

## الگوی اسیدهای چرب و میزان ایزومرهای ترانس در کره‌های گیاهی موجود در بازار ایران (زمستان 1381)

دکتر شهلا میرزایی\*؛ امیر کیانی\*\*؛ دکتر عباس شیخ الاسلامی\*\*\*؛ دکتر غلامرضا بهرامی\*\*\*\*

### چکیده :

**سابقه و هدف :** اسیدهای چرب مهم‌ترین جزء ساختمانی چربی‌ها محسوب می‌شوند که انواع آن‌ها آثار متفاوتی بر لیپوپروتئین‌های سرم و در نتیجه بر بیماری‌های عروق کرونر (CAD) دارند. اسیدهای چرب ترانس باعث کاهش HDL و افزایش LDL می‌شود و اگر نسبت LDL/HDL مد نظر قرارگیرد، تأثیرات مضر اسیدهای چرب ترانس بیش از انواع اشباع ارزیابی می‌شود. با توجه به این که کره‌های گیاهی، اخیراً تولید و با هدف کاهش مصرف چربی‌های اشباع وارد بازار ایران شده‌اند، مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی اسیدهای چرب و میزان ایزومرهای ترانس در کره‌های گیاهی موجود در بازار ایران طراحی شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه به روش توصیفی بر روی 6 نمونه کره گیاهی موجود در بازار ایران انجام شد. پس از استخراج چربی نمونه‌ها و صابونی کردن اسیدهای چرب آن‌ها، عمل مشتق‌سازی اسیدهای چرب توسط 2- نیتروفنیل‌هیدرازید انجام گرفت. آنالیز مشتق حاصله توسط روش کروماتوگرافی مایع با کفایت بالا انجام شد. درصد هریک از اسیدهای چرب تعیین و برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین اسیدهای چرب ترانس در کره‌های گیاهی 24 درصد و میانگین مجموع اسیدهای چرب ترانس و اشباع 51/2 درصد بوده و در برخی نمونه‌ها بیش از 60 درصد بوده است. حداقل مجموع اسیدهای چرب ترانس و اشباع مربوط به کره گیاهی مهگل (44/1 درصد) و حداکثر آن مربوط به کره گیاهی شونیز (60/1 درصد) بود.

**بحث:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در کره‌های گیاهی موجود در بازار ایران مقادیر قابل توجهی اسید چرب ترانس و اشباع وجود دارد که باعث ایجاد اثر سوء بر لیپوپروتئین‌های سرم می‌شود. مقایسه این مقادیر با اطلاعات منتشر شده در مورد مارگارین‌های موجود در کشورهای دیگر نشان می‌دهد که مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس در کره‌های گیاهی مطالعه حاضر بیشتر است. این پژوهش بر لزوم اصلاح پروسه تولید کره‌های گیاهی و حذف تبلیغات غلط در مورد این فرآورده‌ها تأکید دارد.

**کلیدواژه‌ها:** اسیدهای چرب، اسیدهای چرب ترانس، اسیدهای چرب اشباع، کره‌های گیاهی، بیماری‌های عروق کرونر.

«دریافت: 1382/4/3 پذیرش: پاییز 1383»

\* کارشناس دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه.

\*\* کارشناس مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه. \*\*\*دکترای داروسازی.

\*\*\*\* دانشیار فارماکولوژی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه.

\*\*\*\*\* عهده دار مکاتبات : کرمانشاه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی،

## مقدمه:

اولئیک اسید مانند زیتون و کانولا (کلزا) از این نظر مفیدترین اثر را دارند و بدون تأثیر در HDL کلسترول تنها باعث کاهش LDL می‌شوند (8-12).

