

Fiskeolje og oksidasjonsprodukter

Gjermund Vogt og Bente Ruyter

FHF prosjekt 900246



Temaer:

- **Lagringsstabilitet av et utvalg marine oljer**
 - **Ulike kilder**
 - **Ulik raffineringsgrad**
- **Valg av analysemetodikk**
 - **PV og AV**
 - **Flyktige komponenter**
 - **Andre oksidasjonsprodukter**
- **Oksidasjonsprodukter og cellulære responser**
 - **Leverceller fra laks**
 - **Humane immunceller**

With the Author's compliments.

COD-LIVER OIL AND CHEMISTRY

LANE LIBRARY

BY

F. PECKEL MÖLLER, PH.D.

AUTHOR OF 'VEILEDNING VED ERDØMMELSEN AF MEDICINTRAN' 'NOGLE NORSKE FORHOLD'
'ET HUNDREDAARS JUBILEUM' CO-AUTHOR OF 'PHARMACOPŒA NORVEGICA 1870' ETC.



LONDON

PETER MÖLLER, 49 SNOW HILL, E.C.
AND AT CHRISTIANIA, NORWAY

AND CAN BE HAD FROM W. H. SCHIEFFELIN & CO., NEW YORK
AND FROM A. T. MÖLLER & CO., COPENHAGEN

1895

A

"Peter Møller skrev om fiskeoljer allerede i 1895. Spesielt la han vekt på harskning. Omega-3 har en lang fartstid som helsekost i Norge



Hvilken metode skal jeg bruke for å måle oljekvalitet?



Valg av oljer til forsøk

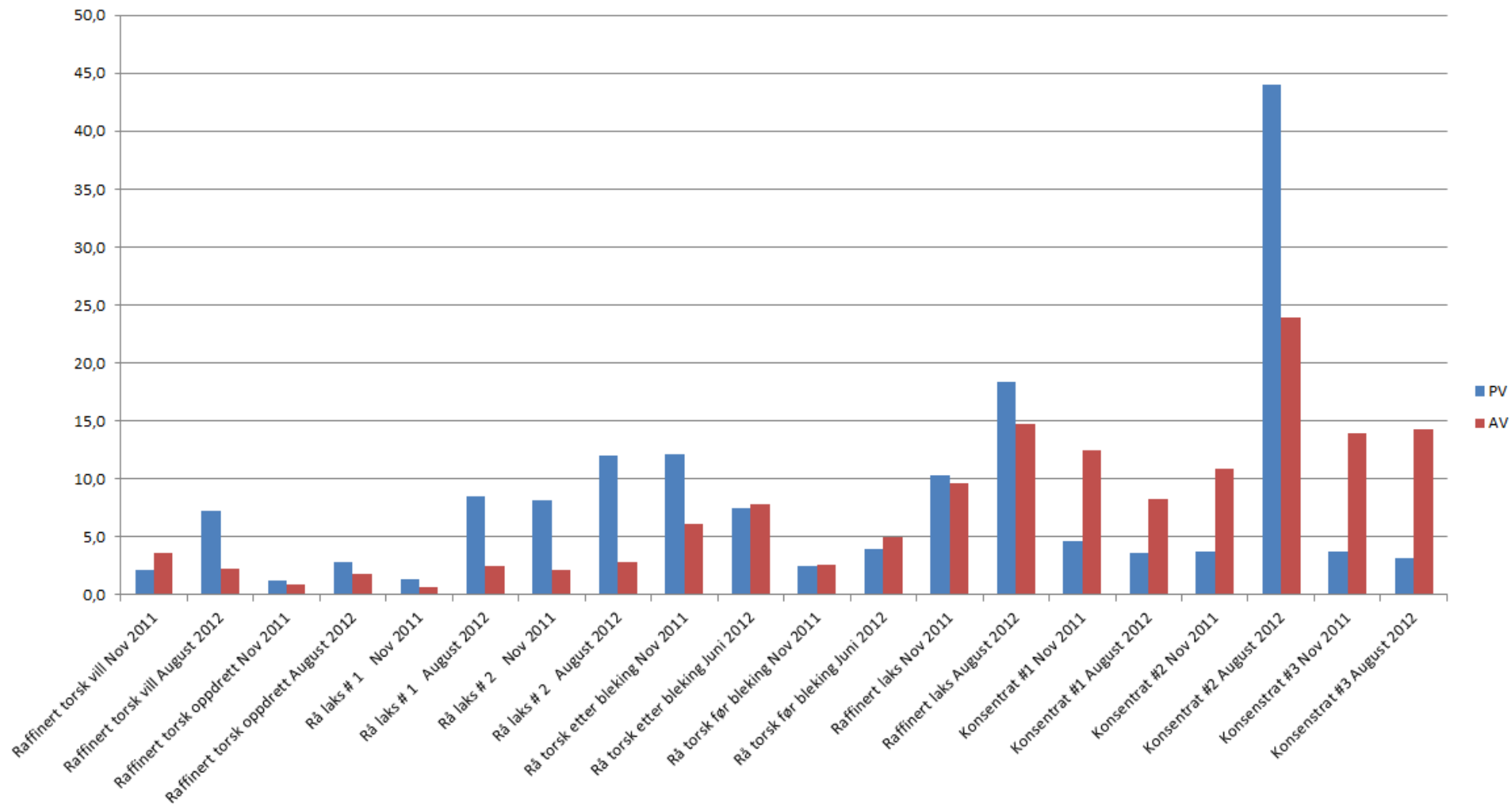
Benevning	Type olje
Raffinert torsk vill	Raffinert olje fra villtorsklever
Raffinert torsk oppdrett	Raffinert olje fra oppdrettstorsklever
Rå laks # 1	Råolje fra laks fra produsent 1
Rå laks # 2	Råolje fra laks fra produsent 2
Rå torsk etter bleking	Råolje fra torskelever etter bleking
Rå torsk før bleking	Råolje fra torskelever før bleking
Raffinert laks	Raffinert olje fra laks fra samme produsent som Rå laks #1
Konsentrat #1	Omega-3 konsentrat fra produsent 1
Konsentrat #2	Omega-3 konsentrat fra produsent 2
Konsentrat #3	Omega-3 konsentrat fra produsent 3

- Lagring av oljer med tilgang på oksygen i 10 mnd ved 20 grader og mørkt
- 4 uttak.

