

DFG Senatskommission
zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln

SKLM



**Phytosterol-Oxidationsprodukte in Lebensmitteln:
Analytik, Vorkommen, Exposition und biologische
Effekte**

Angenommen am: 29./30. April 2015

Englische Version verabschiedet am: 05. Dezember 2014

Mitglieder und Gäste der DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln 2014-2016

Mitglieder:

Pablo Steinberg (Vorsitzender), Patrick Diel, Gerhard Eisenbrand, Karl-Heinz Engel, Bernd Epe, Volker Heinz, Hans-Ulrich Humpf, Hans-Georg Joost, Dietrich Knorr, Theo de Kok, Doris Marko, Ivonne Rietjens, Rudi Vogel

Ständige Gäste:

Peter Fürst, Sabine Kulling, Alfonso Lampen, Gerhard Rechkemmer, Richard H. Stadler, Stefan Vieths

Die Kommission dankt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Lebensmittelinhaltsstoffe“:

Pablo Steinberg (Leiter der Arbeitsgruppe), Matthias Baum, Hubertus E. Brunn, Patrick Diel, Gerhard Eisenbrand, Karl-Heinz Engel, Barbara Engeli, Hans-Ulrich Humpf, Dirk Lachenmeier, Alfonso Lampen, Angela Mally, Doris Marko und Peter Winterhalter sowie Birgit Scholz (TU München) für die Erarbeitung der Stellungnahme und Sabine Guth, Angelika Roth und Stephanie Vogel vom Sekretariat der SKLM für ihre Unterstützung.

SKLM Kommission Sekretariat

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

E-Mail: SKLM@tiho-hannover.de • Tel.: +49 511 8567227 • Fax: +49 511 856 82 7227

Phytosterole/-stanole und ihre Fettsäureester sind in der Lage, den Serumcholesterinspiegel zu senken, und werden deshalb einer zunehmenden Zahl an Produkten zugesetzt, die mit Angaben zu cholesterinsenkenden Wirkungen versehen werden. Eine in diesen Produkten zu erwartende, unerwünschte Reaktion ist die Bildung sogenannter Phytosterol-Oxidationsprodukte, d.h. Keto-, Hydroxy- und Epoxyderivate von Phytosterolen/-stanolen. Die Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) hat den gegenwärtigen Kenntnisstand zur Bildung, zur Aufnahme und zu biologischen Effekten von Phytosterol-Oxidationsprodukten zusammengefasst und bewertet. Wissenslücken sowie Forschungsbedarf für eine Sicherheitsbewertung wurden identifiziert, insbesondere im Licht der potentiell zunehmenden Exposition gegenüber solchen Verbindungen über den Verzehr angereicherter Lebensmittel. Die nachfolgende Stellungnahme wurde in der englischen Version am 05. Dezember 2014 und in der deutschen Version am 29./30. April 2015 angenommen.

Phytosterol-Oxidationsprodukte in Lebensmitteln: Analytik, Vorkommen, Exposition und biologische Effekte

1 Einleitung

Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Eine tägliche Aufnahme von 2 g Phytosterolen/-stanolen über die Nahrung resultiert in einer Senkung des LDL- und Gesamtplasmacholesterinspiegels von ca. 10%.¹⁻³ Aufgrund dieser cholesterinsenkenden Eigenschaften gehörten Phytosterole/-stanole und ihre Fettsäureester zu den ersten Inhaltsstoffen, mit denen Lebensmittel zur Erzielung eines zusätzlichen gesundheitsfördernden Effekts angereichert wurden. Auf der Grundlage einer Sicherheitsbewertung durch den Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss (SCF) der Europäischen Union im Jahre 2000 wurde ein mit spezifischen Mengen an Phytosterylfettsäureestern angereichertes gelbes Streichfett von der EU Kommission als erstes neuartiges Lebensmittel nach der Verordnung (EC) Nr. 258/97 zugelassen.^{4,5,6} Mittlerweile ist ein breites Spektrum weiterer Lebensmittel, denen Phytosteryl/-stanyl-fettsäureester zugesetzt wurden, in der Europäischen Union in Verkehr gebracht worden. Diese umfassen milchartige und joghurtartige Erzeugnisse, Fruchtgetränke auf Milchbasis, Sojagetränke, käseartige Erzeugnisse, Salatsoßen, Gewürzsoßen, Roggenbrot, Reisgetränke und Öle;⁷ regelmäßig aktualisierte Zusammenstellungen der entsprechenden Zulassungen und

Notifizierungen sind verfügbar.^{8,9} Phytosterole/-stanole und ihre Fettsäureester gehören zu den Lebensmittelzutaten, für die gesundheitsbezogene Angaben über die Reduzierung eines Krankheitsrisikos zugelassen wurden.^{10,11}

Es gibt keine Belege für zusätzliche cholesterinsenkende Eigenschaften von Phytosterolen bei Aufnahmemengen, die höher sind als 3 g/Tag.³ Darüber hinaus können hohe Aufnahmemengen zu unerwünschten Effekten, wie einer Senkung des β -Carotin-Plasmaspiegels, führen.^{1,12,13} Deshalb empfahl der SCF in seiner grundsätzlichen Stellungnahme zu Langzeiteffekten bei Aufnahme erhöhter Mengen an Phytosterolen über mehrere Lebensmittel, die Aufnahme von Mengen, die den Bereich von 1-3 g/Tag überschreiten, zu vermeiden.¹⁴ Diese vorsorgliche Beschränkung steht im Einklang mit dem Gruppen-ADI von 0-40 mg/kg Körpergewicht für die Gruppe der Phytosterole, Phytostanole und ihrer Ester, ausgedrückt als Summe freier Phytosterole und Phytostanole, der später vom Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) abgeleitet wurde.¹⁵

Die Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) der DFG hat bereits zwei wissenschaftliche Stellungnahmen zum Einsatz von Phytosteryl/-stanylfettsäureestern in Lebensmitteln veröffentlicht.^{16,17} Ihre Schwerpunkte lagen auf der notwendigen Bewertung individueller Zubereitungen von Phytosteryl/-stanylestern und der Bedeutung der entsprechenden Spezifikationen. Darüber hinaus machte sie insbesondere auf die Herausforderungen aufmerksam, die sich aus dem breiten Spektrum angereicherter Lebensmittel und den Unsicherheiten bei der Sicherstellung, die Aufnahme von 1-3 g/Tag nicht zu überschreiten, ergeben. Die Notwendigkeit der Erhebung von aktuellen und vertrauenswürdigen Verzehrdaten sowie von Maßnahmen, die sicherstellen, dass die Produkte nur von den Zielgruppen verzehrt werden, wurde betont.

Um Verbrauchern zu ermöglichen, ihren Verzehr an Phytosterolen/-stanolen auf ein Maximum von 3 g/Tag zu begrenzen und sicherzustellen, dass das Erzeugnis seine Zielgruppe erreicht, wurden spezifische Regelungen hinsichtlich der Kennzeichnung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten mit zugesetzten Phytosterolen/-stanolen und deren Estern festgelegt. Beispielsweise ist auf der Etikettierung ein Hinweis erforderlich, dass eine Aufnahme von mehr als 3 g/Tag an zugesetzten

Pflanzensterolen/-stanolen vermieden werden sollte.¹⁸ In diesem Zusammenhang zeigte eine in Deutschland durchgeführte Studie zur Wahrnehmung der Verbraucher, dass 45% der Konsumenten nicht zur Zielgruppe gehörten, dass sich nur 1% bewusst waren, dass die Aufnahme von 3 g Phytosterolen/Tag nicht überschritten werden sollte, und dass 3,5% der Konsumenten Kinder waren.¹⁹ Die Daten zur tatsächlichen Exposition von Verbrauchern gegenüber Phytosterolen über mehrere Quellen angereicherter Lebensmittel sind ebenfalls nicht einheitlich. In einem nach der Markteinführung durchgeführten Monitoring (post-launch monitoring, PLM) wurden die Käufe von Lebensmitteln mit zugesetzten Phytosterolen (Streichfette, Salatsoßen, milch- und joghurtartige Erzeugnisse) in fünf europäischen Ländern verfolgt; die durchschnittlichen Phytosterolverzehrmengen pro Haushalt beliefen sich auf 0,35-0,86 g/Tag. In den 95. Perzentilen der Bevölkerung schwankten die Aufnahmen zwischen 1,0 g/Tag in Frankreich und bis zu 3,7 g/Tag in den Niederlanden; die Niederlande waren das einzige Land, in dem ungefähr 6% der Haushalte als Haushalte mit potentiell "Über-Konsum" identifiziert wurden.²⁰ Diese Daten deuten darauf hin, dass ein übermäßiger Verzehr an Phytosterolen unwahrscheinlich ist. Sie stehen im Einklang mit den Ergebnissen des von Unilever pflichtgemäß durchgeführten PLM, welches das erste Jahr des Inverkehrbringens angereicherter pflanzlicher Streichfette abdeckte. Nach dieser Übersicht lagen die Mediane der Aufnahmen von Phytosterolen durch Normalverbraucher bei 1,2-1,4 g/Tag, innerhalb der 95. Perzentile reichten die Aufnahmen von 2,2 g/Tag in Frankreich bis zu 3,6 g/Tag in den Niederlanden.²¹ Andererseits wurde in einer auf dem irischen Markt durchgeführten Studie eine deutlich höhere, durchschnittliche Aufnahme an Phytosterolen (2,45 g/Tag) genannt. Insgesamt konnten für 23% der Auskunftgebenden durchschnittliche Aufnahmemengen an Phytosterolen errechnet werden, die höher als 3 g/Tag waren. Die Mehrzahl der Verbraucher (58%) hatte diese Produkte länger als ein Jahr verzehrt.²² Eine Studie von Sioen *et al.* (2011),²³ in welcher der Verzehr mit Phytosterolen angereicherter Lebensmittel in Belgien untersucht wurde, zeigte auch für 16% der Verbraucher Phytosterol-Aufnahmen, die höher als 3 g/Tag waren.

Ein weiteres kontrovers diskutiertes Thema ist die erhöhte Absorption von Phytosterolen, die potentiell zu deren Akkumulation und nachfolgend zu einem erhöhten Risiko für Gefäßerkrankungen führt.²⁴ Dies lassen folgende Ergebnisse

vermuten: (i) das Vorkommen pflanzlicher Sterole in atherosklerotischen Plaques von Patienten, bei denen eine Endarterektomie der Carotis durchgeführt worden war,²⁵ (ii) die Akkumulation pflanzlicher Sterole in humanen stenotischen Aortenklappen^{26,27} und (iii) die Auswirkungen des Verzehrs pflanzlicher Sterole und Stanole über einen langen Zeitraum auf die Retinalvaskulatur.²⁸ Die potentielle Akkumulation von Phytosterolen in der Arterienwand auf der einen Seite und die Plasmacholesterinsenkenenden Eigenschaften mit der Nahrung aufgenommener Phytosterol/-stanole und damit ihr Nutzen zur Vorbeugung von Herz-Kreislaufkrankungen auf der anderen Seite werden derzeit intensiv diskutiert.²⁹⁻³² Eine neuere Studie zeigte, dass in *Apc*^{Min} (*Adenomatous polyposis coli*) Mäusen, die eine mit pflanzlichen Stanolen angereicherte Diät erhielten, die Bildung intestinaler Adenome induziert wurde.³³

