкий к вакууму, паровая или охлаждающая водяная рубашка, конструкция полностью выполнена из нержавеющей стали 316. Наблюдали незначительное снижение уровня ДГК при 180°C при выдерживании в течение 60 минут. Затем проводили другое испытание при 180°C со временем выдерживания 30 минут. Продукт упаковывали в атмосфере азота в 20 л пластиковые канистры ПЭВП и хранили в охлаждающей камере при 4°C .

Пример 13 - Очистка исходной эталонной масляной смеси

Часть эталонной смеси, описанной в примере 2, очищали перед проведением дальнейшего обогащения. В процессе очистки эталонную смесь подвергали очистке в условиях, аналогичных описанным в предыдущем примере.

Пример 14 - Композиции жирных кислот РОД канолового масла, содержащего ДГК, и РОД эталонной смеси

Проводили анализ композиций жирных кислот РОД канолового масла,

содержащего ДГК (из примера 12), и РОД эталонной масляной смеси (из примера 13). Результаты приведены ниже.

Жирная кислота		РОД каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%)	РОД эталонное масло (масс.%)
Пальмитиновая	C16:0	4,23	9,22
Стеариновая	C18:0	2,52	3,89
Олеиновая	C18:1n9c	42,90	31,62
Цис-вакценовая	C18:1n7c	3,01	1,96
Линолевая	C18:2n6c	7,15	12,18
ГЛК	C18:3n6	0,54	0,00
АЛК	C18:3n3	19,95	22,51
Арахидиновая	C20:0	0,72	0,38
СДК	C18:4n3	2,25	0,17
Гондоиновая	C20:1n9c	1,28	0,71
Бегеновая	C22:0	0,31	0,22
ЭТК	C20:4n3	1,08	0,00
Эруковая	C22:1n9c	0,00	0,00
ЭПК	C20:5n3	0,47	1,67
ДПКЗ	C22:5n3	0,96	0,41
ДГК	C22:6n3	9,33	9,20
	Другие	3,32	5,86

Описание "РОД" в примерах (и на прилагаемых фигурах) означает, что указанный продукт получали напрямую или косвенно из "очищенных" продуктов из примера 12 (в случае канолового масла) и примера 13 (в случае эталонных смесей).

Пример 15 - Химическая переэтерификация РОД канолового масла, содержащего ДГК

В сухой, продуваемый азотом химический реактор Buchi CR101, снабженный механической мешалкой, добавляли абсолютный этанол (12,5 л) и очищенное ("РОД") триглицеридное каноловое масло, содержащее ДГК, полученное в примере 12 (5,00 кг), и смесь перемешивали.

К вышеуказанной смеси добавляли этоксид натрия (150 г), который промывали в реакторе дополнительным количеством абсолютного этанола (2,5 л), и перемешивание продолжали в течение 16 часов при температуре окружающей среды. ¹H-ЯМР спектр, записанный на образце, взятом из смеси, показал, что реакция завершена.

Процедуру переэтерификации проводили на примерно 5 кг РОД канолового масла, содержащего ДГК. К полученной сырой реакционной смеси добавляли петролейный эфир с температурой кипения 40-60°C (ПЭ, 10 л) и воду (10 л) и смесь при тщательном перемешивании осторожно подкисляли до pH 7 с применением 10% хлористоводородной кислоты (потребовалось 870 мл, индикаторные полоски Merck Universal, pH 0-14).

Полученную смесь оставляли в реакторе, после чего образовывались 2 фазы. ПЭ слой удаляли и водный слой дополнительно экстрагировали ПЭ (3х 5 л). Объединенные ПЭ слои возвращали в реактор и выпаривали в вакууме до небольшого объема (примерно 10 л). Полученный концентрированный раствор выводили из реактора, сушили над безводным сульфатом магния (примерно 1 кг), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением бледно-желтого масла (выход: 99%).

Пример 16 - Химическая переэтерификация РОД эталонной масляной смеси

В сухой, продуваемый азотом химический реактор Buchi CR101, снабженный механической мешалкой, добавляли абсолютный этанол (12,5 л) и РОД триглицеридную эталонную масляную смесь, полученную в соответствии с примером 13 (примерно 5 кг), и смесь перемешивали.

К вышеуказанной смеси добавляли этоксид натрия (150 г), который промывали в реакторе дополнительным количеством абсолютного этанола (2,5 л), и перемешивание продолжали в течение 16 часов при температуре окружающей среды. ^1H -ЯМР спектр, записанный на образце, указывал на малую степень протекания реакции или ее отсутствие. К смеси добавляли дополнительное количество этоксида натрия (57 г) и продолжали перемешивание.