Peroksid og anisidintall

- Peroksid tall og Anisidintall er to tradisjonelle målemetoder for oksidasjonskvaliteten til oljer
 - Peroksid tall--- Nåtid
 - Anisidintall--- Fortid
- Fordeler
 - Raske og billige metoder som fungerer greit på rene triglyseridfraksjoner
 - Brukes i farmakopøen og ved kjøp og salg av oljer.
- Ulemper
 - Ikke egnet på lavoksiderte oljer(følsomhet)
 - Gir dels feilutslag
 - Opp i mot 50% av fiskeoljer i helsekostbransjen kan inneholde stoffer som påvirker resultatene til AV

PV og AV før og etter lagring



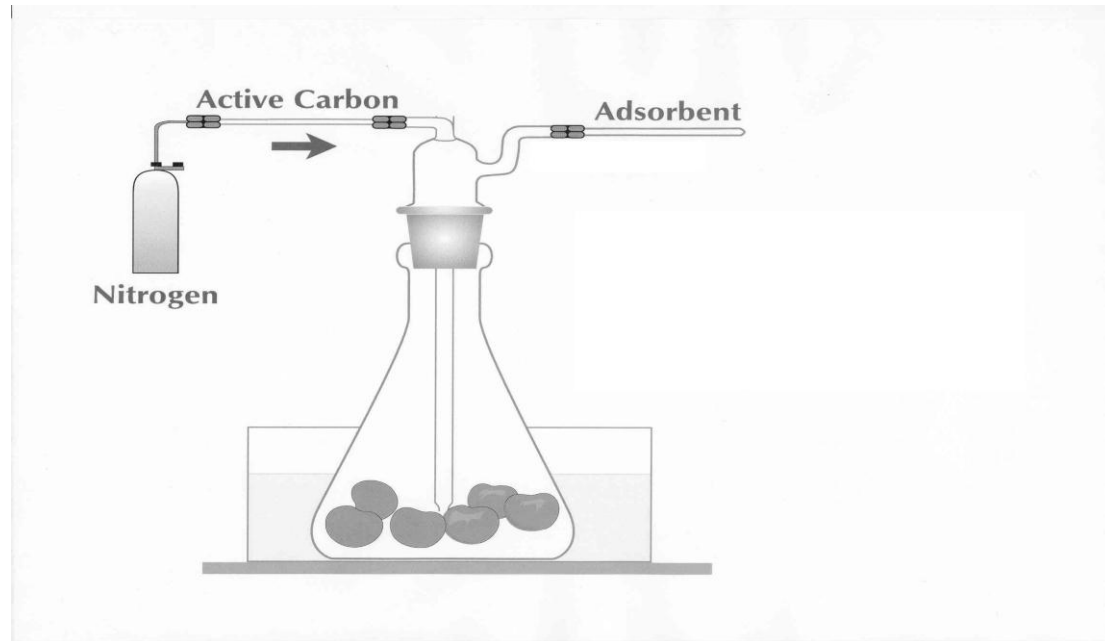
Men hva er egentlig det som får en fiskeolje til å lukte og smake uønsket?

	Sensoriske terskelverdier (ppm)
Hydrokarboner	90-2150
Substituerte furaner	2-27
Vinyl alkoholer	0.3-0.5
1-Alkener	0.02-9
2-Alkenaler	0.04-2.5
Alkanaler	0.04-0.3
Isolerte <i>cis</i> -alkenaler/alkadienaler	0.0003-0.1
<i>trans</i> -2, <i>cis</i> -4-Alkadienaler	0.002-0.006
Vinyl ketoner	0.00002-0.007
Propanal	1.6
2-Pentenal	0.046
3-Heksenal	0.09
2,4-Heptadienal	0.055
2,6-Nonadienal	0.002
3,6-Nonadienal	0.0015
2,4,7-Dekatrienal	0.15

Måling av flyktige oksidasjonsprodukter

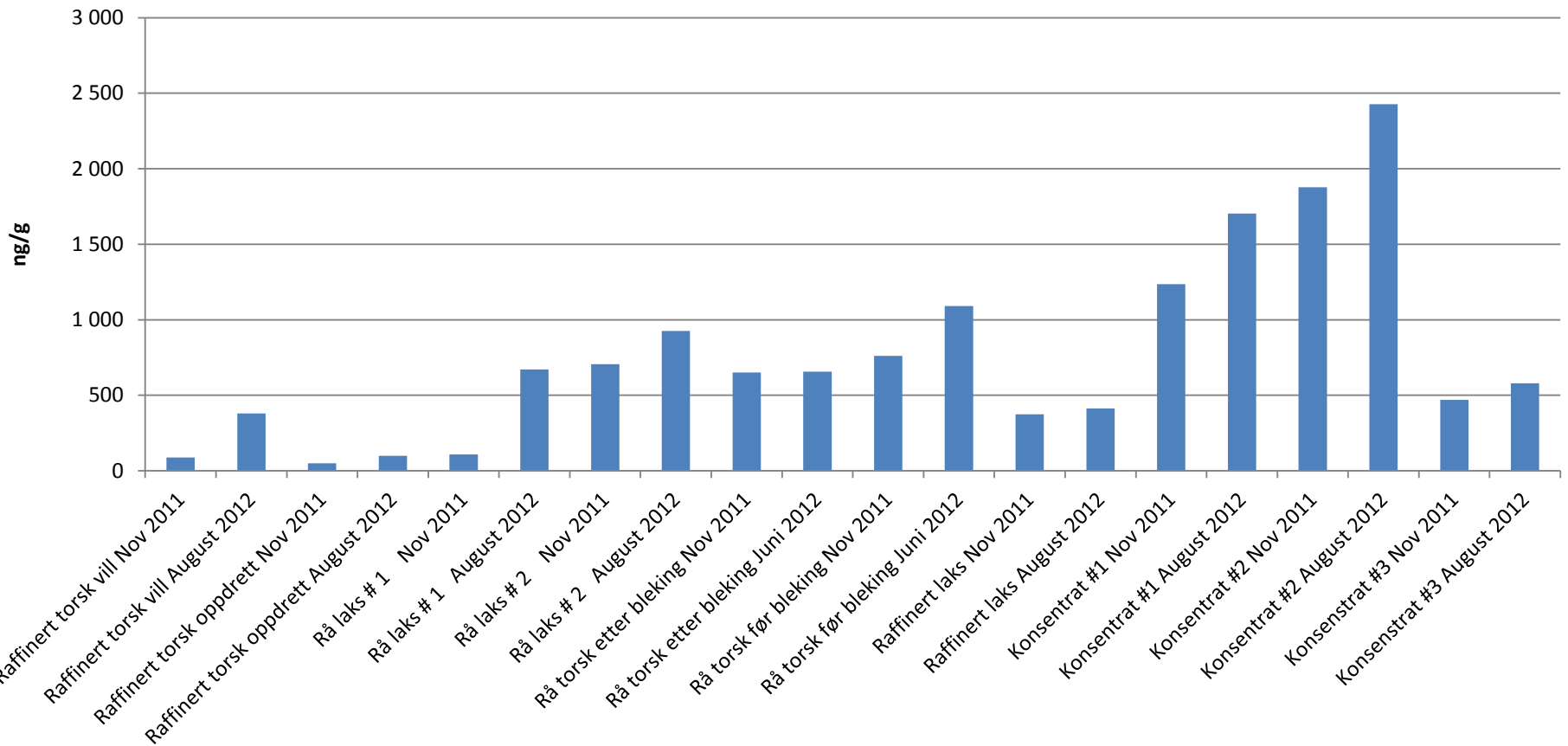
–Dynamisk headspace/GC-MS av flyktige oksidasjonsprodukter