در جریان هیدروژناسیون روغن‌های مایع مقادیر متفاوتی ایزومر غیرطبیعی ترانس اسیدهای چرب به وجود می‌آید. مهم‌ترین اسیدچرب ترانس به وجود آمده در این فرایند اسیدالائیدیک و نیز اسیدلینولائیدیک می‌باشد. در سال 1990 اولین گزارش در مورد تأثیرات سوء اسیدهای چرب ترانس منتشر شد (13) و از آن تاریخ مطالعات متابولیک و اپیدمیولوژیک متعددی این تأثیرات سوء را ثابت کرده‌اند (14-21). در تحقیقات متابولیک اولیه تأثیرات بالابرنده کلسترول اسیدهای چرب ترانس کمتر از ترکیبات اشباع بود (22). مطالعات تکمیلی بعدی نشان داد اگرچه اسیدهای چرب اشباع و ترانس هر دو به یک اندازه باعث افزایش LDL کلسترول می‌شوند، اما اسیدهای چرب ترانس، HDL کلسترول را نیز کاهش می‌دهند (13)؛ در نتیجه مصرف چربی‌های ترانس نسبت به چربی‌های اشباع بیشتر باعث افزایش نسبت LDL/HDL می‌شود و اثر مضر اسیدهای چرب ترانس خالص حداقل دو برابر نوع اشباع است (23). این یافته‌ها در مطالعات متعددی تأیید شده است (14-21). برخلاف چربی‌های اشباع افزایش لیپوپروتئین A [LP(a)] توسط چربی‌های ترانس در مطالعات زیادی نشان داده شده است (15-19، 21، 24-26). با وجود این، در مطالعات اپیدمیولوژیک متعدد نشان داده شده که میزان افزایش احتمال CAD با چربی‌های ترانس بیشتر از میزانی است که از روی تأثیر مضر در لیپوپروتئین‌ها پیش‌بینی می‌شود (27). از سال 1999

چربی‌ها از جمله کره یکی از اقلام اصلی مصرفی روزانه هستند. نوع اسیدهای چرب و نیز میزان کلسترول موجود در کره، تعیین‌کننده تأثیر مصرف این فرآورده بر لیپوپروتئین‌های سرم و در نتیجه بیماری‌های عروق کرونر (CAD) می‌باشد (1). مصرف کلسترول که عمدتاً در چربی‌های حیوانی یافت می‌شود باعث افزایش کلسترول پلاسما می‌شود، هرچند که اثر سوء کلسترول در این خصوص کمتر از مصرف اسیدهای چرب اشباع گزارش شده است (2 و 3). طی چند دهه گذشته، کاهش مصرف چربی عمده‌ترین توصیه تغذیه‌ای برای کاهش احتمال ابتلا به CAD بوده است (2 و 3)، اما مطالعات زیادی اخیراً نشان داده که نوع چربی مصرفی اهمیت بیشتری نسبت به مقدار چربی مصرف شده دارد (4). در حالی که اسیدهای چرب اشباع با زنجیر کوتاه و متوسط از نظر تأثیر در لیپوپروتئین‌ها دارای اثرات خنثی هستند، انواع اسیدهای چرب اشباع زنجیر بلند باعث افزایش LDL کلسترول و احتمال ابتلا به CAD می‌شوند (5 و 6). در مطالعات مختلف انواع اسیدهای چرب اشباع نیز تأثیرات متفاوتی در این خصوص نشان داده‌اند، مشخصاً اسیدهای چرب اشباع با 12-16 اتم کربن و به‌ویژه میریستیک اسید (14:C) بیشترین اثر سوء را در این ارتباط نشان داده و شواهد موجود حاکی از اثر سوء کمتر اسید استئاریک (18:C) است (7). اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه مثل اسید لینولئیک که در روغن آفتابگردان و ذرت یافت می‌شود، باعث کاهش LDL و HDL هر دو می‌شوند. روغن‌های سرشار از

فراورده‌هایی به کار برده شود که مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس آن‌ها در هر نوبت مصرف (Serving Size) از 2 گرم تجاوز نکند.

در کشور ما چند سالی است که کره‌های گیاهی تولید می‌شود و با توجه به تبلیغات وسیعی که به‌ویژه در مورد آثار مضر کمتر این فراورده‌ها بر لیوپروتئین‌های پلازما و در نتیجه بر بیماری‌های عروق کرونر می‌شود، مصرف روزافزونی یافته‌اند. نظر به این‌که در ساخت و فرمولاسیون این فراورده‌ها از روش‌های مختلفی استفاده شده و مقادیر متفاوتی روغن هیدروژنه در آن‌ها به کار می‌رود، تحقیق حاضر با هدف شناخت الگوی اسیدهای چرب و تعیین مقدار اسیدهای چرب ترانس موجود در آن‌ها طراحی گردید.