Phytosterole/-stanole sind strukturell Cholesterin sehr ähnlich. Diese Ähnlichkeit ist die molekulare Grundlage für die cholesterinsenkenenden Eigenschaften dieser Substanzen; jedoch sind die für Cholesterin bekannten unerwünschten Reaktionen auch im Fall der Phytosterole zu erwarten. Ein typisches Beispiel ist die Bildung sogenannter Cholesterin-Oxidationsprodukte, d.h. Keto-, Hydroxy- und Epoxy-Derivate von Cholesterin, eine bekannte Stoffklasse, die über viele Jahre detailliert untersucht worden ist. Auf der einen Seite sind Cholesterin-Oxidationsprodukte entscheidende Zwischenstufen im Stoffwechsel von Säugern, die enzymatisch *in vivo* synthetisiert werden und die mehrere physiologische Prozesse, wie z.B. die Cholesterin-Homöostase, regulieren.^{34,35} Auf der anderen Seite können sie endogen über nicht-enzymatische Oxidation von Cholesterin gebildet und auch über die Nahrung aufgenommen werden. In Lebensmitteln, die Cholesterin enthalten, können Cholesterin-Oxidationsprodukte im Zuge der Verarbeitung und Lagerung gebildet werden.³⁵ Erhöhte Mengen an Cholesterin-Oxidationsprodukten im Plasma sind insbesondere mit atherogenen Effekten korreliert worden, und man geht davon aus, dass sie auch an anderen entzündlichen Prozessen, wie der Neurodegeneration, beteiligt sind.³⁶ Deshalb standen in letzter Zeit das Vorkommen in Lebensmitteln und die dadurch bedingte Aufnahme über die Nahrung nicht nur von intaktem Cholesterin sondern auch von Cholesterin-Oxidationsprodukten im Fokus mehrerer Forschungsaktivitäten. Es wurde in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass eine erhöhte Aufnahme von Cholesterin-Oxidationsprodukten über die Nahrung mit

Beeinträchtigungen von Leberfunktion und Fettstoffwechsel und letztendlich mit einer fortschreitenden Atherosklerose einhergeht.³⁷⁻⁴⁵

In Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Cholesterin- und Phytosterol-Oxidationsprodukten und unter Berücksichtigung der steigenden Zahl und des breiten Spektrums an mit Phytosteryl/-stanylfettsäureestern angereicherten Produkten erscheinen Studien zur Bildung und zur Aufnahme von Phytosterol-Oxidationsprodukten und die Bewertung ihrer potentiell adversen Effekte angebracht. Ein derzeitiger Antrag, den Einsatz von Phytosterylestern auf Margarinen und flüssige Pflanzenfett-basierte Emulsionen auszuweiten, die speziell zum Kochen und Braten vorgesehen sind, unterstreicht die Relevanz einer solchen Bewertung.⁴⁶

Im letzten Jahrzehnt haben die Forschungsaktivitäten zu Phytosterol-Oxidationsprodukten deutlich zugenommen; die Fortschritte sind in einer Reihe von Übersichtsartikeln beschrieben.^{36,47-52} Ziel dieser Stellungnahme ist es, den gegenwärtigen Wissensstand zusammenzufassen und ihn insbesondere vor dem Hintergrund der potentiell ansteigenden ernährungsbedingten Exposition gegenüber Phytosterol-Oxidationsprodukten aufgrund des Verzehrs von Phytosteryl/-stanylesterangereicherten Lebensmitteln zu bewerten. Darüber hinaus soll der für eine Sicherheitsbewertung notwendige Forschungsbedarf aufgezeigt werden.

2 Analytische Ansätze

Die Thermooxidation von Phytosterolen in Lebensmitteln umfasst eine Reihe von Reaktionen, die zur Bildung primärer (Hydroperoxide), sekundärer (polare: Ketone, Alkohole, Epoxide; unpolare: Steradiene, Steratriene) und tertiärer Oxidationsprodukte (Dimere, Oligomere, Polymere) führen. Aufgrund der technisch möglichen Analyseverfahren lag der Forschungsschwerpunkt bisher fast ausschließlich auf den sekundären polaren Phytosterol-Oxidationsprodukten. Daher bezieht sich der in dieser Stellungnahme verwendete Begriff "Phytosterol Oxidationsprodukte" auf die von den entsprechenden Sterolen/Stanolen abgeleiteten Keto-, Epoxy- und Hydroxyverbindungen. Strukturen von Phytosterol-Oxidationsprodukten, die aus β -Sitosterol entstehen, sind in Abbildung 1 exemplarisch gezeigt.

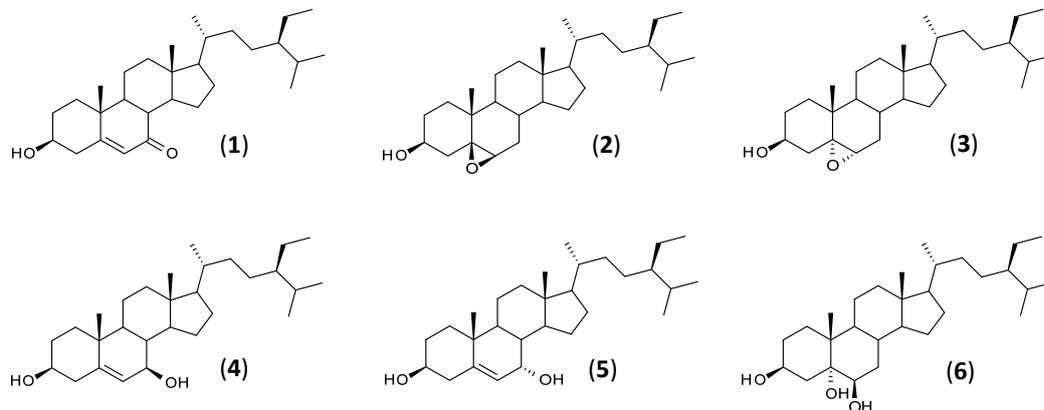


Abbildung 1. Von β -Sitosterol abgeleitete Phytosterol-Oxidationsprodukte:
 7-Ketosterosterol (1), 5,6 β -Epoxysterosterol (2), 5,6 α -Epoxysterosterol (3), 7 β -Hydroxysterosterol (4), 7 α -Hydroxysterosterol (5), Sitostantriol (6)

Es existieren verschiedene analytische Ansätze, basierend auf (i) der Extraktion der Lipide und deren Verseifung oder Umesterung, (ii) der Isolierung und Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie oder Festphasenextraktion, (iii) der Derivatisierung zu Trimethylsilylthern und (iv) der Detektion mittels HPLC- und GC-basierter Techniken.^{53,54}

Mit Hilfe dieser Methoden wurde für Modellsysteme anhand der thermischen Behandlung von Phytosterol-Standards ein breites Spektrum analytischer Daten erarbeitet.⁵⁵⁻⁵⁷ Unter verschiedenen Zeit-/Temperatur-Bedingungen durchgeführte Thermooxidationen zeigten, dass einige der sekundären Phytosterol-Oxidationsprodukte Intermediate darstellen, die im Verlauf der Reaktion weiter transformiert oder abgebaut werden.⁵⁸ Erste Versuche wurden beschrieben, mittels Größenausschlusschromatographie Fraktionen, die Dimere, Trimere und Tetramere enthalten, zu isolieren. Für Sterol-Dimere wurden entsprechende Strukturen vorgeschlagen.⁵⁹⁻⁶³

Das Erhitzen von Stigmasterol für 3h bei 180°C führte zu einem Verlust des intakten Sterols von 61%. Polare, mittel-polare und nicht-polare Oxidationsprodukte machten 39%, die Bildung von Dimeren und Polymeren 30% dieses Verlustes aus. Dies

bedeutet eine Lücke in der Massenbilanz, die 31% des Verlusts an Stigmasterol unerklärt lässt.⁶⁴

Es gibt Hinweise auf qualitative und quantitative Unterschiede in den Oxidationsprofilen freier und veresterter Phytosterole.⁶⁵⁻⁷⁰ Da Oxidationen sowohl in den Sterol- als auch in den Fettsäureresten der Phytosterylester ungesättigter Fettsäuren möglich sind, sind komplexe Mischungen zu erwarten.⁷¹ In einer kürzlich erschienenen Studie wurden erste Ansätze zur Analytik intakter oxidierter Phytosteryl Fettsäureester mittels HPLC-ESI-MS beschrieben.⁷²

3 Vorkommen in Lebensmitteln

Nicht angereicherte Lebensmittel

Zu einer Vielzahl von Lebensmitteln, die Phytosterole/-stanole oder ihre Ester als natürlich vorkommende Inhaltsstoffe enthalten, liegen Daten zu Phytosterol-Oxidationsprodukten vor. Das Vorkommen von Phytosterol-Oxidationsprodukten in pflanzlichen Rohölen und ihr Schicksal während der Raffination ist untersucht worden.⁷³ Die Auswirkungen des Erhitzens pflanzlicher Öle auf die Bildung von Phytosterol-Oxidationsprodukten sind sowohl in Modellversuchen^{55,74} als auch unter Bedingungen des industriellen Frittierens untersucht wurden.⁷⁵ Sowohl im Handel erhältliche Kartoffelchips⁷⁶ als auch Kartoffelchips⁷⁷ und Pommes frites,⁷⁵ die in unterschiedlichen pflanzlichen Ölen zubereitet wurden, sind analysiert worden. Die Oxidation von Sterolen in Säuglingsmilchnahrung, Milchbrei⁷⁸ und in verzehrfertiger Säuglingsnahrung im Zuge der Lagerung⁷⁹ ist ebenfalls untersucht worden. In Tabelle 1 sind beispielhaft Daten zu Streichfetten,⁸⁰ Pommes frites⁷⁵ und Kartoffelchips⁷⁶ zusammengefasst. Der durchschnittliche Gehalt an Phytosterol-Oxidationsprodukten in hitzebehandelten Pommes frites und Kartoffelchips betrug 1 mg/kg (außer für Pommes frites-Proben, die in Restaurants zubereitet wurden). Dieser Gehalt entspricht einer Oxidationsrate von ungefähr 0,8%.

Tabelle 1. In ausgewählten, nicht angereicherten Lebensmitteln ermittelte Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten (POP) und die daraus resultierenden, auf der Basis der Verzehrdaten für die entsprechenden Lebensmittel berechneten Aufnahmemengen

Lebensmitteltyp	POP [mg/kg]	Oxidations- rate [%] ^a	POP Aufnahme [mg/Tag] ^b		Ref.
			Median	95. Perz.	
Streichfett 63% Fett	13,3	0,41	0,14 ^c	0,65 ^c	(80)
Pommes frites Ofen, 225 °C, 15 min	1,2	0,5	0,08	0,19	(75)
Vorfrittierte Proben	0,8	1,3	0,06	0,12	(75)
Restaurant-Proben	3,4	0,8	0,23	0,53	(75)
Kartoffelchips Hoher Fettgehalt (>25%)	1,1	0,6	0,02	0,06	(76)
Niedriger Fettgehalt (<25%)	1,2	0,8	0,03	0,06	(76)

- ^a berechnet als Prozent POP bezogen auf den anfänglichen Gehalt an Phytosterolen
^b berechnet auf der Grundlage von Verzehrdaten für Erwachsene (nur für Konsumenten) in europäischen Ländern,⁸¹ ausgenommen sind Daten mit Fußnote ^c
^c berechnet auf der Grundlage von Verzehrdaten für Erwachsene (nur für Konsumenten) in Deutschland⁸²

Angereicherte Lebensmittel

Informationen über die Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten in mit Phytosteryl/-stanyl-fettsäureestern angereicherten Lebensmitteln sind begrenzt; verfügbare Daten für die Matrices Milch, Margarine, flüssiges Brat- und Backfett und Schokolade sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die untersuchten Produkte unterscheiden sich hinsichtlich des Typs (Phytosteryl- bzw. Phytostanylester) und des Ausmaßes der Anreicherung sowie hinsichtlich der angewandten Behandlungen (Hitze, Lagerung).