- Prøvene overblåses eller gjennombobles med nitrogen, og flyktige komponenter som rives med i gass-strømmen samles opp på en fast adsorbent



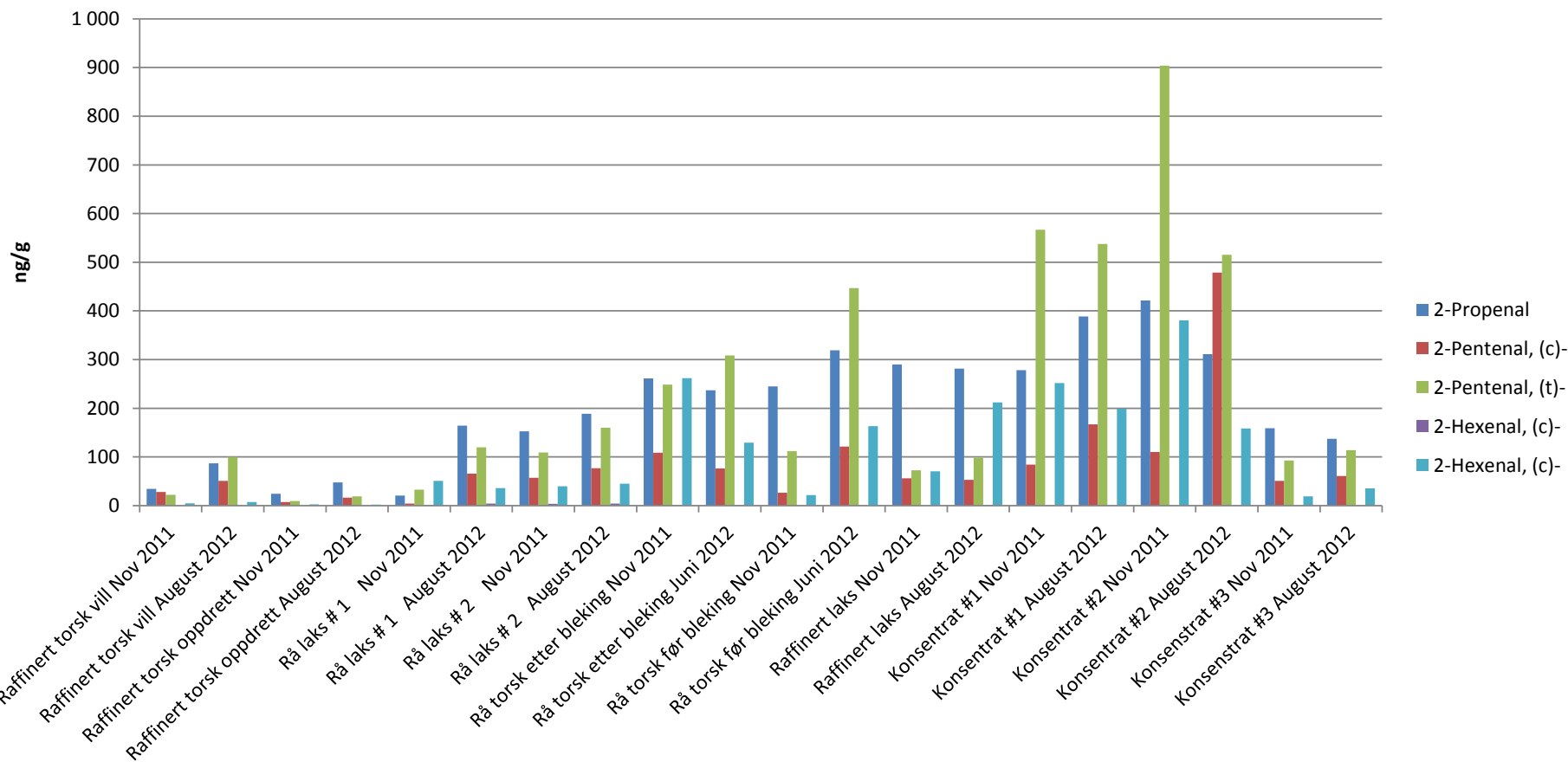
- Oppsamlede luktkomponenter analyseres vha gasskromatografi/massespektrometri