После 5 дополнительных часов ^1H -ЯМР спектр, записанный на образце, указывал на протекание реакции на 75%. К смеси добавляли дополнительное количество этоксида натрия (60 мл 21% раствора в этаноле) и перемешивание продолжали в течение 3 дней, после чего реакция протекала полностью.

Выделение предложенного продукта из РОД эталонной смеси после химической переэтерификации

Процедуру переэтерификации проводили на примерно 5 кг РОД эталонной масляной смеси. К полученной сырой реакционной смеси добавляли ПЭ (15 л) и воду (3,3 л) и смесь при тщательном перемешивании осторожно подкисляли до рН 7 с применением 10% хлористоводородной кислоты (потребовалось 910 мл).

Полученную смесь оставляли в реакторе, после чего образовывались 2 фазы. ПЭ слой удаляли и водный слой дополнительно экстрагировали ПЭ (2х 7,5 л). Объединенные ПЭ слои возвращали в реактор и выпаривали в вакууме до небольшого объема (примерно 10 л). Полученный концентрированный раствор выводили из реактора, сушили над безводным сульфатом магния (примерно 1 кг), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением бледно-желтого масла (выход: 99%).

Пример 17 - Дистилляция переэтерифицированных РОД каноловых масел

Стандартная процедура удаления более летучих компонентов смесей этиловых

эфиров жирных кислот (FAEE) путем вакуумной дистилляции

Проводили дистилляцию этиловых эфиров жирных кислот (FAEE) из РОД канолового масла, содержащего ДГК (полученного в примере 15), в следующих условиях. Разделение методом дистилляции проводили путем пропускания переэтерифицированного масла через 2-дюймовый (50 мм) пленочный испаритель Pore, в котором поддерживали вакуум, оборудованный 2 x 1000 мл колбами-приемниками, в которые собирали дистиллят и остаток. Проводили анализ композиции жирных кислот в каждой из колб.

Вакуум обеспечивали роторным насосом Edwards 3, уровень вакуума измеряли вакуумметром Ebro VM2000.

Масло подавали в испаритель при помощи шлангового насоса Cole-Palmer Instrument Company Easy-load II с расходом 4 мл/мин, при этом двигатель испарителя устанавливали на 325 об/мин и для конденсации дистиллята применяли обратный холодильник с водным охлаждением. Поток подавали до тех пор, пока не заполнялась первая или вторая колба-приемник.

FAEE из РОД канолового масла, содержащего ДГК, подвергали дистилляции в указанных условиях, при этом нагревательные дуги изначально устанавливали на 152°C для получения 50:50 разделения дистиллят:остаток. Из части остатка, полученного при проведении указанной дистилляции, дополнительно удаляли более летучие компоненты путем дистилляции в стандартных условиях, где температуру нагревательных дуг устанавливали на 152°C. Общее время дистилляции составляло примерно 90 минут.

Дистилляция	Сырье	Дистиллят	Остаток
Первая	1596,6	729,9	855,9
Вторая	851,3	503,5	343,1

Пример 18 - Дистилляция FAEE, полученных из переэтерифицированной РОД эталонной смеси

Проводили дистилляцию этиловых эфиров жирных кислот (FAEE) из РОД эталонной смеси (полученной в примере 16) в условиях, аналогичных описанным в предыдущем примере.

FAEE из РОД эталонной смеси подвергали дистилляции в указанных стандартных условиях, при этом нагревательные дуги изначально устанавливали на 152°C для получения 50:50 разделения дистиллят:остаток. Из остатка, полученного при проведении указанной дистилляции, дополнительно удаляли более летучие компоненты путем дистилляции в стандартных условиях. Задачей являлось получение 50:50 разделения дистиллят:остаток. Дистилляцию в основном проводили при температуре нагревательных дуг 152°C. Общее время дистилляции составляло примерно 200 минут.

Дистилляция	Сырье	Дистиллят	Остаток
Первая	1195,1	674,7	504,6
Вторая	496,4	297,2	197,4

Пример 19 - Анализ композиции жирных кислот в обогащенных РОД маслах

Анализировали композиции жирных кислот продуктов, полученных в примерах 17 и 18. Результаты приведены ниже.