Die in konventionell pasteurisierter, mit freien Phytosterolen oder Phytosterylestern angereicherter Milch bestimmten Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten lagen durchgehend bei ca. 2 mg/kg, was Oxidationsraten zwischen 0,05 und 0,07% entspricht. Die Auswirkungen der thermischen Prozessierung auf die Bildung von Phytosterol-Oxidationsprodukten in Milch wurden für verschiedene Erhitzungstechniken untersucht.⁸³ Die detektierten Gehalte schwankten zwischen 3,5 und 6,4 mg/kg. Die höchsten Mengen an Phytosterol-Oxidationsprodukten entstanden bei Erhitzung in der Mikrowelle bei 900 W für 1,5 Minuten. Die Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten und die entsprechenden Oxidationsraten spiegeln

jedoch nicht die zusätzlich gemessenen Abnahmen an ursprünglichen Phytosterolen wider. Das Erhitzen im Schaal-Ofen resultierte zum Beispiel in ähnlichen Mengen an Phytosterol-Oxidationsprodukten wie Erhitzen auf einem Elektroherd; beide Verfahren führten zu Oxidationsraten von 0,1%. Gleichzeitig lag der ermittelte Verlust des anfänglichen Phytosterols nach Erhitzen im Schaal-Ofen bei 4%, nach dem Erhitzen auf einem Elektroherd jedoch bei 60%, eine Bestätigung für die bereits erwähnte Lücke in den Massenbilanzen. Diese beruht auf den gegenwärtig angewandten analytischen Verfahren, die sich überwiegend auf die Quantifizierung polarer Phytosterol-Oxidationsprodukte beschränken.

Die Oxidationsraten, die in kommerziellen, nicht erhitzten Phytosterylesterangereicherten Margarinen bestimmt wurden,^{74,80,84} lagen in der gleichen Größenordnung (0,1%) wie die in nicht erhitzter Milch.^{83,85} Die Auswirkung des Erhitzens ist in einem mit Phytosterylestern angereichertem flüssigem Brat- und Backfett untersucht worden. Eine Behandlung bei 205°C für 30 Minuten resultierte in einem mehr als 10-fach höheren Gehalt an Phytosterol-Oxidationsprodukten im Vergleich zu nicht erhitzten Streichfetten, entsprechend einer Oxidationsrate von 1,0%.⁸⁶ Diese liegt in der gleichen Größenordnung wie die Oxidationsraten, die bei Bratversuchen (Pfanne, 180 °C) für die Oxidation von Sitosterol in Rapsöl bzw. in einem Phytosterylesterangereicherten flüssigen Streichfett bestimmt wurden.⁸⁷

Die Auswirkungen der Lagerung wurden in einer mit Phytosterylestern angereicherten dunklen Schokolade untersucht; nach 5 Monaten bei 30°C war die zusätzlich gebildete Menge an Phytosterol-Oxidationsprodukten niedrig und entsprach einer Oxidationsrate von nur 0,003%.⁸⁸ Andererseits führte die Lagerung einer mit Phytostanylestern angereicherten Margarine zu den höchsten Oxidationsraten, die für nicht erhitzte angereicherte Margarinen beschrieben wurden.⁸⁹

Die nach Lagerung mit Phytostanylestern angereicherter Margarine erhaltenen Daten stehen im Widerspruch zu der Auffassung, dass Phytostanole und ihre Fettsäureester aufgrund der vollständig gesättigten Ringstruktur weniger empfindlich gegenüber Oxidationsreaktionen sind als Phytosterole und die entsprechenden Ester.^{56,67} Diese Annahme wurde gestützt durch die Beobachtung, dass die

Oxidationsrate in pasteurisierter Milch, die mit Phytostanylfettsäureestern angereichert war, 10-fach niedriger war im Vergleich zu der in pasteurisierter Milch, die mit den gleichen Mengen an Phytosteryl-fettsäureestern angereichert worden war.⁸⁵ Intra- und intermolekulare Reaktionen, wie z.B. die Begünstigung der Oxidation der Stanolreste durch oxidierte Fettsäurereste, können jedoch die Bildung von Phytosterol-Oxidationsprodukten beeinflussen.⁶⁷ Bei der Bewertung des Risikopotentials oxidativer Veränderungen in angereicherten Lebensmitteln und des potentiellen Verlusts funktioneller Inhaltsstoffe muss deshalb nicht nur die ursprüngliche Zusammensetzung der Phytosterole-/stanole sondern auch die der Fettsäurereste berücksichtigt werden.

Tabelle 2. In ausgewählten Lebensmitteln ermittelte Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten (POP) und daraus resultierende Aufnahmen, berechnet auf der Grundlage eines Verzehrs angereicherter Lebensmittel, der 3 g Phytosterolen/Tag entspricht

Lebensmitteltyp	Behandlung	POP [mg/kg]	Oxidations- rate [%] ^a	POP Aufnahme [mg/Tag] ^b	Ref.
Milch					
Freie Phytosterole (\triangleq 0,5% Phytosterole)	Pasteurisierung (127 °C, 2 s)	2,2	0,05	1,32	(85)
Phytosterylester (\triangleq 0,5% Phytosterole)	Pasteurisierung (127 °C, 2 s)	2,0	0,04	1,2	(85)
Phytostanylester (\triangleq 0,5% Phytostanole)	Pasteurisierung (127 °C, 2 s)	0,2	0,004	0,1	(85)
Phytosterylester (\triangleq 0,3% Phytosterole)	Pasteurisierung	2,2	0,07	2,2	(83)
Phytosterylester (\triangleq 0,3% Phytosterole)	65 °C, 24 h	3,5	0,1	3,5	(83)
Phytosterylester (\triangleq 0,3% Phytosterole)	Mikrowelle (900 W, 1,5 min)	6,4	0,21	6,4	(83)
Phytosterylester (\triangleq 0,3% Phytosterole)	Mikrowelle (900 W, 2,0 min)	5,6	0,19	5,6	(83)
Phytosterylester (\triangleq 0,3% Phytosterole)	Elektroherd (15 min)	4,2	0,14	4,2	(83)
Streichfett					
Phytosterylester (\triangleq 8% Phytosterole)	-	68	0,09	2,6	(84)
Phytosterylester (\triangleq 6% Phytosterole)	-	46,5	0,07	2,3	(80)
Phytosterylester	-	12	-	-	(74)
Phytostanylester	-	255	-	9,6	(89)
Phytostanylester	Lagerung (6 Wochen, 4 °C)	354	0,12	13,3	(89)
Phytostanylester	Lagerung (6 Wochen, 20 °C)	734	0,61	27,5	(89)
Flüssiges Brat- und Backfett					
Phytosterylester (\triangleq 7,5% Phytosterole)	Erhitzung (205 °C, 30 min)	740	0,99	29,6	(86)
Phytosterylester (\triangleq 5% Phytosterole)	Braten in Pfanne (180 °C, 5 min)	291	0,6	10,9	(87)
Phytosterylester (\triangleq 5% Phytosterole)	Braten in Pfanne (180 °C, 10 min)	668	1,3	25,1	(87)
Dunkle Schokolade					
Phytosterylester	-	68,6	-	2,9	(88)
Phytosterylester	Lagerung (5 Monate, 30 °C)	71	0,003	3,0	(88)

^a berechnet als Prozent POP bezogen auf den anfänglichen Gehalt an Phytosterolen

^b berechnet auf der Grundlage von Verzehrsmengen, die 3g Phytosterolen/Tag entsprechen

Die wenigen verfügbaren Daten verdeutlichen die Komplexität der Vorgänge, die der Oxidation zugesetzter Phytosterole/-stanole und deren Ester zugrunde liegen. Die ermittelten Konzentrationen an Phytosterol-Oxidationsprodukten stellen die Summen an Keto-, Hydroxy-, und Epoxyverbindungen dar, wie sie exemplarisch in Abbildung 1 gezeigt sind. Die Interpretation der Daten wird durch die Tatsache erschwert, dass die eingesetzten analytischen Methoden nicht standardisiert sind; daher können sich die tatsächlich erfassten Phytosterol-Oxidationsprodukte nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ unterscheiden. Analytische Methoden, die die Untersuchung intakter oxidierter Phytosteryl- und Phytostanyl-fettsäureester ohne hydrolytische Spaltung der Esterbindung ermöglichen, stehen am Anfang.⁷² Systematische Studien zum Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Oxidation von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern fehlen.

4 Abschätzung der ernährungsbedingten Exposition gegenüber Phytosterol-Oxidationsprodukten

Die Datengrundlage für die Abschätzung der Exposition gegenüber Phytosterol-Oxidationsprodukten über angereicherte Lebensmittel ist limitiert. Die zum Vorkommen von Phytosterol-Oxidationsprodukten und zum Verzehr mit Phytosteryl-/stanylestern angereicherter Lebensmittel verfügbaren Daten wurden für zwei Vorgehensweisen eingesetzt.

Eine Vorgehensweise basierte auf (i) der Verwendung der experimentell in thermisch behandelten, angereicherten Lebensmitteln bestimmten Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten und (ii) der Annahme, dass die tägliche maximale Aufnahme an Phytosterolen/-stanolen von 3 g durch den Verzehr eines dieser Lebensmittel erreicht wird. Die täglichen Aufnahmen an Phytosterol-Oxidationsprodukten, die aus dem Verzehr der Portionsgrößen resultieren, die 3 g Phytosterolen entsprechen, sind für die verschiedenen, angereicherten Lebensmittel in Tabelle 2 zusammengestellt. Für nicht erhitzte Lebensmittel (Streichfette, Milch und dunkle Schokolade) lag die Aufnahme an Phytosterol-Oxidationsprodukten zwischen 1,2 und 2,9 mg/Tag. Nach dem Erhitzen steigt die Aufnahme für Milch auf 3,5 – 4,2 mg/Tag und für flüssiges Brat- und Backfett auf 29,6 mg/Tag.

Die zweite Vorgehensweise basierte auf (i) der Verwendung von Daten zur ernährungsbedingten Exposition gegenüber Phytosterolen, die aus Erhebungen zum

Verzehr angereicherter Lebensmittel abgeschätzt worden sind,²⁰⁻²³ und (ii) der Annahme von minimalen (0,1%) und maximalen (1%) Oxidationsraten. Wie Tabelle 3 zeigt, liegen die durchschnittlichen Aufnahmen an Phytosterol-Oxidationsprodukten, die aus dieser Vorgehensweise resultieren (0,35 mg/Tag – 2,45 mg/Tag für eine minimale und 3,5 mg/Tag – 24,5 mg/Tag für eine maximale Oxidationsrate), in einer vergleichbaren Größenordnung wie die auf der Grundlage der vorher beschriebenen Abschätzung bestimmten.

Tabelle 3. Aufnahme von Phytosterol-Oxidationsprodukten (POP) basierend auf den Verzehrdaten für angereicherte Lebensmittel

Phytosterol-Aufnahme [g/Tag]		POP Aufnahme [mg/Tag]				Ref.
Mittelwert	95. Perz.	Oxidationsrate 0,1%		Oxidationsrate 1,0%		
		Mittelwert	95. Perz.	Mittelwert	95. Perz.	
0,35 – 0,86	1,06 – 3,70	0,35 – 0,86	1,06 – 3,70	3,5 – 8,6	10,0 – 37,0	(20) ^{a,b}
0,24 – 0,96 ^d	1,68 – 2,64	0,24 – 0,96	1,68 – 2,64	2,4 – 9,6	16,8 – 26,4	(21) ^{a,b}
2,45	5,48	2,45	5,48	24,5	54,8	(22) ^c
1,51	4,20	1,51	4,20	15,1	42,0	(23) ^c

^a Aufnahme berechnet auf der Grundlage von Käufen pro Haushalt

^b Daten aus den Niederlanden, dem Vereinigten Königreich, Frankreich, Deutschland und Belgien

^c Aufnahme berechnet auf der Grundlage von Käufen durch Verbraucher

^d Daten stellen den Median der täglichen Aufnahme dar

Ein Vergleich der abgeschätzten Aufnahme von Phytosterol-Oxidationsprodukten aus angereicherten Lebensmitteln (Tabellen 2 und 3) mit der aus nicht angereicherten Lebensmitteln (Tabelle 1) zeigt die signifikant höheren Aufnahmen, die aufgrund des Verzehrs von Lebensmitteln, denen Phytosterole/-stanole und deren Ester zugesetzt wurden, zu erwarten sind. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist diese Erhöhung der Aufnahme besonders ausgeprägt für angereicherte Lebensmittel, die Erhitzungsprozessen unterworfen wurden.