1-Penten-3-ol



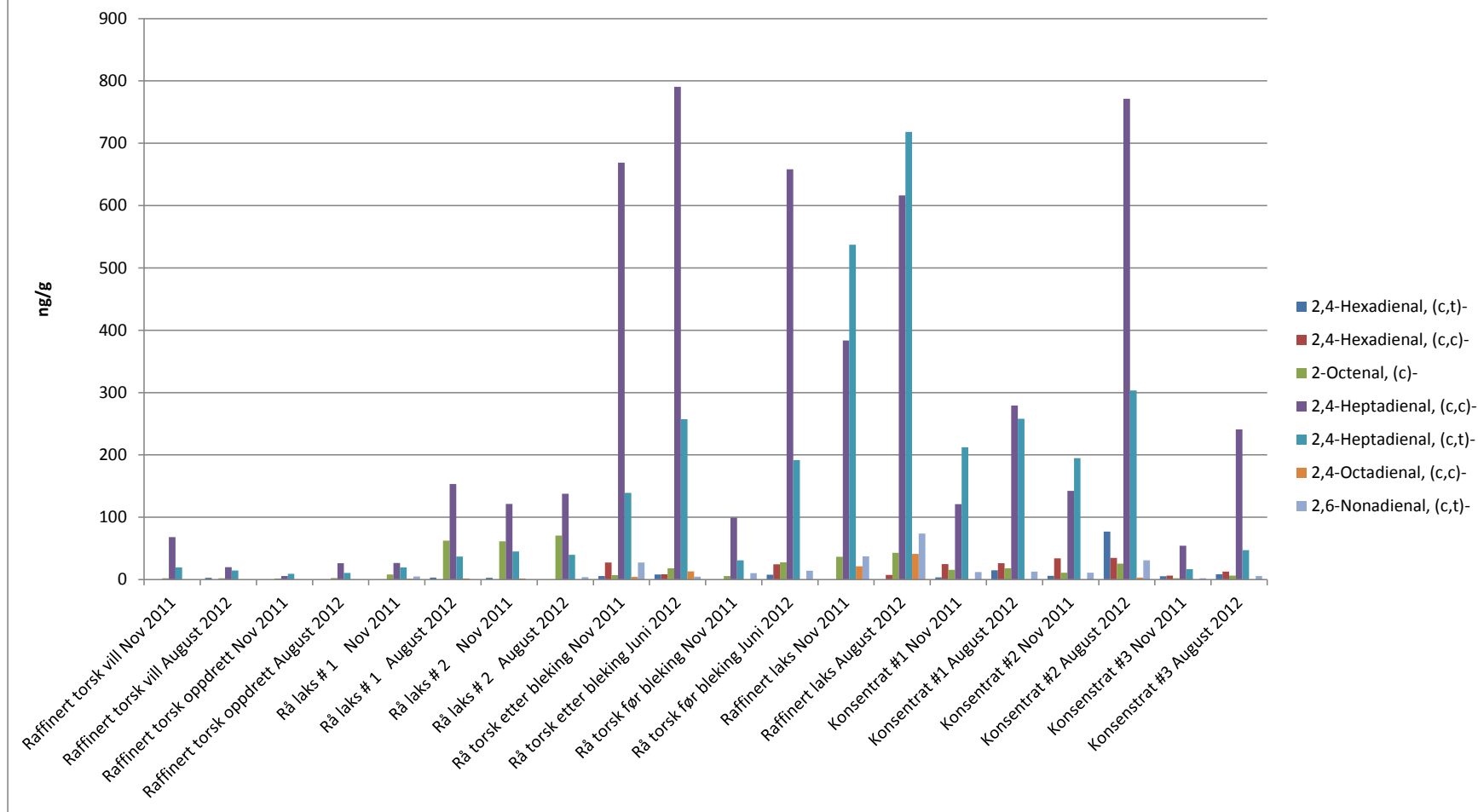
- 1-penten-3-ol samsvarer godt med PV og AV i de målte oljer
- Erfaringsmessig en god markør for oksidasjon

Enumettede aldehyder



Enumettede aldehyder (C3-C9) samsvarer dårligere med PV og AV i de målte oljer enn 1-penten-3-ol