### مواد و روش‌ها:

این مطالعه به روش توصیفی و در روی 6 نمونه کره گیاهی موجود در بازار ایران انجام گرفت. نمونه‌ها به صورت تصادفی از بازار جمع آوری شد. پس از به هم زدن و یکنواخت نمودن نمونه‌ها یک گرم از هر نمونه برداشته شد و چربی تام آن به روش Folch (38) استخراج گردید. چربی استخراج شده توسط پتاس الکی در طول دوازده ساعت صابونی شد و مشتق آن‌ها توسط 2- نیتروفنیل هیدرازید تهیه گردید. آنالیز همزمان اسیدهای چرب توسط روش HPLC (کروماتوگرافی با کفایت بالا) (مدل LC10AD) انجام گرفت (39). در این آنالیز از مجموعه متانول-آب به عنوان فاز متحرک و ستون ODS (150mm\*6mm) به عنوان فاز ثابت استفاده شد.

FDA اعلام نموده که میزان اسیدهای چرب ترانس باید در برجسب مواد غذایی درج شود (28). در مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی نیز رابطه مثبت بین مصرف اسیدهای چرب ترانس یا اشباع با CAD گزارش شده است (29-36). اما تأثیرات سوء چربی‌های ترانس بیش از اشباع بوده است. کاهش 5 درصد دریافت انرژی از اسیدهای چرب اشباع باعث کاهش حدود 42 درصد در میزان CAD شده است، در حالی که کاهش میزان خطر CAD برای 2 درصد تغییر در دریافت چربی‌های ترانس 53 درصد بوده است (35). طبق گزارش مطالعه جامع منتشر شده در سال 2001، هنگامی که میزان دریافت انرژی از اسیدهای چرب ترانس از 4/3 درصد به 1/9 درصد کاهش یابد، علاوه بر کاهش 50 درصد در میزان CAD، مرگ و میر ناشی از بیماری نیز حدود 23 درصد کاهش می‌یابد (36). توصیه می‌شود تعویض اسیدهای چرب اشباع و ترانس با روغن‌های سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع با یک باند دوگانه در کاهش احتمال ابتلا به CAD بسیار مؤثرتر از کاهش میزان مصرف چربی خواهد بود (4). همچنین مصرف اسیدهای چرب ترانس در ابتلاء به دیابت تیپ 2 مؤثر شناخته شده است (37). کره‌های گیاهی به دلیل آنکه منشأ گیاهی دارند، فاقد کلسترول هستند و با هدف حذف تأثیرات مضر کلسترول عرضه شده‌اند، اما با توجه به این‌که تأثیر نوع اسیدهای چرب مصرفی بر لیوپروتئین‌های سرم بیش از کلسترول می‌باشد (4)، از سال 1999 FDA اعلام نمود که در برجسب‌گذاری فراورده‌ها باید نوع اسیدهای چرب نیز مد نظر قرار گیرد و اصطلاح عاری از کلسترول فقط برای

هستند و جدول 2- درصد مجموع اسیدهای چرب اشباع و

ترانس در نمونه‌های مورد آزمایش

مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس	مجموع اسیدهای چرب ترانس	مجموع اسیدهای چرب اشباع	پارامتر / نوع کره
49/4	22	27/4	مهیا
44/4	17/4	27	مهگل
49/6	19/4	30/2	اطلس طلایی
60/1	33/7	26/4	شونیز
54	25/3	28/7	لنکا
49/8	26/2	23/6	پامچال
51/2±5/3	24/0±5/8	27/2±6/0	جمع کل (X±SD)

میزان مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس در نمونه‌ها 45-60 درصد می‌باشد. حداقل مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس مربوط به نمونه مهگل (44/4 درصد) و حداکثر آن در نمونه شونیز (60/1 درصد) بوده است.