Um die Aufnahme von Phytosterolen aus mehreren Quellen abschätzen zu können, ist ein Modell für den ungünstigsten Fall entwickelt worden, welches die voraussichtliche Aufnahme an Phytosterolen simuliert.⁹⁰ Dabei wird angenommen, dass der Verbraucher den Empfehlungen auf der Etikettierung nicht folgt.¹⁸ Unter Zugrundelegung von Daten der Deutschen Nationalen Verzehrsstudie II wurden zehn verschiedene Lebensmittelerzeugnisse aus den Anträgen für Neuartige Lebensmittel ausgewählt und für diese Lebensmittel 0,3 – 2 g Phytosterole pro üblicher

Tagesportion angenommen. Die voraussichtliche Aufnahme an Phytosterolen wurde in drei Szenarien durch eine schrittweise Kumulierung in verschiedenen funktionellen Lebensmitteln berechnet. Bei der Anwendung dieses Modells würde im ungünstigsten Fall eine Anreicherung von 2 g Phytosterolen pro vorgeschlagener Portionsgröße in einer maximalen Aufnahme von 13 g/Tag resultieren. Geht man wieder von Oxidationsraten von 0,1% bzw. 1% aus, würde dies zu einer ernährungsbedingten Exposition gegenüber Phytosterol-Oxidationsprodukten von 13 mg/Tag bzw. 130 mg/Tag führen.

5 Resorption von Phytosterol-Oxidationsprodukten aus der Nahrung

Tierstudien

Die intragastrale Verabreichung von 7-Keto- und 5,6-Epoxysterolen (5 mg in 1 mL Triolein), zwei Vertreter der Hauptklassen von Phytosterol-Oxidationsprodukten, an erwachsene männliche Ratten mit kanüliertem mesenterischem Lymphsystem zeigte, dass die lymphatische Absorptionsrate von 7-Ketositosterol (1,4%) ähnlich war wie die von Sitosterol (1,2%). Die entsprechenden Epoxide zeigten die höchsten lymphatischen Absorptionsraten (z.B. α -Epoxytostanol: 2,7% und β -Epoxycampestanol: 7,9%); Campesterol-Oxidationsprodukte wurden generell besser absorbiert als die entsprechenden Sitosterolderivate.⁹¹

Versuche an Ratten, deren *Ductus thoracicus* kanüliert wurde und die mit einer AIN-93G-basierten Diät (2,5 g Cholesterin/kg Diät oder 2,5 g Cholesterin/kg Diät + 2,5 g Phytosterole oder Phytosterol-Oxidationsprodukte/kg Diät) gefüttert wurden, bestätigten die niedrigen lymphatischen Absorptionsraten der Phytosterole (Sitosterol: 2,2%, Campesterol: 5,5%) im Vergleich zu Cholesterin (37,3%). Es zeigte sich jedoch, dass die lymphatischen Absorptionsraten der Oxidationsprodukte des Sitosterols (9,1%) und Campesterols (15,9%) höher waren als die der Ausgangs-Phytosterole.⁹²

Eine Mischung von Phytosterol-Oxidationsprodukten wurde Hamstern über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht und die Konzentration der Phytosterol-Oxidationsprodukte in Plasma, Aorta, Leber, Nieren und Herz bestimmt.⁹³ Bei den zwei höchsten Dosen (2500 mg/kg Diät und 500 mg/kg Diät) waren Phytosterol-Oxidationsprodukte in allen untersuchten Geweben nachweisbar. Die Verhältnisse

waren jedoch nach der Aufnahme verändert: Im Plasma waren die Gehalte an Campesterol-Oxidationsprodukten höher als jene des Sitosterols. Dagegen war die Menge an 7-Ketositosterol, dem vorherrschenden Phytosterol-Oxidationsprodukt in der Diät, im Plasma sehr gering. Im Gegensatz zum Plasma war Sitostantriol das in den Geweben hauptsächlich detektierte Phytosterol-Oxidationsprodukt.

Ähnliche Befunde wurden in einer 6-Wochen-Fütterungsstudie mit Hamstern beobachtet.⁹⁴ In den im Futter verabreichten Mischungen von Sitosterol- und Stigmasterol-Oxidationsprodukten (1 g/kg Futter) dominierten die 7-Ketoderivate, während im Plasma nur die 7 α - und 7 β -Hydroxyderivate und in der Leber 7 α - und 7 β -Hydroxy- sowie die 5,6 α - und 5,6 β -Epoxyde detektiert wurden.

Humanstudien

Das Vorkommen oxidierter Phytosterole in humanem Serum wurde erstmals für phytosterolämische Patienten beschrieben.⁹⁵ Inzwischen sind mehrere Studien veröffentlicht worden, die über das Vorkommen von Phytosterol-Oxidationsprodukten im Plasma gesunder Probanden berichten. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich der Typen und der Mengen an detektierten Oxidationsprodukten (Tabelle 4).

Tabelle 4. Grundspiegel von Phytosterol-Oxidationsprodukten (POP), die in humanem Plasma / Serum bestimmt wurden

	POP in humanem Plasma / Serum [μM]				
	Jahr				
	2013 ¹⁰⁰	2012 ⁹⁸	2011 ⁹⁹	2008 ⁹⁷	2004 ⁹⁶
7 α -OH-Brassicasterol	-	0,0007	-	-	-
7 α -OH-Campesterol	0,0002	0,006	0,0002	-	-
7 α -OH-Stigmasterol	-	0,008	-	-	-
7 α -OH-Sitosterol	0,0005	0,01	0,0004	0,11	-
7 β -OH-Brassicasterol	-	0,0006	-	-	-
7 β -OH-Campesterol	0,0008	0,004	0,0004	-	-
7 β -OH-Stigmasterol	-	0,003	-	0,11	-
7 β -OH-Sitosterol	0,003	0,008	0,003	-	-
α -Epoxytostanol	-	-	-	-	0,01
β -Epoxytostanol	-	-	-	-	0,13
Campestantriol	-	-	-	-	0,01
Sitostantriol	-	-	-	-	0,09
7-Ketocampesterol	0,001	0,002	0,001	-	-
7-Ketostigmasterol	-	0,002	-	-	-
7-Ketositosterol	0,006	0,004	0,007	-	0,01
Gesamt POP	0,011	0,05	0,012	0,22	0,26

Die älteren GC/MS-basierten Studien berichteten nur über das Vorkommen von α - und β -Epoxy- und Triolderivaten⁹⁶ oder von 7 α - und 7 β -Hydroxy-Derivaten.⁹⁷ Das größte Spektrum an Phytosterol-Oxidationsprodukten (insgesamt 11) wurde nach dem Einsatz einer GCxGC/TOF-Methode detektiert.⁹⁸ In zwei auf einer Isotopenverdünnung GC/MS-Methode beruhenden Studien wurden sechs Phytosterol-Oxidationsprodukte detektiert, wobei 7-Keto- und 7 β -Hydroxysitosterol die Hauptvertreter waren.^{99,100} Diese Studien berichteten über vergleichbare Konzentrationen der in zwei Gruppen von 16 bzw. 43 gesunden Probanden detektierten Phytosterol-Oxidationsprodukte; die ermittelten Konzentrationsbereiche individueller Phytosterol-Oxidationsprodukte waren 0,07 – 3,01 ng/ml Serum (0,0002 – 0,007 μM)⁹⁹ und 0,09 – 2,49 ng/ml Plasma (0,0002 – 0,006 μM).¹⁰⁰

Lediglich zwei Studien sind verfügbar, die vergleichende Daten zu den Gehalten an Phytosterol-Oxidationsprodukten vor und nach Verzehr mit Phytosterylestern angereicherter Margarine liefern. In der ersten Studie mit 16 Probanden, die durch Verzehr einer mit Phytosterylestern angereicherten Margarine über 28 Tage 3 g Phytosterole/Tag aufnahmen, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Serumkonzentrationen von Campesterol (von $2,8 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$ [$7,0 \pm 3,6 \mu\text{M}$] vor auf $4,2 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ [$10,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$] nach der Ernährungsintervention) und Sitosterol

($2,1 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ [$5,0 \pm 3,1 \mu\text{M}$] vorher und $4,3 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$ [$10,4 \pm 4,6 \mu\text{M}$] nachher).⁹⁹ Unter den detektierten Phytosterol-Oxidationsprodukten war 7β -Hydroxysitosterol der Hauptvertreter in der verzehrten Margarine ($8,6 \pm 0,3 \text{ ng/mg}$). Für dieses Phytosterol-Oxidationsprodukt wurde eine statistisch signifikante Erhöhung (87%) der Serumkonzentration von $1,2 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$ ($0,003 \pm 0,001 \mu\text{M}$, vor Verzehr der Margarine) auf $2,2 \pm 1,3 \text{ ng/ml}$ ($0,005 \pm 0,003 \mu\text{M}$, nach Verzehr der Margarine) beobachtet. Darüber hinaus gab es eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Serumspiegeln von Campesterol und der Summe der an Position 7 oxidierten Campesterolderivate ($R^2=0,915$; $P<0,001$) sowie Sitosterol und der Summe an Position 7 oxidierten Sitosterolderivate ($R^2=0,915$; $P<0,001$).

In einer zweiten randomisierten Doppelblind-Crossover-Studie verzehrten 43 gesunde Probanden jeweils über 4 Wochen, die durch Wash-out-Phasen von vier Wochen getrennt waren, eine mit Phytosterylestern angereicherte Margarine, eine mit Phytostanylestern angereicherte Margarine und eine Kontrollmargarine; der Verzehr der angereicherten Margarinen entsprach Aufnahmen von 3 g Sterolen bzw. Stanolen pro Tag.¹⁰⁰ Im Vergleich zur Kontrolle waren die LDL-Cholesterinkonzentrationen im Serum nach Verzehr der mit Phytosterylestern angereicherten (-8,1%) und der mit Phytostanylestern angereicherten (-7,8%) Margarinen niedriger. Der Verzehr der mit Phytosterylestern angereicherten Margarine führte nicht zu Veränderungen der Phytosterol-Oxidationsprodukt-Konzentrationen im Plasma; die Konzentrationen der einzelnen Phytosterol-Oxidationsprodukte lagen zwischen 0,1 und 2,5 ng/ml Plasma ($0,0002 - 0,006 \mu\text{M}$) vor und zwischen 0,1 und 2,4 ng/ml Plasma ($0,0002 - 0,006 \mu\text{M}$) nach der Ernährungsintervention. Andererseits reduzierte die Aufnahme der mit Phytostanylestern angereicherten Margarine die Serumkonzentration von 7β -Hydroxycampesterol um 0,07 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle (~14%) und zu der mit Phytosterylestern angereicherten Margarine (~15%).

Der Grund für die unterschiedlichen Daten hinsichtlich der Phytosterol-Oxidationsprodukt-Konzentrationen im Plasma nach Verzehr angereicherter Margarine, die im selben Labor mit identischen Methoden erhalten wurden, bleibt unklar.