Diuretete aldehyder

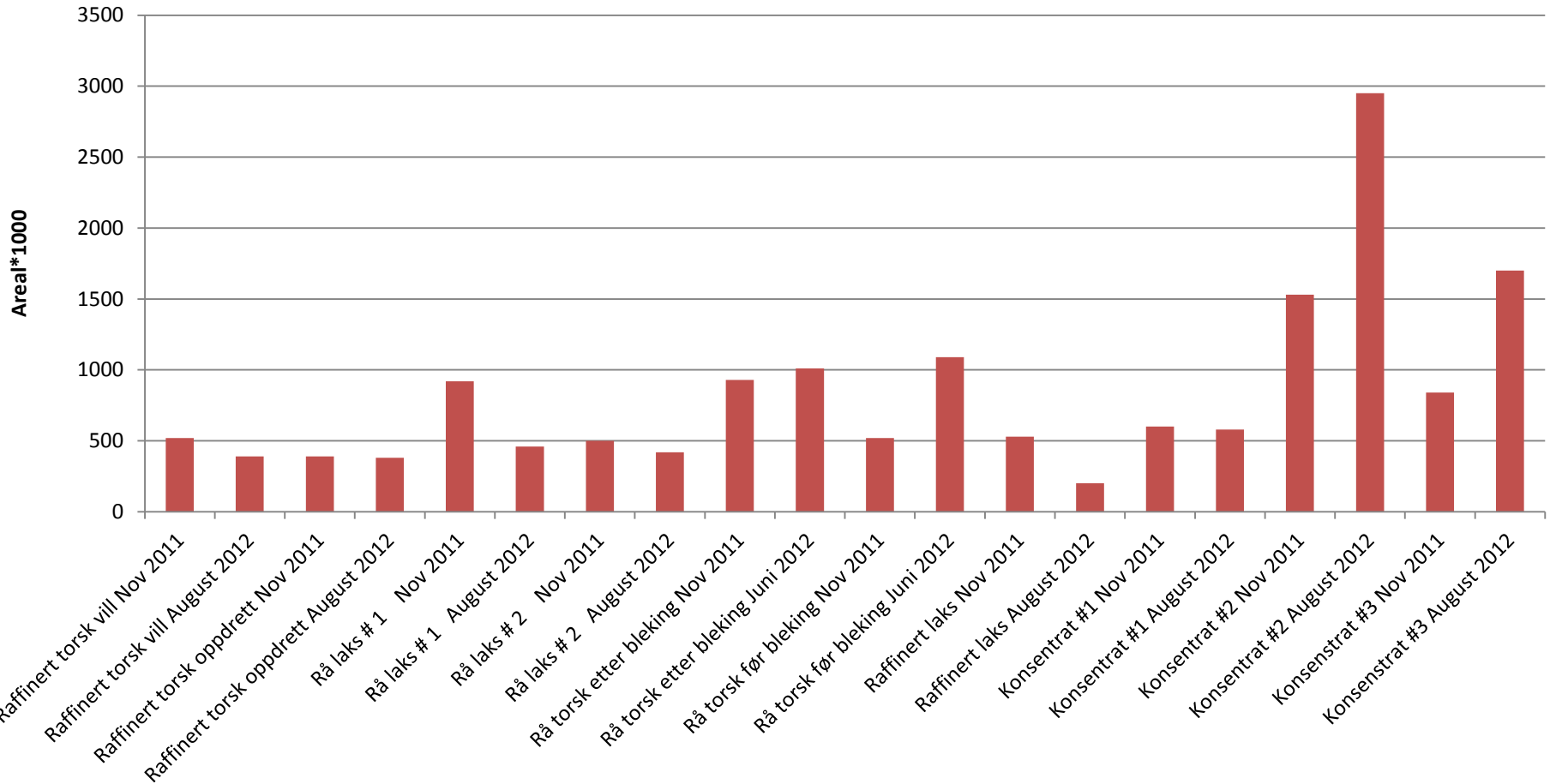


- Diuretete aldehyder samsvarer dårlig med PV og AV i de målte oljer.
- Disse aldehydene bidrar til uønsket smak og lukt.

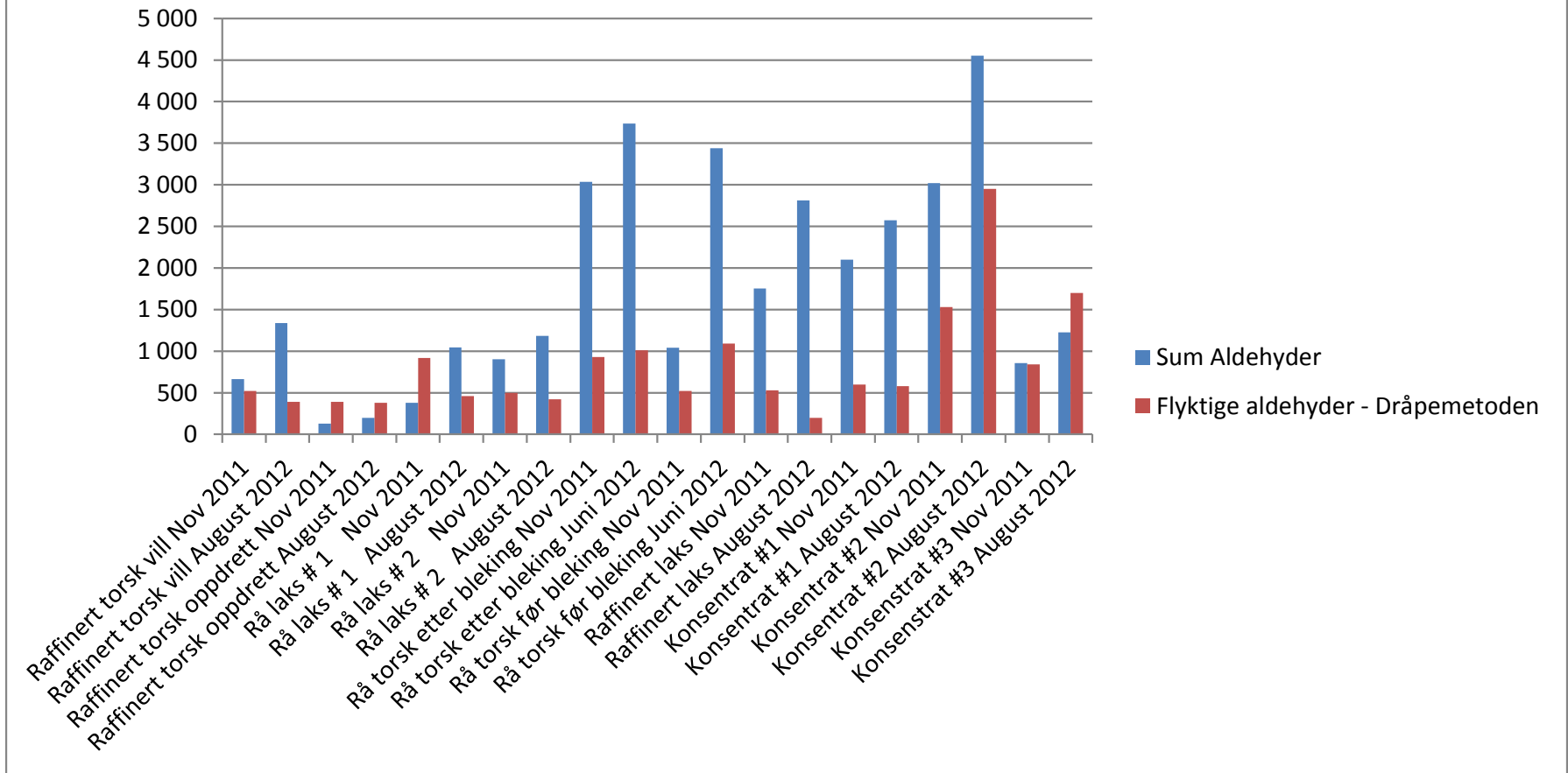
Dråpemetoden

- Ny enkel metode med store muligheter
- Direkte derivatisering av flyktige aldehyder i gassfase før injeksjon på gasskromatograf.
- Hurtig, grei og billig metode som kan gi en god indikasjon om oljekvalitet.
 - Typisk analysetid 15-25 minutter. Ingen prøveopparbeiding.
- Automatisert til å kunne kjøre store serier