Жирная кислота		Каноловое масло, содержащее ДГК (масс.%) (пример 17)	Эталонное масло (масс.%) (пример 18)
Пальмитиновая	C16:0	0,78	2,27
Стеариновая	C18:0	2,09	3,29
Олеиновая	C18:1n9c	29,57	23,52
Цис-вакценовая	C18:1n7c	2,14	1,50
Линолевая	C18:2n6c	4,90	8,80
ГЛК	C18:3n6	0,36	0,00
АЛК	C18:3n3	14,34	16,87
Арахиновая	C20:0	1,56	0,83
СДК	C18:4n3	1,44	0,00
Гондоиновая	C20:1n9c	2,48	1,40
Бегеновая	C22:0	1,12	0,85
ЭТК	C20:4n3	1,93	0,15
Эруковая	C22:1n9c	0,00	0,13
ЭПК	C20:5n3	0,76	2,75
ДПКЗ	C22:5n3	3,02	1,06
ДГК	C22:6n3	27,93	28,18
	Другие	5,58	8,40

Пример 20 - Оценка стабильности масла

Парофазный анализ проводили на обогащенных продуктах, описанных в примерах 17 и 18, в соответствии со способом, описанным в примере 11.

Ниже в таблице приведены результаты для РОД канолового масла, полученного в примере 17, и РОД эталонного масла, полученного в примере 18, в период Т от 0 до 3 дней. Исследуемые образцы выдерживали в течение указанного периода при температуре окружающей среды в светонепроницаемом боксе при свечении флуоресцентной трубки. В анализе детектировали молекулярный ион с m/z 58 и на масс-хроматограмме отчетливо наблюдали появление пика пропаналя с RT 1,37 мин. Результаты количественной оценки высвобождения пропаналя приведены в таблице ниже и данные представлены на фигуре 2. Каноловое масло, содержащее ДГК, высвобождало значительно более низкое количество пропаналя, что свидетельствует об улучшенной стабильности канолового масла по сравнению с эталонным маслом.

Время (дни)	0	3
Каноловое масло, содержащее ДГК (ppm пропаналя)	17,000	73,000
Эталонное масло (ppm пропаналя)	31,000	267,000

Каноловое масло, содержащее ДГК, демонстрирует превосходную устойчивость к окислению по сравнению с эталонным маслом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная композиция на растительной основе, содержащая:

- докозагексаеновую кислоту (22:6n-3) в количестве от примерно 15 масс.% до примерно 35 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

- эйкозапентаеновую кислоту (20:5n-3) в количестве до примерно 5 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

- α -линоленовую кислоту (18:3n-3) в количестве от примерно 10 масс.% до примерно 20 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

- олеиновую кислоту (18:1n-9) в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 40 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции; и

- пальмитиновую кислоту в количестве до примерно 1,5 масс.% от общего содержания жирных кислот в композиции;

где каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде жирной кислоты, соли жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты или соли сложного эфира жирной кислоты.

2. Липидная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что докозагексаеновая кислота (22:6n-3) присутствует в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% (в частности, от примерно 22 масс.% до примерно 33 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

3. Липидная композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что эйкозапентаеновая кислота присутствует в количестве до примерно 3 масс.% (в частности, до примерно 1 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

4. Липидная композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что α -линоленовая кислота присутствует в количестве от примерно 12 масс.% до примерно 20 масс.% (в частности, от примерно 12 масс.% до примерно 18 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

5. Липидная композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что олеиновая кислота присутствует в количестве от примерно 20 масс.% до примерно 35 масс.% (в частности, от примерно 22 масс.% до примерно 33 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

6. Липидная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что пальмитиновая кислота (16:0) присутствует в количестве до примерно 1,0 масс.% (в частности, до примерно 0,7 масс.%) от общего содержания жирных кислот в композиции.

7. Липидная композиция по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде сложного эфира жирной кислоты или

соли сложного эфира жирной кислоты.

8. Липидная композиция по п. 7, отличающаяся тем, что каждый из компонентов (i) - (v) независимо представлен в виде этилового эфира жирной кислоты или как часть триглицерида.

9. Липидная композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что липидную композицию получают из одного источника.

10. Липидная композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что липидную композицию получают из растения.

11. Липидная композиция по п. 10, отличающаяся тем, что растение, представляет собой масличную культуру, в частности, *Brassica* sp., *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus* sp., *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium* sp., *Elaeis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*.