Die zweite Studie offenbarte große Schwankungen in den Ausgangswerten der Phytosterol-Oxidationsprodukt-Plasmakonzentrationen zwischen den Probanden; sie blieben jedoch während des gesamten Interventionszeitraums relativ stabil. In keiner der drei Interventionen korrelierten Serumkonzentrationen von (nicht oxidiertem) Sitosterol und Campesterol mit den Plasmakonzentrationen der Sitosterol- und Campesterol-Oxidationsprodukte.¹⁰¹ Sechs Probanden konnten aufgrund ihrer durchgehend hohen oder niedrigen Phytosterol-Oxidationsprodukt-Plasmakonzentrationen in entsprechenden Gruppen zusammengefasst werden. Bei Probanden, die Phytosterole in „geringem“ bzw. „hohem“ Maße oxidieren können, fand man geringe bzw. hohe Konzentrationen oxidierter Low-Density-Lipoproteine im Plasma. Jedoch ließen sich diese Unterschiede nicht durch Veränderungen im Eisen/Kupfer-Status, in den α -Tocopherolkonzentrationen und in den TEAC-Werten (*in vitro*-Parameter zur Einschätzung der prooxidativen/antioxidativen Kapazität eines Organismus) erklären.

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden die Konzentrationen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol und ihrer Oxidationsprodukte im Plasma und in Aortenklappensegeln von Patienten mit einer schweren Aortenstenose bestimmt.²⁷ Die absoluten und die Cholesterin-korrigierten Gehalte an Campesterol und Sitosterol im Plasma, in den Aortenklappensegeln und zwischen beiden Kompartimenten zeigten eine starke Korrelation. Demgegenüber war die Korrelation zwischen den Konzentrationen der Phytosterole und denen der entsprechenden Phytosterol-Oxidationsprodukte im Plasma und die Korrelation zwischen den Phytosterol-Oxidationsprodukt-Konzentrationen im Plasma und denen in den Aortenklappensegeln nur schwach. Darüber hinaus zeigten die Konzentrationen der Phytosterole und ihrer an Position 7 oxidierten Metabolite im Gewebe der Aortenklappensegel eine signifikante Korrelation. Die Autoren mutmaßten, dass der letztere Befund mit lokalen Entzündungsvorgängen in atherosklerotischen Plaques und Geweben in Verbindung stehen könnte.

Endogene Bildung von Phytosterol-Oxidationsprodukten

Die endogene Bildung von Phytosterol-Oxidationsprodukten ist in verschiedenen *in vitro*-Experimenten gezeigt worden. In Rattenleber-Mitochondrien und mitochondrialen Fraktionen wurden sowohl Oxidationen des Sterolkerns als auch der

Seitenkette von β -Sitosterol beobachtet; jedoch waren die Umsatzraten von β -Sitosterol weit unter denen von Cholesterin.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Die Hydroxylierung der Campesterol-Seitenkette lief in Rattenleber-Mitochondrien im gleichen Maße ab wie die der Seitenkette des Cholesterins.¹⁰⁴ Da die mikrobielle Bildung von Cholesterin-Oxidationsprodukten im Darm von Menschen und Ratten beobachtet worden ist, werden solche Transformationsreaktionen auch für Phytosterol-Oxidationsprodukte diskutiert.^{106,107} Es ist zu erwarten, dass sich die unterschiedlichen Bildungswege, d.h. enzymkatalysierte gegenüber chemischen Oxidationen, in Unterschieden zwischen den Spektren endogen gebildeter und über die Nahrung aufgenommener Phytosterol-Oxidationsprodukte widerspiegeln.

6 Biologische Effekte von Phytosterol-Oxidationsprodukten

Genotoxizität

Die Genotoxizität wurde *in vitro* mit einer hitzebehandelten Mischung von Phytosterolen, die ungefähr 30% Phytosterol-Oxidationsprodukte enthielt, untersucht.¹⁰⁸ Aufgrund der in einem bakteriellen Mutagenitätstest, einem Chromosomenaberrationstest und einem Mikrokerntest erhaltenen Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass Phytosterol-Oxidationsprodukte kein genotoxisches Potential besitzen. Eine Studie, in der aus thermooxidiertem β -Sitosterol isolierte Fraktionen eingesetzt wurden, bestätigte, dass individuelle Phytosterol-Oxidationsprodukte keine mutagene Aktivität in *Salmonella typhimurium*-Stämmen entfalten.¹⁰⁹ Des Weiteren wurden nach einer intraperitonealen Behandlung von Mäusen mit Phytosterolepoxid- oder Phytosteroltriolmischungen keine Mikrokerne in den Erythrozyten der Tiere beobachtet.¹¹⁰

Subchronische Toxizität

An Ratten wurde eine 90-Tage-Fütterungsstudie mit einer hitzebehandelten Mischung von Phytosterolen, die ungefähr 27% polare Phytosterol-Oxidationsprodukte enthielt, durchgeführt.¹⁰⁸ Die Ratten wurden mit einer Kontrolldiät gefüttert oder mit Diäten unter Zusatz von Sterylestern (5,6%) oder Sterylestern, die mit 0,2, 0,6 oder 1,6% dieser Mischung von Phytosterol-Oxidationsprodukten (entsprechend 0,05, 0,16 oder 0,43% an polaren Phytosterol-Oxidationsprodukten) angereichert waren, gefüttert. Es gab keine Auffälligkeiten bei den klinischen Untersuchungen, den Verhaltenstests, der Futter- und Wasseraufnahme, der Ophthalmoskopie, der Urinanalyse und Nierenkonzentrationsfähigkeit, der Nekropsie und der histopathologischen Analyse. Bei den Tieren, deren Futter neben Sterylestern eine 1,6%ige Phytosterol-Oxidationsprodukt-Mischung enthielt, wurden eine leichte Reduktion des Körpergewichts (weibliche Tiere), eine leichte Erhöhung der Thrombozytenzahl (männliche Tiere) sowie der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrits und des mittleren korpuskulären Volumens im Blut (weibliche Tiere), leichte Abnahmen des Glucose-Plasmaspiegels und Zunahmen des Albuminspiegels sowie des Albumin-Globulin-Verhältnisses im Plasma (männliche Tiere) beobachtet. Weiterhin zeigten sich eine Zunahme der γ -Glutamyltransferase-Aktivität im Plasma (weibliche Tiere), reduzierte Triglycerid- und Phospholipid-Plasmaspiegel (beide Geschlechter) und eine leichte Zunahme des Lebergewichts (weibliche Tiere) im

Vergleich zu allen anderen Tiergruppen. Keiner der oben genannten Befunde wurde von histopathologischen Veränderungen in den Tieren begleitet. Basierend auf den mit der mittleren Dosis (0,6% der Phytosterol-Oxidationsprodukt-Mischung in der Diät) erzielten Ergebnissen wurde ein No Observed Effect Level (NOEL) bei einer abgeschätzten Aufnahme über das Futter von 128 mg Phytosterol-Oxidationsprodukten/kg/Tag für männliche und 144 mg Phytosterol-Oxidationsprodukten/kg/Tag für weibliche Tiere festgelegt.

Zytotoxizität und proinflammatorisches Potential

Zahlreiche *in vitro*-Experimente, in denen unterschiedliche Zelltypen und Zelllinien mit Mischungen von Oxiden oder reinen Oxiden inkubiert wurden, zeigten, dass Phytosterol-Oxidationsprodukte zytotoxische Effekte hervorrufen, die qualitativ ähnlich sind wie die für Cholesterin-Oxidationsprodukte beobachteten; es waren jedoch höhere Konzentrationen erforderlich ($> 60 \mu\text{M}$).¹¹¹⁻¹¹⁵ Die Untersuchung von zellulären Markern, die auf inflammatorische und/oder apoptotische Vorgänge hindeuten, zeigten eine Verminderung der Zellviabilität sowie die Auslösung von oxidativem Stress und damit zusammenhängenden Prozessen. Dabei zeigten 7 β -Hydroxy- und 7-Keto-Derivate unter den in Lebensmitteln vorherrschenden Phytosterol-Oxidationsprodukten das größte zytotoxische Potential.

Eine Studie untersuchte die Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-8 und IL-10 in der Darmepithelzelllinie Caco-2 nach Zugabe von 7-Ketocholesterol und 7-Ketostigmasterol in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$.¹¹⁶ Es wurde gezeigt, dass 7-Ketostigmasterol die Freisetzung der drei oben genannten Zytokine signifikant erhöhte. Darüber hinaus waren die nach Inkubation mit 7-Ketostigmasterol freigesetzten Mengen an TNF α und IL-8, Zytokine mit proinflammatorischer Mediatorfunktion, signifikant höher als die nach Inkubation mit 7-Ketocholesterol freigesetzten TNF α - und IL-8-Mengen. Eine *in vivo*-Studie untersuchte die Wirkung von Sitosterol-Oxidationsprodukt- bzw. Stigmasterol-Oxidationsprodukt-Mischungen (Endkonzentration der Oxidationsprodukte: $5 \mu\text{M}$) nach Injektion in Mehlwürmer.¹¹⁷ In Übereinstimmung mit den Beobachtungen *in vitro* erwiesen sich die verabreichten Phytosterol-Oxidationsprodukte als zytotoxisch, was zu einem Anstieg der Sterblichkeit der Mehlwürmer führte. Das schädigende Potenzial war jedoch fünfmal niedriger als das der Cholesterin-Oxidationsprodukte.

Proatherogene Effekte

Sowohl im Fall *in vivo* gebildeter als auch im Fall über die Nahrung aufgenommener Cholesterin-Oxidationsprodukte wurde eine enge Verknüpfung mit atherosklerotischen Prozessen gezeigt.^{35,36,39} Hinsichtlich potentiell proatherogener Effekte von Phytosteroloxiden untersuchten Yang *et al.*¹¹⁸ *in vitro* die Auswirkungen von Sitosterol und Sitosterol-Oxidationsprodukten auf die Acetylcholin (ACh)-induzierte Relaxation von Ratten-Aorten, einem Marker für den Gesundheitszustand von Gefäßen, durch isometrische Spannungsmessungen. Während Sitosterol die Vasorelaxation nicht beeinträchtigte, führten Sitosterol-Oxidationsprodukte zu einer signifikanten Abschwächung der ACh-vermittelten Relaxation bei einer Konzentration von 1 µg/ml (2,3 µM). Dieser *in vitro* beobachtete Effekt wurde von den Autoren als Indikator für ein proatherogenes Potential von Phytosterol-Oxidationsprodukten betrachtet und einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zugeschrieben.

Die Daten hierzu sind jedoch nicht eindeutig, wenn man die verfügbaren *in vivo*-Experimente berücksichtigt. In einer *in vivo*-Studie mit Apo-E-defizienten Mäusen konnte beim Vergleich der Effekte einer mit Phytosterolen oder Phytosterol-Oxidationsprodukten supplementierten Diät (jeweils 0,2 g/kg Futter über 9 Wochen) weder eine Korrelation zu den Serum-Cholesterinkonzentrationen noch zu der Größe atherosklerotischer Plaques festgestellt werden.⁹² In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden die Auswirkungen einer typisch westlichen Diät, die 0,25% Cholesterin enthielt, im Vergleich zu der gleichen Diät, in der 10% des Cholesterins durch Cholesterin-Oxidationsprodukte bzw. ernährungsrelevante Phytosterol-Oxidationsprodukte ersetzt worden war, in LDL-Rezeptor[±]-Mäusen für 35 Wochen untersucht.¹¹⁹ Hinsichtlich der Größe der Läsionen konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen beobachtet werden, so dass die Ergebnisse der oben beschriebenen Studie bestätigt wurden. Jedoch war der Anteil an schweren atherosklerotischen Läsionen nicht nur in den Mäusen, die mit der Cholesterin-Oxidationsprodukte enthaltenden Diät gefüttert worden waren, sondern auch in der Gruppe, welche die Phytosterol-Oxidationsprodukte erhalten hatten, signifikant erhöht.

Verlust antiatherogener Eigenschaften

Neben potentiell proatherogenen Effekten wird eine im Vergleich zu nicht-oxidierten Phytosterolen verringerte antiatherogene Potenz von Phytosterolen aufgrund deren Oxidation diskutiert. Ein solcher Effekt wäre insbesondere hinsichtlich der Funktionalität und Wirksamkeit der mit Phytosterolen angereicherten Lebensmittel von Bedeutung.