نسبت متانول به آب در ابتدای آنالیز برابر 29:71 بود و به صورت گرادیان غلظت به 5-95 تغییر یافت. دمای ستون در 62 درجه سانتی‌گراد (توسط column oven مدل CTO-10A) تثبیت شد و سیگنال‌ها از طریق ردیاب UV-VIS که در طول موج آنالیز 371 نانومتر تنظیم شده بود، اندازه‌گیری شدند. زمان انجام هر آنالیز حدود 20 دقیقه بود. از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها استفاده شد.

### یافته‌ها:

درصد هر یک از اسیدهای چرب در نمونه‌های مختلف به همراه میانگین و انحراف معیار مربوطه در جدول 1 نشان داده شده است. جدول 2 مجموع اسیدهای چرب، ترانس و جمع اسیدهای چرب اشباع و ترانس را برای نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌گونه که در این جداول مشخص است کره‌های گیاهی حاوی 18-34 درصد اسیدهای چرب ترانس و 24-31 درصد اسید چرب اشباع

جدول 1- درصد اسیدهای چرب مختلف در نمونه‌های مورد آزمایش .

سایر موارد	C:20	C:18	C:18(1t)	C:18(1)	C:16	C:18(2t)	C:18(2)	C:18(3)	C:14	C:12	C:10	C:8	C:6	اسید چرب / نوع کره
6/4	0/6	8/8	21/3	32/2	16/9	0/7	9/3	0	1/1	0/5	0/4	0/4	1/4	مهیا
5/4	0	7/9	15/7	28/3	18/1	1/7	19/4	0	1	0/5	0/3	0/4	1/3	مهگل
7/1	0/8	8/3	19/4	25/4	20/1	0	15/8	0	1	0/4	0/3	0/4	1	اطلس طلایی
4	0	13/3	32/6	28/3	13/1	1/1	7/6	0	0	0	0	0	0	شونیز
4/9	0/8	11/6	24/7	33/2	16/3	0/6	7/9	0	0	0	0	0	0	لنکا
5/7	0	10	25	25/5	12/5	1/2	19	0	1/1	0	0	0	0	پامچال
5/6±1/09	0/4±0/41	10±2/11	23/1±5/80	28/8±3/28	16/2±2/92	0/9±0/58	13/2±5/54	0	0/7±0/54	0/2±0/26	0/2±0/19	0/2±0/22	0/6±0/69	جمع کل (X±SD)

## بحث :

کنترل شده متعددی نشان داده است که تعویض اسیدهای چرب اشباع و ترانس با اسیدهای چرب غیر اشباع در کاهش میزان LDL کلسترول سرم و نیز خطر CAD بسیار مؤثرتر از کاهش میزان مصرف چربی است (4). به صورت سنتی توصیه شده است که بیشتر از 30 درصد دریافت انرژی از طریق مصرف چربی صورت نگیرد، اما از سال 2000 انجمن قلب آمریکا به سوی حذف سقف 30 درصد گام برداشته و توصیه نموده است که به منظور کاهش احتمال ابتلای به CAD به جای کاهش مصرف چربی باید اسیدهای چرب اشباع و ترانس با انواع غیر اشباع تعویض گردد (4).

اطلاعات موجود نشان می دهد که مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس در انواع مارگارین های موجود در آمریکا 70-25 درصد مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس در کره های حیوانی است (40)، در حالی که این مجموع در مارگارین های موجود در ایران به 130 درصد نیز می رسد. بر طبق اعلام FDA و انجمن ملی تولیدکنندگان مارگارین آمریکا با توجه به این که تأثیرات مضر اسیدهای چرب اشباع و ترانس بیش از مصرف کلسترول است (4)، برچسب عاری از کلسترول فقط در مورد فرآورده هایی مجاز است که مجموع اسیدهای چرب اشباع و ترانس آنها در هر وعده مصرف از 2 گرم کمتر باشد، در حالی که این میزان در نمونه های ما بسیار بیشتر می باشد.