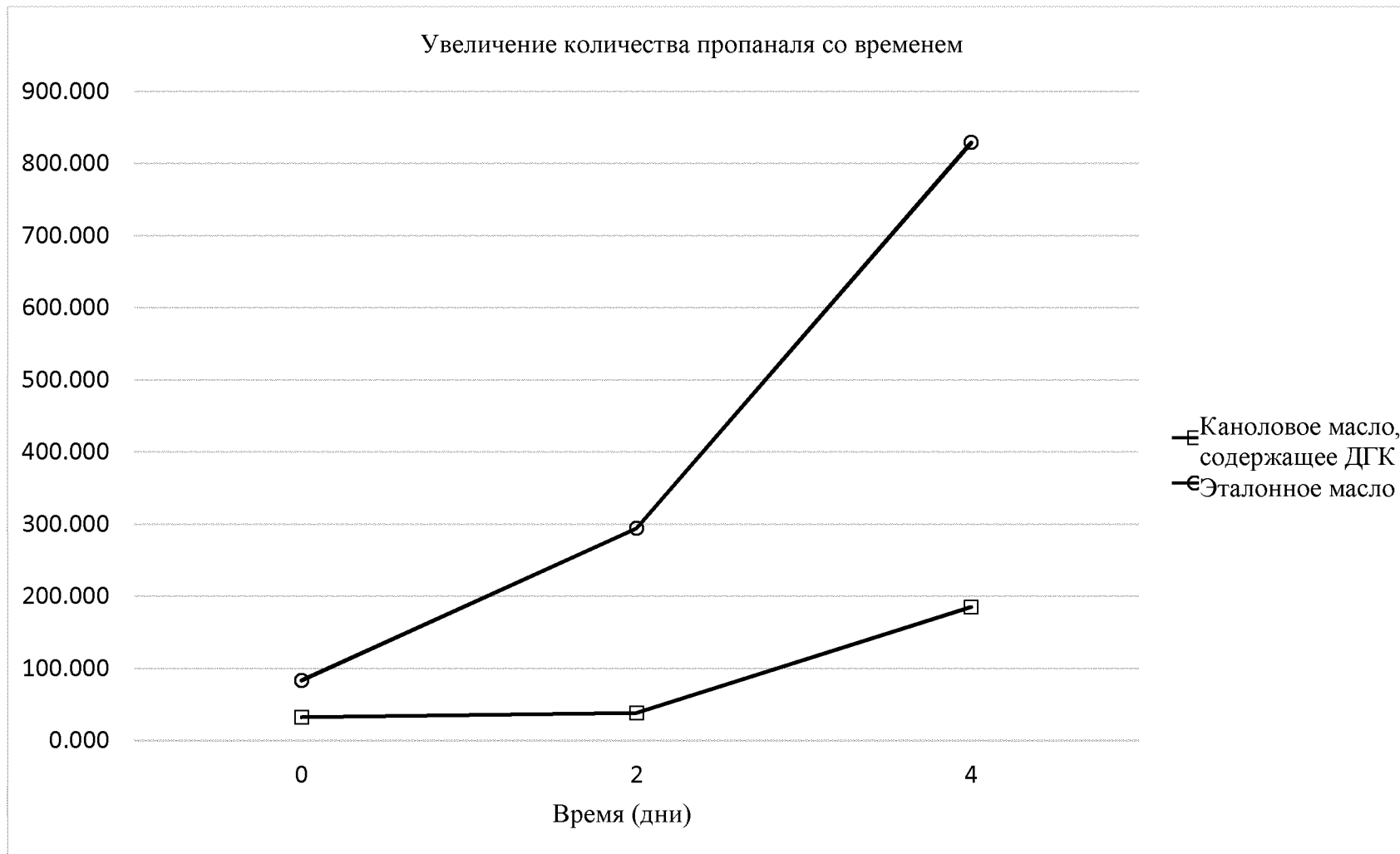
12. Липидная композиция по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что композицию представляют в форме таблетки, капсулы, инкапсулированного геля, жидкости или порошка для приема внутрь или мази или крема для местного нанесения.

13. Липидная композиция по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащая один или более дополнительные компоненты, выбранные из группы, состоящей из антиоксиданта, стабилизатора и поверхностно-активного вещества.

14. Липидная композиция по любому из пп. 1-13 для применения для лечения или предотвращения сердечно-сосудистых заболеваний, увеличения выживаемости у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, снижения общего уровня холестерина в сыворотке, снижения высокого уровня АД, увеличения отношения ЛПВП:ЛПНП, снижения уровней триглицеридов или снижения уровней аполипопротеина В.

15. Способ получения липидной композиции по любому из пп. 1-11, который включает получение смеси этиловых эфиров жирных кислот; подвергание указанной смеси первой стадии молекулярной дистилляции для получения первого остатка; и подвергание первого остатка второй стадии молекулярной дистилляции.

Фигура 1



Фигура 2