Apo-E-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu einer mit Phytosterolen gefütterten Kontrollgruppe (0,2 g/kg Diät) einen erhöhten Serumspiegel an Cholesterin-Oxidationsprodukten, nachdem sie für 9 Wochen mit einer Diät, die Phytosterol-Oxidationsprodukte (0,2 g/kg Diät) enthielt, gefüttert worden waren.⁹² Darüber hinaus wurden Diäten, die entweder 1 g/kg Phytosterole (Sitosterol/Stigmasterol) oder 1 g/kg der entsprechenden Oxidationsprodukte enthielten, für 6 Wochen an männliche Hamster gefüttert.⁹⁴ Die Größe der Plaques und die Cholesterinspiegel in den Aorten waren in den Tieren, welche die Phytosteroldiät erhalten hatten, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe reduziert; beide Effekte wurden nach Verzehr von Diäten, die Phytosterol-Oxidationsprodukte enthielten, nicht beobachtet. Darüber hinaus waren Kontraktionen der Aorten als Antwort auf ACh-Stimulierung in der mit Phytosterolen gefütterten Gruppe im Vergleich zu den mit der Kontrolldiät gefütterten Tieren signifikant reduziert. Dagegen zeigten die Aorten der Tiere, die Phytosterol-Oxidationsprodukte verzehrt hatten, genauso starke Kontraktionen wie die der Kontrollgruppe, was auf einen Verlust der kardioprotektiven Eigenschaften oxidierter Phytosterole hindeutet.

Potentieller Einfluss von Phytosterol-Oxidationsprodukten auf die Hydrolyse von Phytosterylestern

Wesentliche Voraussetzung für die cholesterinsenkenden Eigenschaften von Phytosterolen, die Lebensmitteln als Fettsäureester zugesetzt werden, ist die intestinale Spaltung der Esterbindungen. In einer mechanistischen Studie wurde der Einfluss der Oxidation auf die *in vitro*-Aktivität der pankreatischen Cholesterinesterase durch Einsatz von Sitosteryloleat und den Oxidationsprodukten 7-Ketositosteryloleat und Sitosteryl-9,10-dihydroxystearat als Substrate untersucht.¹²⁰ Im Fall des 7-Ketositosteryloleats führte die Oxidation des Sterolrests zu einer erhöhten Affinität zur Cholesterinesterase und zu einer schnelleren Umsetzung im

Vergleich zu Sitosteryloleat. Im Gegensatz dazu resultierte die oxidative Veränderung des Fettsäurerests, die zur Bildung von Sitosteryl-9,10-dihydroxystearat führt, in einem fast vollständigen Ausfall der Hydrolyse. Darüber hinaus war in Anwesenheit von Sitosteryl-9,10-dihydroxystearat die Hydrolyserate von Sitosteryloleat signifikant reduziert.

Die in dieser *in vitro*-Studie beschriebenen Beobachtungen verdeutlichen die Komplexität der Aspekte, die bei einer Bewertung von Phytosterol-Oxidationsprodukten Berücksichtigung finden müssen. Kommerziell werden Lebensmittel fast ausschließlich mit Phytosteryl/-stanylestern und nicht mit den freien Sterolen/Stanolen angereichert. Aufgrund der analytischen Möglichkeiten ist der Wissensstand derzeit auf die oxidierten Sterole/Stanole fokussiert. Die üblicherweise im Zuge der Analytik eingesetzte alkalische Hydrolyse oder Umesterung führt zu einem Verlust an Information hinsichtlich der Bildung oxidierter Ester. Die *in vitro*-Studie zeigte Interaktionen zwischen den verschiedenen oxidierten "Spezies", die während des Oxidationsprozesses gebildet werden können, und deren Einfluss auf die Hydrolyserate des intakten Sterylesters auf. Dies deutet darauf hin, dass bei der Bewertung von Lebensmitteln, die mit unterschiedlichen Mischungen von Phytosteryl- und Phytostanylfettsäureestern angereichert wurden, eine isolierte Betrachtung von Phytosterol-Oxidationsprodukten nicht ausreichend sein könnte.

7 Zusammenfassung und Wissenslücken

- Analytik, Vorkommen und Exposition über die Nahrung
 - Die derzeit angewandten analytischen Verfahren erfassen fast ausschließlich polare Phytosterol-Oxidationsprodukte. Die Berechnung von Massenbilanzen zeigt eine Lücke: Verluste an intakten Phytosterolen lassen sich nicht durch die gebildeten Mengen dieser polaren Phytosterol-Oxidationsprodukte erklären.
 - Analytische Ansätze, die sowohl die Untersuchung primärer (Hydroperoxide) und tertiärer (Dimere, Oligomere, Polymere) Oxidationsprodukte als auch oxidierter Fettsäureester ermöglichen, stehen noch am Anfang.
 - Systematische Studien zum Einfluss des angewandten Erhitzungsverfahrens (einschließlich der entsprechenden Zeit-/Temperaturprofile), der Lebensmittelmatrix und der Anwesenheit antioxidativer Komponenten auf die Oxidation von Phytosterolen/ -stanolen und ihren Estern fehlen.
 - Es liegen Daten zu Phytosterol-Oxidationsprodukten in verschiedenen Lebensmitteln mit natürlichen Gehalten an Phytosterolen/-stanolen oder ihren Estern vor. Es fehlen jedoch systematische Bestimmungen der Aufnahmemengen, die aus diesen Grundgehalten resultieren.
 - Die Daten zu Gehalten an Phytosterol-Oxidationsprodukten in Lebensmitteln, die mit Phytosteryl/-stanyl-fettsäureestern angereichert wurden, sind begrenzt. Die Hitzebehandlung angereicherter flüssiger Streichfette oder pflanzlicher Öle führte jedoch zu einem mehr als 10-fach höheren Gehalt an Phytosterol-Oxidationsprodukten im Vergleich zu nicht erhitzten Streichfetten. Darüber hinaus scheinen die Gehalte an Phytosterol-Oxidationsprodukten auch während der Lagerung von Margarine zuzunehmen. Eine systematische Bestimmung von Phytosterol-Oxidationsprodukten in gelagerten oder hitzebehandelten Lebensmitteln fehlt.
 - Die Datenlage zur Abschätzung der nahrungsbedingten Exposition gegenüber Phytosterol-Oxidationsprodukten durch angereicherte Lebensmittel ist lückenhaft.
- Absorption und endogene Bildung
 - Tierstudien belegen die Absorption mit der Diät aufgenommener Phytosterol-Oxidationsprodukte und deren Verteilung in verschiedene Gewebe. Die beobachteten Absorptionsraten unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Typ des Phytosterols und vom Typ des Oxidationsprodukts. Dabei bestehen

qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den über die Diät verabreichten Phytosterol-Oxidationsprodukten und den in Plasma oder Geweben bestimmten. Auf der Grundlage des derzeitigen Wissensstands sind Vorhersagen zur Bioverfügbarkeit oral aufgenommener Mischungen von Phytosterol-Oxidationsprodukten nicht möglich.

- Die auf das natürliche Vorkommen von Phytosterolen zurückzuführenden humanen Grundspiegel an Phytosterol-Oxidationsprodukten unterscheiden sich signifikant hinsichtlich der Typen und Konzentrationen an Oxidationsprodukten. Die verfügbaren Daten erlauben keine Rückschlüsse, ob die beobachtete Variabilität auf methodische Unterschiede oder auf tatsächliche Unterschiede in Exposition/biologischen Effekten zurückzuführen ist.
 - Es besteht eine Wissenslücke hinsichtlich der Beiträge oral aufgenommener bzw. endogen gebildeter Phytosterol-Oxidationsprodukte zu den Gehalten in humanen Geweben.
 - Daten zu dem zusätzlichen Beitrag angereicherter Lebensmittel zu den humanen Plasma- und Gewebekonzentrationen von Phytosterol-Oxidationsprodukten sind rar.
 - Die wenigen verfügbaren Daten zur Absorption von Phytosterol-Oxidationsprodukten durch den Menschen nach Verzehr mit Phytosteryl/-stanylfettsäureestern angereicherter Lebensmittel sind widersprüchlich.
 - Phytosterol-Oxidationsprodukte sind in Aortenklappensegeln von Patienten mit schwerer Aortenstenose nachgewiesen worden. Die beobachteten schwachen Korrelationen zwischen den Mengen an Phytosterolen und denen der entsprechenden Oxidationsprodukte im Plasma sowie die schwachen Korrelationen zwischen den Konzentrationen von Phytosterol-Oxidationsprodukten im Plasma und denen im Herzklappengewebe bleiben unerklärt.
- Biologische Effekte
 - Es gibt substantielle Hinweise aus *in vitro*-Experimenten und Tierversuchen, dass die cholesterinsenkenden Eigenschaften von Phytosterolen durch Oxidation verringert werden. Jedoch ist dieser Effekt nur unter experimentellen Bedingungen beobachtet worden, bei denen das nicht oxidierte Phytosterol

komplett durch das entsprechende Oxidationsprodukt ersetzt wurde. Die aus dieser Versuchsanordnung erhaltenen Daten erlauben keine Rückschlüsse bezüglich dieser Effekte für realistischere Szenarien, d.h. den Verzehr von Lebensmitteln, in denen Phytosterole in einer deutlich geringeren Rate von 0,1-1% oxidiert vorliegen.

- *In vitro*-Experimente deuten auf ein proatherogenes Potential von Phytosterol-Oxidationsprodukten hin. Die verfügbaren *in vivo*-Studien sind nicht beweiskräftig.
- Der aus einem *in vitro*-Experiment abgeleitete Hinweis auf eine potentielle proinflammatorische Wirkung von Phytosterol-Oxidationsprodukten auf intestinale Epithelzellen bleibt unklar.
- Das Wissen über potentiell adverse Effekte oxidierter Phytosteryl/-stanylester (entweder am Sterol/Stanolrest oder in der Fettsäurekette oxidiert) fehlt.
- Eine Risiko-Nutzen-Analyse der cholesterinsenkenden Effekte von Phytosterolen/-stanolen auf der einen und den potentiell adversen Effekten der in angereicherten Lebensmitteln vorhandenen Phytosterol-Oxidationsprodukte auf der anderen Seite fehlt.

8 Forschungsbedarf

- Entwicklung analytischer Ansätze, die sowohl tertiäre Phytosterol-Oxidationsprodukte (Dimere, Trimere, Polymere) als auch oxidierte Steryl-/Stanylester erfassen.
- Systematische Studien zum Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Oxidation von Phytosterolen/-stanolen und ihren Estern im Zuge der Prozessierung und Lagerung.
- Erweiterung der begrenzten Datenlage zum Schicksal von Phytosterol-Oxidationsprodukten, die über den Verzehr angereicherter Lebensmittel aufgenommen werden (einschließlich des potentiellen Beitrags der Darm-Mikrobiota).
- Bestimmung der Aufnahme von Phytosterol-Oxidationsprodukten über den Verzehr angereicherter Lebensmittel im Vergleich zum endogenen Hintergrund aus dem Verzehr von Lebensmitteln, die Phytosterole/-stanole

und ihre Ester als natürlich vorkommende Komponenten enthalten (zum Beispiel durch Verwendung Isotopen-markierter Phytosterole).

- Weitere Studien zu potentiell proatherogenen Effekten von Phytosterol-Oxidationsprodukten, die in *in vitro*- und in Tierexperimenten beobachtet wurden.
- Weitere Studien zum Vorkommen von Phytosterol-Oxidationsprodukten in Aortenklappengewebe, welches in Patienten mit starker Aortenstenose beobachtet wurde, um den potentiellen Zusammenhang zwischen Phytosterol-Oxidationsprodukten und kardiovaskulärem Risiko besser zu verstehen.
- Bestätigung von Hinweisen aus *in vitro*-Experimenten und Tierversuchen auf eine Reduktion der cholesterinsenkenden Eigenschaften von Phytosterolen nach deren Oxidation.