تبلیغات مختلف در مورد مارگارین های گیاهی بر عاری بودن از کلسترول و فقدان تأثیرات مضر این فرآورده ها در لیپوپروتئین های سرم تأکید می نماید و این امر منجر به تشویق مصرف این فرآورده ها

مطالعه حاضر نشان داد که کره های گیاهی موجود در بازار ایران حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب اشباع و ترانس هستند. با توجه به این که هدف از فرمولاسیون و تولید مارگارین به جای کره، کاهش عرضه چربی های اشباع به بدن و در نتیجه تأثیرات سوء کمتر لیپوپروتئین های سرم است، این مطالعه نشان می دهد در مقایسه با اطلاعات موجود در مورد ترکیب اسیدهای چرب در انواع مارگارین (40)، کره های گیاهی موجود در ایران حاوی مقادیر زیادتری اسیدهای چرب اشباع و ترانس هستند که مصرف آنها آثار مضر بیشتری بر لیپوپروتئین های پلاسما اعمال می کند. با توجه به این که مقدار اسیدهای چرب ترانس در کره های حیوانی بسیار اندک بوده و میزان چربی های اشباع در آنها حدود 45 درصد است (41)، حتی اگر تأثیرات مضر اسیدهای چرب ترانس و اشباع یکسان فرض شود، می توان نتیجه گرفت که مصرف کره های گیاهی موجود در ایران در مقایسه با کره های حیوانی عوارض بیشتری ایجاد می کند. کلسترول و اسیدهای چرب دو جزء عمده لیپیدها هستند. در تحقیقات متابولیک انجام گرفته در انسان مصرف کلسترول منجر به افزایش LDL کلسترول می شود، اما این افزایش در مقایسه با افزایش حاصل از مصرف اسیدهای چرب اشباع کوچک است (4). اطلاعات روزافزون حاکی از تأثیر بیشتر نوع چربی مصرفی بر CAD نسبت به مقدار مصرف چربی می باشد و این مطلب در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیاری نشان داده شده است (4، 42-44). کارآزمایی های بالینی

می‌شود، در حالی که معیارهای FDA یعنی میزان کلسترول و درصد اسیدهای چرب اشباع و ترانس نشان می‌دهد که مضرات مصرف مارگارین‌های گیاهی موجود در ایران از کره‌های حیوانی بیشتر است. این مطالعه لزوم اصلاح فرمولاسیون مارگارین و جلوگیری از هر گونه تبلیغ غلط در مورد این فرآورده‌ها را توصیه می‌نماید.

#### References:

1. Gurr M, Harwood GL. Lipid biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1991, P. 65-68.
2. Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP. The spread of the obesity epidemic in the United States 1991-1998. JAMA 1999; 282: 1519-1522.
3. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, Marks JS. Diabetes trends in the US, 1990-1998. Diabetes Care 2000; 23:1278-1283.
4. Hu FB, Manson JE, Willett WC. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. J Am Coll Nutr 2001; 20(1):5-19.
5. McGee DL, Reed DM, Yano K, Kagan A, Tillotson J. Ten-year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program: relationship to nutrient intake. Am J Epidemiol 1984; 119:667-676.
6. Kushi LH, Lew RA, Stare FJ, Ellison CR, El Lozy M, Bourke G, et al. Diet and 20-year mortality from coronary heart disease: the Ireland-Boston Diet-Heart study. N Engl J Med 1985; 312:811-818.
7. Kris-Etherton P, Yu S. Individual fatty acids on plasma lipids and lipoproteins: human studies. Am J Clin Nutr 1997; 65(Suppl): 1628S-1644S.
8. Grundy SM, Bilheimer D, Blackburn H, Brown WV, Kwiterovich POJ, Mattson F, et al. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association, report of nutrition committee. Circulation 1982; 65: 839A-854A.
9. Sacks F. Dietary fats and coronary heart disease, overview. J Cardiovasc Risk 1994; 1: 3-8.
10. Dolecek TA. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200:177-182.
11. Keys A, Parlin RW. Serum - cholesterol response to changes in dietary lipids. Am J Clin Nutr 1966; 19: 175-181.
12. Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. Am J Clin Nutr 1965 ; 17: 281-295.

13. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990; 323:439-445.
14. Zock PL, Katan MB. Hydrogenation alternatives: effects of trans fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. *J Lipid Res* 1992; 33: 399-410.
15. Nestel P, Noakes M, Belling B, et al. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res* 1992; 33:1029-1036.
16. Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J, Sunkin ME, Podczasy JJ. Dietary trans fatty acids: effects of plasma lipids and lipoproteins on healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:861-868.
17. Judd J, Baer D, Clevidence B, et al. Blood lipid and lipoprotein modifying effects of trans monounsaturated fatty acids compared to carbohydrate, oleic acid, stearic acid, and C 12:0-16:0 saturated fatty acids in men fed controlled diets. *FASEB J* 1998; 12: A229-A229.
18. Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Jenner JL, Ordovas JM, Schaefer EJ. Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans: hydrogenation, trans fatty acids, and plasma lipids. *Atheroscler Thromb* 1993; 13:154-61.
19. Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1419-1426.
20. Sundram K, Ismail A, Hayes KC, Jeyamalar R, Pathmanathan R. Trans (elaidic) fatty acids adversely affect the lipoprotein profile relative to specific saturated fatty acids in humans. *J Nutr* 1997; 127:514S-520S.
21. Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Schaefer EJ. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N Engl J Med* 1999; 340:1933-1940.
22. Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutr* 1995; 15:473-493.
23. Willett WC, Ascherio A. Trans fatty acids: Are the effects only marginal. *Am J Public Health* 1994; 84: 722-724.

24. Almendingen K, Jordal O, Kierulf P, Sandstad B, Pedersen JI. Effects of partially hydrogenated fish oil, partially hydrogenated soybean oil, and butter on serum lipoproteins and Lp[a] in men. *J Lipid Res* 1995; 36:1370-1384.
25. Clevidence BA, Judd JT, Schaefer EJ, et al. Plasma lipoprotein (a) levels in men and women consuming diets enriched in saturated, cis-, or trans-monounsaturated fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1657-1661.
26. Mensink RP, Zock PL, Katan MB, Hornstra G. Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein (a) levels in humans. *J Lipid Res* 1992; 33:1493-1501.
27. Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC: Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1994-1998.
28. FDA food labeling: trans fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims; Reopening of the Comment Period November 15 2002. Available at:  
[www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr02n15b.html](http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr02n15b.html).
29. Keys A. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge: Mass, Harvard University Press: 1980.
30. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995; 24: 308-315.
31. Ascherio A, Hennekens CH, Buring JE, Master C, Stampfer MJ, Willett WC. Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 94-101.
32. Bolton-Smith C, Woodward M, Fenton S, Brown CA. Does dietary trans fatty acid intake relate to the prevalence of coronary heart disease in Scotland. *Eur Heart J* 1996; 17:837-845.
33. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996; 313: 84-90.
34. Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P, et al. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men: the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer prevention study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 876-887 .



35. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1997; 337:1491-1499.
36. Oomen CM, Ocké MC, Feskens, EJM, Van Erp-Baart M-AJ, Kok FJ, Kromhout D. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *The Lancet* 2007; 357: 746-51.
37. Foodline Web Newsletter. February 2003. Trans fatty acids: Available at:  
<http://www.foodlineweb.co.uk/FoodWeb/newsletter/feb03/editorial.asp>
38. Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Jl B Chem* 1987; 22(6): 497-509.
39. Miwa H, Yamamoto M. High performance liquid chromatography analysis of fatty acid composition of platelet phospholipid as their 2-nitrophenyl hydrazides. *J Chromatog* 1991; 588: 25-34 .
40. FDA Food Labeling: Questions and Answers on Trans Fat Proposed Rule U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Labeling, November 1999. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/label.html>.
41. Hul Y. Industrial oil and fat products. 15th ed. Baileys: Inter Sciences Pub: 1996; pp 1-63.
42. Hulsof K, VanErp-Baart M-A, Anttolanin M et al. Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: The TRANSFAIR study. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 143-57.
43. Katan MB. Exit trans fatty acids. *Lancet* 1995; 346:1245-1246.
44. Ascherio A, Meir J, Stampfer C, Walter C. Departments of Nutrition and Epidemiology, Harvard School of Public Health; The Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital. Jul 2003; Available at: <http://www.hsph.harvard.edu/reviews/transfats.html>.