Dråpemetoden

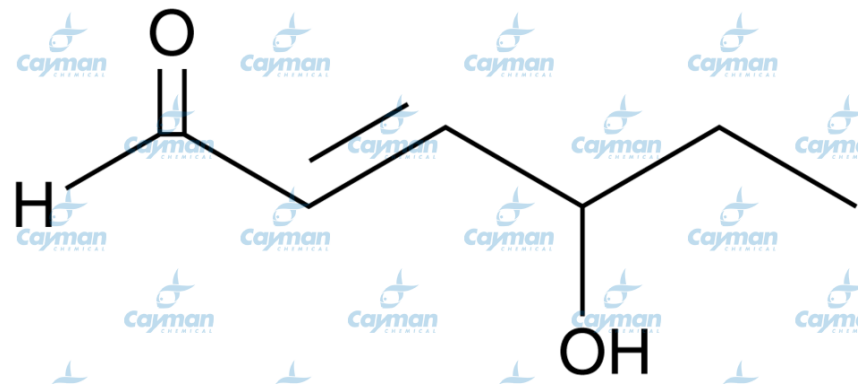


Mønster-total aldehyder -dråpemetoden



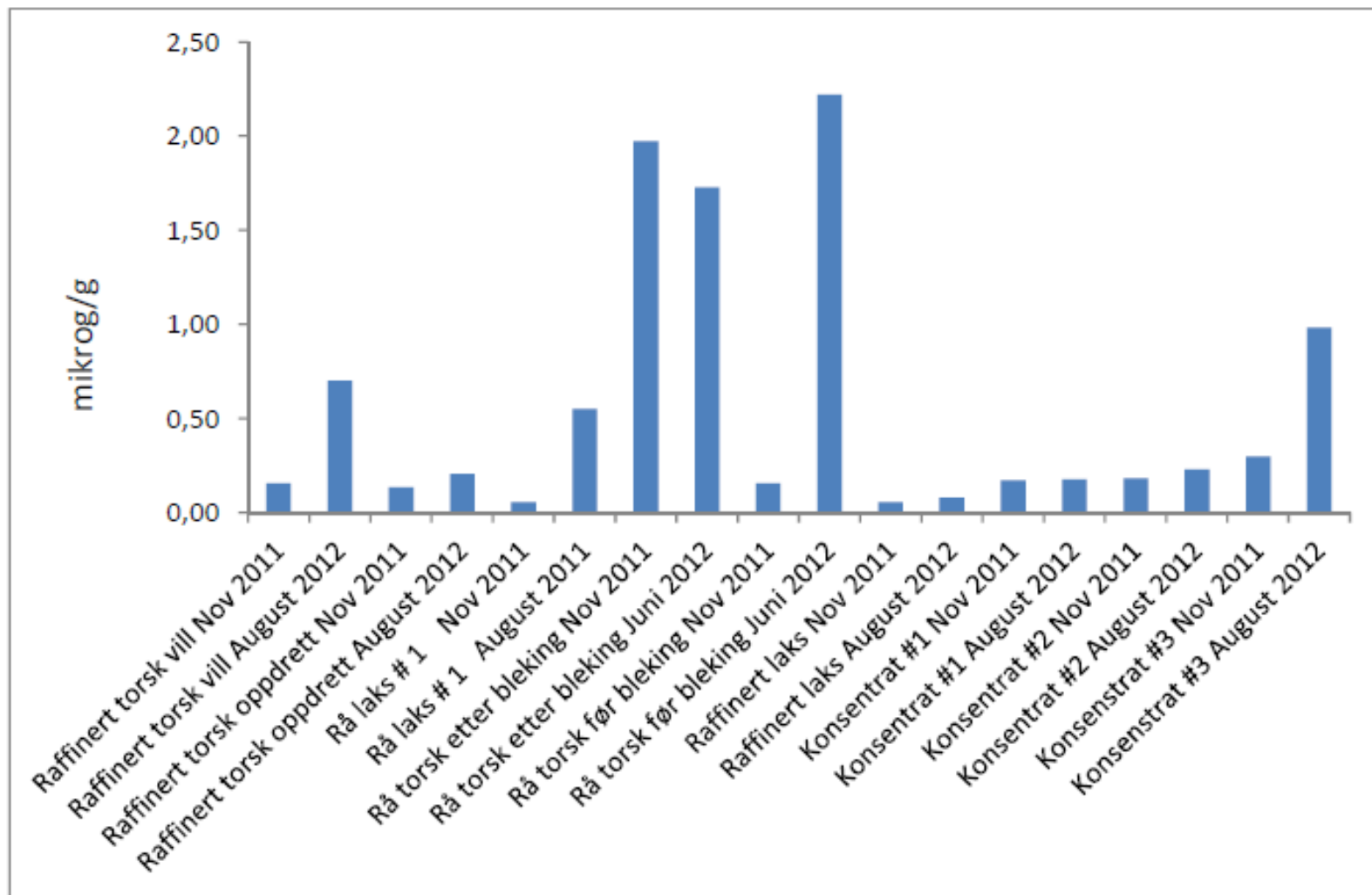
Det er en viss variasjon mellom total mengde flyktige aldehyder målt mot mengde derivatiserte aldehyder med dråpemetoden.

Analyse av hydroksyalkenaler



- 4-hydroksy-2-hexenal er et omleiret oksidasjonsprodukt fra enden av en Omega-3 fettsyre
- Lite flyktig og akkumuleres i oljen over tid siden den har høyt damptrykk
- Mulig god markør for å fortelle oss noe om forhistorien til oljen
- Er toksisk

4-hydroksy-2-hexenal i oljer



For rå torskeleverolje er det en viss sammenheng mellom 4-hydroksy-2 hexenal og dråpemetoden. Denne sammenhengen er ellers ikke så god mot de andre metodene.

Miljøgifter i oljene

Dagens grenseverdier

	Sum av dioxin (PCDD+PCDF-TEQ)	Sum av dioxin og dioxinlignende PCBer (non-ortho PCB og mono-ortho PCB-TEQ)	PCB6 (Sum av PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180-TEQ)
Marine oljer til humant konsum	1.75 pg/g fat	6.0 pg/g fat	200 pg/g fat

Resultater utført ved NIFES

Type olje	Sum av dioxin pg/g fett	Sum av dioxin og dioxinlignende PCBer pg/g fett	PCB6 pg/g fett
Raffinert torsk vill	1,41	1,73	8,8
Raffinert torsk oppdrett	1,51	1,97	34,3
Rå laks # 1	2,38	4,4	32,3
Rå laks # 2	2,77	6,02	43,6
Rå torsk etter bleking	2,69	7,37	116,1
Rå torsk før bleking	4,95	23,09	218,8
Raffinert laks	1,8	2,22	186
Konsentrat #1	2,24	2,72	3,3
Konsentrat #2	1,24	1,67	2,6
Konsentrat #3	1,39	1,51	0

Det var forholdsmessig mange oljer som hadde høyt innhold av dioksin. At råoljene ikke holder mål er mer forventet, men at et konsentrat og en raffinert lakseolje falt utenfor, var merkelig.