9 Referenzen

- (1) Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones P., Law, M. et al., *Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. Mayo Clin. Proc.* 2003, 78, 965–978.
- (2) Abumweis, S. S., Barake, R., Jones, P., *Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. Food Nutr. Res.* 2008, 52. doi:10.3402/fnr.v52i0.1811
- (3) Demonty, I., Ras, R. T., van der Knaap, H. C. M., Duchateau, G. S. M. J. E. et al., *Continuous Dose-Response Relationship of the LDL-Cholesterol-Lowering Effect of Phytosterol Intake. J Nutr* 2009, 139, 271–284.
- (4) *Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. O. J. L 43/1.*
- (5) SCF (Scientific Committee on Food). *Opinion of the Scientific Committee on Food on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. 2000. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out56_en.pdf (accessed: Apr 22, 2014)*
- (6) *Commission Decision of 24 July 2000 on authorising the placing on the market of ‘yellow fat spreads with added phytosterol esters‘ as a novel food or novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. (2000/500/EC) O.J. L 200/59*
- (7) EFSA (European Food Safety Authority). *Consumption of food and beverages with added plant sterols in the European Union. EFSA J.* 2008, 133, 1-21.

- (8) *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Anträge auf Zulassung neuartiger Lebensmittel gemäß Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 258/97; <http://www.bfr.bund.de/cm/343/140417-antraege-auf-zulassung-neuartiger-lebensmittel-gemaess-artikel-4-der-verordnung-eg-nr-258-97.pdf> (accessed Oct 16, 2014).*
- (9) *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Notifizierungen neuartiger Lebensmittel gemäß Artikel 5 der Verordnung (EG) Nr. 258/97; <http://www.bfr.bund.de/cm/343/notifizierungen-neuartiger-lebensmittel-gemaess-artikel-5-der-verordnung-eg-258-97.pdf> (accessed Oct 1, 2014)*
- (10) *Commission Regulation (EC) No 983/2009 of 21 October 2009 on the authorisation and refusal of authorisations of certain health claims made on food and referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. O. J. L. 27/3*
- (11) *Commission Regulation (EU) No 376/2010 of 3 May 2010 amending Regulation (EC) No 983/2009 on the authorisation and refusal of authorisations of certain health claims made on food and referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. O. J. L. 111/3*
- (12) *Derdemezis, C. S., Filippatos, T. D., Mikhailidis, D. P., Elisaf, M. S., Review Article: Effects of Plant Sterols and Stanols Beyond Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2010, 15, 120–134.*
- (13) *Hendriks, H. F. J., Brink, E. J., Meijer, G. W., Princen, H. M. G., Ntanios, F. Y., Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. Eur. J. Clin. Nutr. 2003, 57, 681–692.*
- (14) *SCF (Scientific Committee on Food). General view of the Scientific Committee on Food on the long-term effects of the intake of elevated levels of phytosterols from multiple dietary sources, with particular attention to the effects on β -carotene. 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out143_en.pdf (accessed Oct 16, 2014)*
- (15) *WHO (World Health Organization). Evaluation of Certain Food Additives. Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization Technical Report Series 952, 2009.*
- (16) *SKLM (2005). Beschluss der SKLM zum Einsatz von Phytosterolen und Phytosterylestern in Lebensmitteln vom 21. September 2001, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Lebensmittel und Gesundheit II, Sammlung der Beschlüsse und Stellungnahmen (1997-2004), Herausgegeben von der Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit Lebensmitteln, SKLM, Gerhard Eisenbrand (Vorsitzender), Mitteilung 7, pp 129-130, Wiley-VCH Verlag, Weinheim*

- (17) SKLM (2007) Eisenbrand, G., Einsatz von Phytosterinen in Lebensmitteln http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2007/sklm_phytosterine_07.pdf (accessed Oct 16, 2014)
- (18) EC (2004) Commission Regulation No 608/2004 of 31 March 2004 concerning the labelling of foods and food ingredients with added phytosterols, phytosterol esters, phytostanols and/or phytostanol esters. O. J. L. 97/44
- (19) Niemann, B., Sommerfeld, C., Hembeck, A., Bergmann, C., Plant sterol enriched foods as perceived by consumers. Project report on a joint project of consumer advice centres and BfR. BfR-Wissenschaft 05/2007, 2007.
- (20) Willems, J. I., Blommaert, M. A., Trautwein, E. A., Results from a post-launch monitoring survey on consumer purchases of foods with added phytosterols in five European countries. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 62, 48–53.
- (21) Lea, L., Hepburn, P., Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 9: Results of a European post-launch monitoring programme. *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44, 1213–1222.
- (22) Hearty, Á., Duffy, E., Joyce, J., O'Connor, C., Gibney, M. J., Phytosterol-enriched products on the Irish market: examination of intake and consumption patterns. *Public Health Nutr.* 2009, 12, 51.
- (23) Sioen, I., Matthys, C., Huybrechts, I., van Camp, J., de Henauw, S., Consumption of plant sterols in Belgium: consumption patterns of plant sterol-enriched foods in Flanders, Belgium. *Br. J. Nutr.* 2011, 105, 911–918.
- (24) Weingärtner, O., Bohm, M., Laufs, U., Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.* 2008, 30, 404–409.
- (25) Miettinen, T. A., Railo, M., Lepäntalo, M., Gylling, H., Plant Sterols in Serum and in Atherosclerotic Plaques of Patients Undergoing Carotid Endarterectomy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45, 1794–1801.
- (26) Helske, S., Miettinen, T., Gylling, H., Mayranpaa, M. et al., Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J. Lipid Res.* 2008, 49, 1511–1518.
- (27) Schött, H.-F., Luister, A., Husche, C., Schäfers, H.-J. et al., The relationships of phytosterols and oxyphytosterols in plasma and aortic valve cusps in patients with severe aortic stenosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 446, 805–810.
- (28) Kelly, E. R., Plat, J., Mensink, R. P., Berendschot, T. T., Effects of long term plant sterol and -stanol consumption on the retinal vasculature: A randomized controlled trial in statin users. *Atherosclerosis* 2011, 214, 225–230.

- (29) Lottenberg, A. M., Bombo, R. P., Ilha, A., Nunes, V. S. et al., Do clinical and experimental investigations support an antiatherogenic role for dietary phytosterols/stanols? *IUBMB Life* 2012, 64, 296–306.
- (30) Bombo, R. P., Afonso, M. S., Machado, R. M., Lavrador, M. S. F. et al., Dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice. *Atherosclerosis* 2013, 231, 442–447.
- (31) Lütjohann, D., Schött, H.-F., Plat, J., Invited commentary on the paper published by Bombo et al.: Dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice. *Atherosclerosis* 2014, 233, 157–159.
- (32) Zampelas, A., From the Maastricht meeting to the European Atherosclerosis Society Consensus on phytosterols/phytostanols: What is new of an old story?. *Atherosclerosis* 2014, 233, 357–358.
- (33) Martinen, M., Päivärinta, E., Storvik, M., Huikko, L. et al., Plant stanols induce intestinal tumor formation by up-regulating Wnt and EGFR signaling in *Apc^{Min}* mice. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 343–352.
- (34) Bjorkhem, I., Diczfalusy, U., Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 734–742.
- (35) Leonarduzzi, G., Sottero, B., Poli, G., Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 700–710.
- (36) Alemany, L., Barbera, R., Alegría, A., Laparra, J., Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat? *Food Chem. Toxicol.* 2014, 69, 140-9.
- (37) Brown, A. J., Jessup, W., Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, 142, 1–28.
- (38) Meynier, A., Andre, A., Lherminier, J., Grandgirard, A., Demaison, L., Dietary oxysterols induce in vivo toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *Eur.J. Nutr.* 2005, 44, 393–405.
- (39) Staprans, I., Pan, X.-M., Rapp, J. H., Feingold, K. R., The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 1075–1082.
- (40) Ng, C. H., Qiang Yao, X., Huang, Y., Chen, Z.-Y., Oxidised cholesterol is more hypercholesterolaemic and atherogenic than non-oxidised cholesterol in hamsters. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 749-755.
- (41) Soto-Rodríguez, I., Campillo-Velázquez, P. J., Alexander-Aguilera, A., Rodríguez-Estrada, M. T. et al., Biochemical and histopathological effects of dietary oxidized cholesterol in rats. *J. Appl. Toxicol.* 2009, 29, 715–723.

- (42) Sasaki, T., Fujikane, Y., Ogino, Y., Osada, K., Sugano, M., *Hepatic Function and Lipid Metabolism Are Modulated by Short-term Feeding of Cholesterol Oxidation Products in Rats*. *J. Oleo Sci.* 2010, 59, 503–507.
- (43) Sato, K., Nakano, K., Katsuki, S., Matoba, T. et al., *Dietary Cholesterol Oxidation Products Accelerate Plaque Destabilization and Rupture Associated with Monocyte Infiltration/Activation via the MCP-1-CCR2 Pathway in Mouse Brachiocephalic Arteries: Therapeutic Effects of Ezetimibe*. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012, 19, 986–998.
- (44) Soto-Rodríguez, I., Alexander-Aguilera, A., Zamudio-Pérez, A., Camara-Contreras, M. et al., *Alteration of Some Inflammatory Biomarkers by Dietary Oxysterols in Rats*. *Inflammation* 2012, 35, 1302–1307.
- (45) Terunuma, S., Kumata, N., Osada, K., *Ezetimibe Impairs Uptake of Dietary Cholesterol Oxidation Products and Reduces Alterations in Hepatic Cholesterol Metabolism and Antioxidant Function in Rats*. *Lipids* 2013, 48, 587–595.
- (46) ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) *Phytosterol esters: extension of use. June 2013: Application from Unilever to extend the use of phytosterol esters under the Novel Foods Regulation (EC) 258/97. Under evaluation.* <http://acnfp.food.gov.uk/assess/fullapplicants/phytosterol> (accessed Oct 16, 2014)
- (47) Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D. et al., *Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge*. *Prog. Lipid Res.* 2008, 47, 37–49.
- (48) Ryan, E., McCarthy, F., Maguire, A., O'Brien, N., *Phytosterol Oxidation Products: Their Formation, Occurrence, and Biological Effects*. *Food Revs. Int.* 2009, 25, 157–174.
- (49) Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., *Oxysterols: A world to explore*. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 3289–3303.
- (50) García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M. T., *Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food*. *Chem. Phys. Lipids* 2011, 164, 607–624.
- (51) Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H., Pettersson, H., Lütjohann, D., *Plant sterol oxidation products – Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin?* *Biochimie* 2013, 95, 464–472.
- (52) O'Callaghan, Y., McCarthy, F. O., O'Brien, N. M., *Recent advances in Phytosterol Oxidation Products*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 446, 786–791.
- (53) Dutta, P. C., in Dutta, P. C. (Ed.) *Chemistry, Analysis, and Occurrence of Phytosterol Oxidation Products in Foods*, Marcel Dekker, Inc.: New York; Basel, 2004, pp. 397–417.