Oksyderte forbindelser og mulige helseeffekter

- Begrenset kunnskap om hva som skjer med lipidoksidasjonsprodukter i mage-tarmkanalen
- Inntak av kraftig oksiderte oljer er ikke akutt giftig.
- Begrenset informasjon om konsentrasjonen som trengs for å indusere toksiske effekter i kroppen
- Di-og polymere produkter kan sannsynligvis ikke absorberes i tarmen
- Lipid hydroperoksider vil trolig omdannes til mindre giftige alkoholer

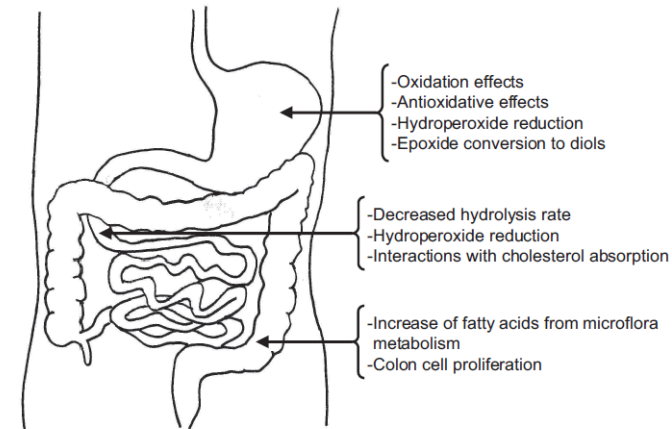
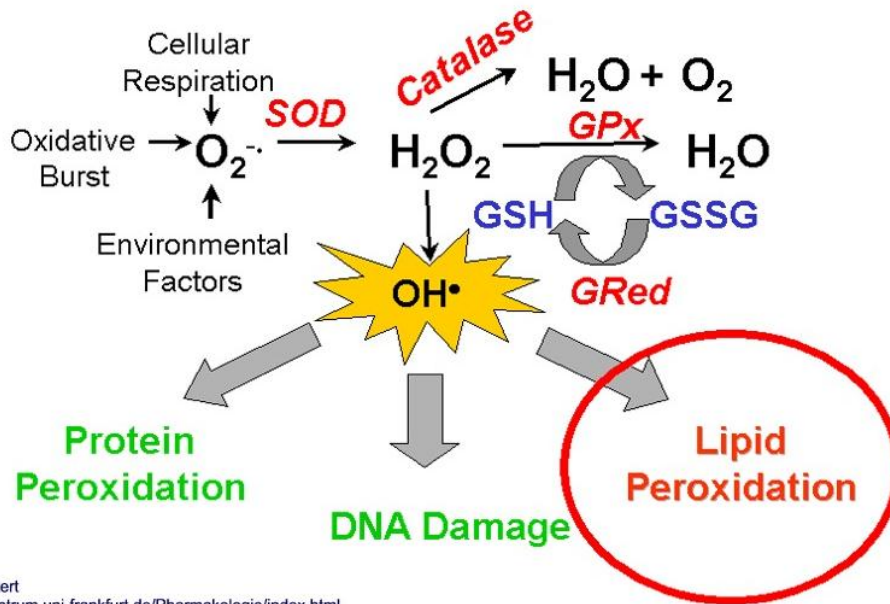


Figure 1. Main changes and effects reported for dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract.

Marquez-Ruiz et al., 2008

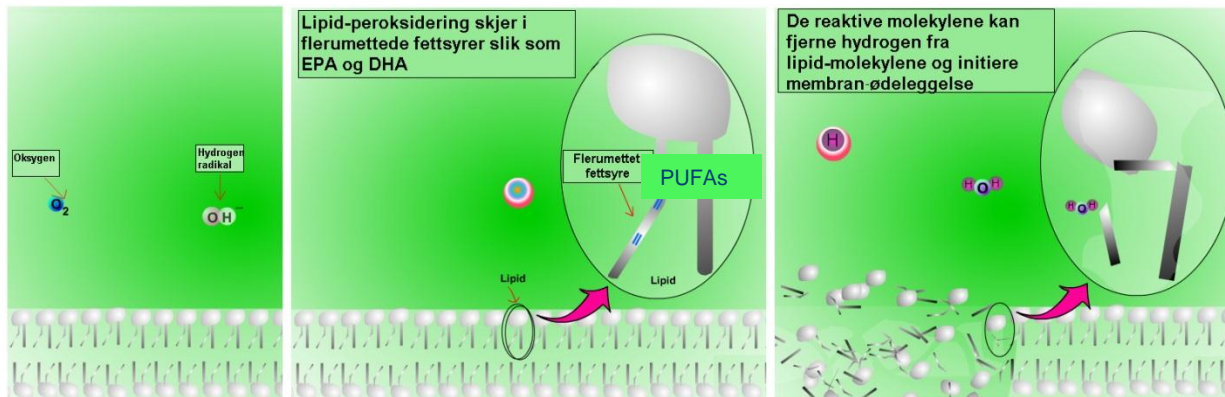
• Lavmolekylære aldehyder vil absorberes i tarmen og potensielt kunne føre til negative helseeffekter

Hva kan skje i kroppen?