- (54) Guardiola, F., Bou, R., Boatella, J., Codony, R., Analysis of Sterol Oxidation Products in Foods. *J AOAC Int* 2004, 87, 441–467.
- (55) Oehrl, L. L., Hansen, A. P., Rohrer, C. A., Fenner, G. P., Boyd, L. C., Oxidation of phytosterols in a test food system. *J Am Oil Chem Soc* 2001, 78, 1073–1078.
- (56) Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.-M., Piironen, V., Effects of Sterol Structure, Temperature, and Lipid Medium on Phytosterol Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6485–6491.
- (57) Barriuso, B., Otaegui-Arazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I., Ansorena, D., Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chem.* 2012, 135, 706–712.
- (58) Rudzińska, M., Przybylski, R., Wąsowicz, E., Products Formed During Thermo-oxidative Degradation of Phytosterols. *J Am Oil Chem Soc* 2009, 86, 651–662.
- (59) Lampi, A.-M., Kemmo, S., Mäkelä, A., Heikkinen, S., Piironen, V., Distribution of monomeric, dimeric and polymeric products of stigmasterol during thermo-oxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009, 111, 1027–1034.
- (60) Rudzińska, M., Przybylski, R., Zhao, Y. Y., Curtis, J. M., Sitosterol Thermo-oxidative Degradation Leads to the Formation of Dimers, Trimers and Oligomers: A Study Using Combined Size Exclusion Chromatography/Mass Spectrometry. *Lipids* 2010, 45, 549–558.
- (61) Struijs, K., Lampi, A.-M., Ollilainen, V., Piironen, V., Dimer formation during the thermo-oxidation of stigmasterol. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 853–863.
- (62) Sosińska, E., Przybylski, R., Hazendonk, P., Zhao, Y. Y., Curtis, J. M., Characterization of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol. *Food Chem.* 2013, 139, 464–474.
- (63) Sosińska, E., Przybylski, R., Aladedunye, F., Hazendonk, P., Spectroscopic characterisation of dimeric oxidation products of phytosterols. *Food Chem.* 2014, 151, 404–414.
- (64) Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Piironen, V., Lampi, A.-M., Determination of non-polar and mid-polar monomeric oxidation products of stigmasterol during thermo-oxidation. *Food Chem.* 2010, 122, 277–284.
- (65) Yanishlieva, N., Marinova, E., Autoxidation of sitosterol. I: Kinetic studies on free and esterified sitosterol. *Riv. Ital. Sostanze Gr.* 1980, 57, 477–480.
- (66) Yanishlieva-Maslarova, N., Schiller, H., Seher, A., Die Autoxidation von Sitosterin III Sitosterylstearat. *Fett Wiss. Technol.* 1982, 84, 308–311.
- (67) Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.-M., Piironen, V., Esterification affects phytosterol oxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 2005, 107, 107–118.

- (68) Lehtonen, M., Kemmo, S., Lampi, A.-M., Piironen, V., *Effects of esterification on the formation and decomposition of steryl hydroperoxides. Eur. Food Res. Technol.* 2011, 232, 255–264.
- (69) Lehtonen, M., Lampi, A.-M., Agalga, F., Struijs, K., Piironen, V., *The effects of acyl moiety and temperature on the polymerization of sterols. Eur J Lipid Sci Technol* 2011, 114, 677–686.
- (70) Lehtonen, M., Lampi, A.-M., Ollilainen, V., Struijs, K., Piironen, V., *The role of acyl moiety in the formation and reactions of steryl ester hydroperoxides. Eur. Food Res. Technol.* 2011, 233, 51–61.
- (71) Lehtonen, M., Lampi, A.-M., Riuttamäki, M.-A., Piironen, V., *Oxidation reactions of steryl esters in a saturated lipid matrix. Food Chem.* 2012, 134, 2030–2039.
- (72) Julien-David, D., Zhao, M., Geoffroy, P., Miesch, M. et al., *Analysis of sitosterol oleate esters in phytosterols esters enriched foods by HPLC–ESI-MS². Steroids* 2014, 84, 84–91.
- (73) Bortolomeazzi, R., Cordaro, F., Pizzale, L., Conte, L. S., *Presence of Phytosterol Oxides in Crude Vegetable Oils and Their Fate during Refining. J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2394–2401.
- (74) Johnsson, L., Dutta, P. C., *Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. Food Chem.* 2006, 97, 606–613.
- (75) Dutta, P. C., *Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. J Am Oil Chem Soc* 1997, 74, 659–666.
- (76) Tabea, E., Jägerstad, M., Dutta, P. C., *Lipids and phytosterol oxidation products in commercial potato crisps commonly consumed in Sweden. Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 745–755.
- (77) Dutta, P. C., Appelqvist, L.-Å., *Studies on phytosterol oxides. I: Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. J Am Oil Chem Soc* 1997, 74, 647–657.
- (78) Zunin, P., Calcagno, C., Evangelisti, F., *Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. J. Dairy Res.* 1998, 65, 591–598.
- (79) García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M. T., Lagarda, M. J. et al., *Sterol Oxidation in Ready-to-Eat Infant Foods During Storage. J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 469–475.
- (80) Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodríguez-Estrada, M. T. et al., *Levels of Phytosterol Oxides in Enriched and Nonenriched Spreads: Application of a Thin-Layer Chromatography–Gas Chromatography Methodology. J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7844–7850.

- (81) EFSA. *Draft Scientific Opinion on Acrylamide in Food*. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) <http://www.efsa.europa.eu/de/consultationsclosed/call/140701.pdf> (accessed Oct 16, 2014).
- (82) EFSA. *The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database* <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm> (accessed Oct 16, 2014).
- (83) Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., *Stability of Sterols in Phytosterol-Enriched Milk under Different Heating Conditions*. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 9997–10002.
- (84) Grandgirard, A., Martine, L., Joffre, C., Juaneda, P., Berdeaux, O., *Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food*. *J Chromatogr A* 2004, 1040, 239–250.
- (85) Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.-M., Piironen, V., *Oxidative stability of phytosterols in some food applications*. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 266–273.
- (86) Unilever Research and Development. *Multi-Purpose Vegetable Fat Spreads and Liquid Vegetable Fat Based Emulsions with Added Plant Sterol esters for Cooking and Baking Applications (PS-Spreads/Liquids for CB)*. <http://acnfp.food.gov.uk/assess/fullapplics/phytosterol> (accessed Oct 16, 2014)
- (87) Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.-M., Piironen, V., *Pan-frying may induce phytosterol oxidation*. *Food Chem.* 2007, 101, 286-297.
- (88) Botelho, P. B., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M. et al., *Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate*. *LWT - Food Sci. Technol.* 2014, 55, 444–451.
- (89) Rudzińska, M., Przybylski, R., Wąsowicz, E., *Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines*. *Food Chem.* 2014, 142, 294–298.
- (90) Kuhlmann, K., Lindtner, O., Bauch, A., Ritter, G. et al., *Simulation of prospective phytosterol intake in Germany by novel functional foods*. *Br. J. Nutr.* 2005, 93, 377-385.
- (91) Grandgirard, A., Sergiel, J.-P., Nour, M., Demaison-Meloche, J., Gihès, C., *Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats*. *Lipids* 1999, 34, 563–570.
- (92) Tomoyori, H., Kawata, Y., Higuchi, T., Ichi, I. et al., *Phytosterol Oxidation Products Are Absorbed in the Intestinal Lymphatics in Rats but Do Not Accelerate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 134, 1690–1696.

- (93) Grandgirard, A., Demaison-Meloche, J., Cordelet, C., Demaison, L., Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004, 44, 599–608.
- (94) Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y. et al., Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2011, 219, 124–133.
- (95) Plat, J., Brzezinka, H., Lütjohann, D., Mensink, R. P., von Bergmann, K., Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 2001, 42, 2030–2038.
- (96) Grandgirard, A., Martine, L., Demaison, L., Cordelet, C. et al., Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 2004, 91, 101-106.
- (97) Menéndez-Carreño, M., García-Herreros, C., Astiasarán, I., Ansorena, D., Validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. *J Chromatogr B* 2008, 864, 61–68.
- (98) Menéndez-Carreño, M., Steenbergen, H., Janssen, H.-G., Development and validation of a comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of phytosterol oxidation products in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 2012, 402, 2023–2032.
- (99) Husche, C., Weingärtner, O., Pettersson, H., Vanmierlo, T. et al., Validation of an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry method for analysis of 7-oxygenated campesterol and sitosterol in human serum. *Chem. Phys. Lipids* 2011, 164, 425–431.
- (100) Baumgartner, S., Mensink, R. P., Husche, C., Lütjohann, D., Plat, J., Effects of plant sterol- or stanol-enriched margarine on fasting plasma oxyphytosterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2013, 227, 414–419.
- (101) Baumgartner, S., Mensink, R. P., Hartog, G. d., Bast, A. et al., Oxyphytosterol formation in humans: Identification of high vs. low oxidizers. *Biochem. Pharmacol.* 2013, 86, 19–25.
- (102) Aringer, L., Eneroth, P., Studies on the formation of C7-oxygenated cholesterol and β -sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *J. Lipid Res.* 1973, 14, 563–572.
- (103) Aringer, L., Eneroth, P., Formation and metabolism in vitro of 5,6-epoxides of cholesterol and β -sitosterol. *J. Lipid Res.* 1974, 15, 389–398.
- (104) Aringer, L., Eneroth, P., Nordström, L., Side chain hydroxylation of cholesterol, campesterol, and β -sitosterol in rat liver mitochondria. *J. Lipid Res.* 1976, 17, 263–272.
- (105) Subbiah, M., Kuksis, A., Oxidation of 4-¹⁴C-Sitosterol by mitochondria of rat liver and testes. *Fed. Proc.* 1969, 28, 515.

- (106) Hwang, K., Kelsey, M., Evidence of epoxide hydrase activity in human intestinal microflora. *Cancer Biochem. Biophys.* 1978, 70, 31–35.
- (107) Fioriti, J. A., Kanuk, M. J., George, M., Sims, R. J., Metabolic Fate of Epoxycholesterol in the Rat. *Lipids* 1970, 5, 71–75.
- (108) Lea, L., Hepburn, P., Wolfreys, A., Baldrick, P., Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 771–783.
- (109) Koschutnig, K., Kemmo, S., Lampi, A.-M., Piironen, V. et al., Separation and isolation of β -sitosterol oxides and their non-mutagenic potential in the Salmonella microsome assay. *Food Chem.* 2010, 118, 133–140.
- (110) Abramsson-Zetterberg, L., Svensson, M., Johnsson, L., No evidence of genotoxic effect in vivo of the phytosterol oxidation products triols and epoxides. *Toxicol. Lett.* 2007, 173, 132–139.
- (111) Adcox, C., Boyd, L., Oehrl, L., Allen, J., Fenner, G., Comparative Effects of Phytosterol Oxides and Cholesterol Oxides in Cultured Macrophage-Derived Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2090–2095.
- (112) Maguire, L., Konoplyannikov, M., Ford, A., Maguire, A. R., O'Brien, N. M., Comparison of the cytotoxic effects of β -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 β -hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *Br. J. Nutr.* 2003, 90, 767-775.
- (113) O'Callaghan, Y. C., Foley, D. A., O'Connell, N. M., McCarthy, F. O. et al., Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Oxidized Derivatives of Stigmasterol in the U937 Human Monocytic Cell Line. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 10793–10798.
- (114) O'Callaghan, Y., Kenny, O., O'Connell, N. M., Maguire, A. R. et al., Synthesis and assessment of the relative toxicity of the oxidised derivatives of campesterol and dihydrobrassicasterol in U937 and HepG2 cells. *Biochimie* 2012, 95, 496-503.
- (115) Vejux, A., Montange, T., Martine, L., Zarrouk, A. et al., Absence of Oxysterol-like Side Effects in Human Monocytic Cells Treated with Phytosterols and Oxyphytosterols. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 4060–4066.
- (116) Alemany, L., Laparra, J., Barberá, R., Alegría, A., Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 56, 247-53.
- (117) Meyer, W., Jungnickel, H., Jandke, M., Dettner, K., Spiteller, G., On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* 1998, 47, 789–797.
- (118) Yang, C., Chen, Z. Y., Wong, S. L., Liu, J. et al., β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovasc. Res.* 2013, 97, 520–532.

- (119) *Plat, J., Theuwissen, E., Husche, C., Lütjohann, D. et al., Oxidised plant sterols as well as oxysterols increase the proportion of severe atherosclerotic lesions in female LDL receptor+/- mice. Br. J. Nutr. 2014, 111, 64–70.*
- (120) *Julien-David, D., Ennahar, S., Miesch, M., Geoffroy, P. et al., Effects of oxidation on the hydrolysis by cholesterol esterase of sitosterol esters as compared to a cholesteryl ester. Steroids 2008, 74, 832–836.*