Det er vanskelig å skille mellom effekter forårsaket av oksyderte komponenter fra mat og oksidasjonsprodukter dannet i kroppen

by G.P.Eckert
www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html



Potensielle helseeffekter av “rene” oksidasjonsprodukter

Hydroxyalkenaler

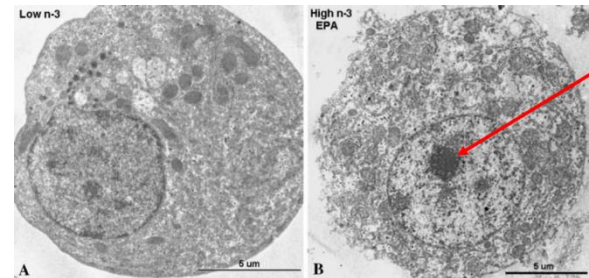
- Omega-3 PUFA kan gi opphav til 4-hydroksy-2-trans-heksenal (HHE)
- Omega-6 PUFA kan gi opphav til 4-hydroksy-2-trans-Nonenal (HNE)
HNE konsentrasjoner > 100 mikromM kan føre til akutt toksiske effekter og celledød
- HNE i konsentrasjoner over 0,1 mikromM skader DNA

Propenal

- Skader DNA, mutagen effekt

Andre aldehyder

- Økende toksisitet med økende kjedelengde av 2-alkenalene
- 2-Nonenal skader DNA i konsentrasjoner på 10,1,0 og 0,1 uM
- Nonanal er ikke funnet å ha genotoksiske effekter opp til en konsentrasjon på 100 uM
- Mettede aldehyder har generelt lavere toksisitet



Oxidative stress
leads to condensation
of chromatin

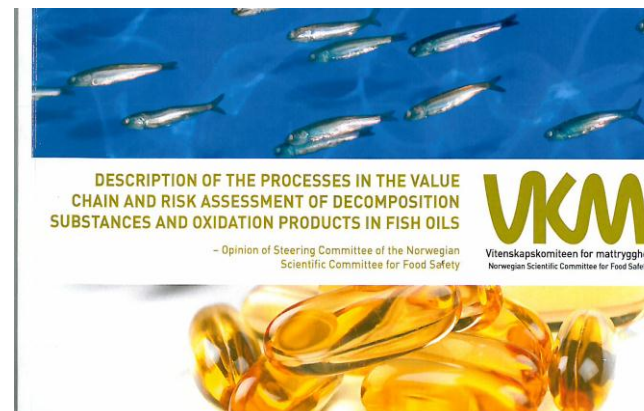
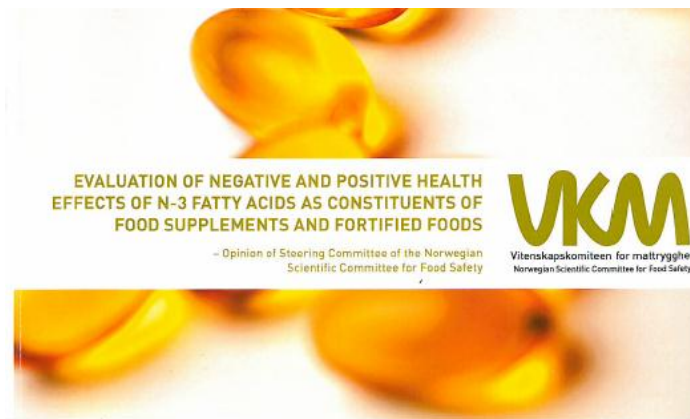
EFSA Journal 2010 8 (10)

Inntak av marine oksiderte oljer og helseeffekter

VKM 2011: Det er liten eller ingen offentlig tilgjengelig informasjon om sammensetningen av oksidasjonsprodukter i kosttilskudd av marin opprinnelse, samt hvilke toksiske effekter disse oksidasjonsproduktene kan ha i mennesket.

Dyrestudier utført med oksiderte vegetabiliske oljer viser imidlertid at høye doser har uheldige helseeffekter.

Basert på meget begrenset tilgjengelig informasjon konkluderer VKM med at det er noe bekymring knyttet til jevnlig inntak av marine oksiderte oljer



Det er økende bekymring for om oksidasjonsprodukter kan redusere den positive helseeffekten ved inntak av omega-3 fettsyrer.

Studier med vegetabiliske oksiderte oljer:

- Recent evidence indicates that dietary oxidised fats can contribute to the development of atherosclerosis and thrombosis. [Turner R, McLean CH, Silvers KM. Nutrition Research Reviews \(2006\), 19:53-62.](#)
- Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells).
 - The study indicated a substantial decrease in cell viability in samples treated with oxidised lipid. Addition of malondialdehyde (MDA) and hydroxynonenal (50 microM) also reduced cell viability. [Alghazeer R et al. 2008. Toxicol Lett. 180\(3\):202-11.](#)
- Oxidized fat induces oxidative stress but has no effect on NF-kappaB-mediated proinflammatory gene transcription in porcine intestinal epithelial cells. [Ringseis et. al., 2007. Inflammation Res. 56, 118–125](#)
- Oxidation in fish oil products could reverse positive health effects .
<http://www.nutraingredients.com/news/ng.asp?n=63341-fish-oil-antioxidant>
- Biological effects of oxidized fatty acids. In Fatty acids in foods and their health implications, 3rd ed.; Chow, C. K., Ed.; CRC. Press, Taylor and Francis Book: Boca Raton, FL, 2008; pp 855-878.
- Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. [Garrido-Polonio et al 2004. Br. J.Nutr. 2004, 92, 257–265.](#)

- A high oxidised frying oil content diet is less adipogenic, but induce glucose intolerance in rodents (*Chao et al., 2007, Br. J. Nutr.*)
- Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency. *Chiang YF, Shaw HM, Yang MF, Huang CY, Hsieh CH, Chao PM. Br J Nutr. 2011 May;105(9):1311-9.*
- Cell studies have shown that secondary oxidation products could inactivate the antioxidant enzyme activities (i.e. glutathione peroxidase (GPx))
Miyamoto et al., 2003, Awasti et al., 2001

Marin olje:

- No changes in a variety of *in vivo* markers of oxidative stress, lipid peroxidation or inflammation were observed after daily intake of oxidized fish oil for three or seven weeks, indicating that intake of oxidized fish oil may not have unfavorable short-term effects in healthy humans. *Ottestad et al, 2011 Br. J. Nutr.*

Få studier og lite kunnskap om oksidasjonskomponenter tilstede i marine oljer og helseeffekter

En tidligere studie fra Nofima har vist at økende oksidasjon av fiskeoljer fører til;

Leverceller fra laks:

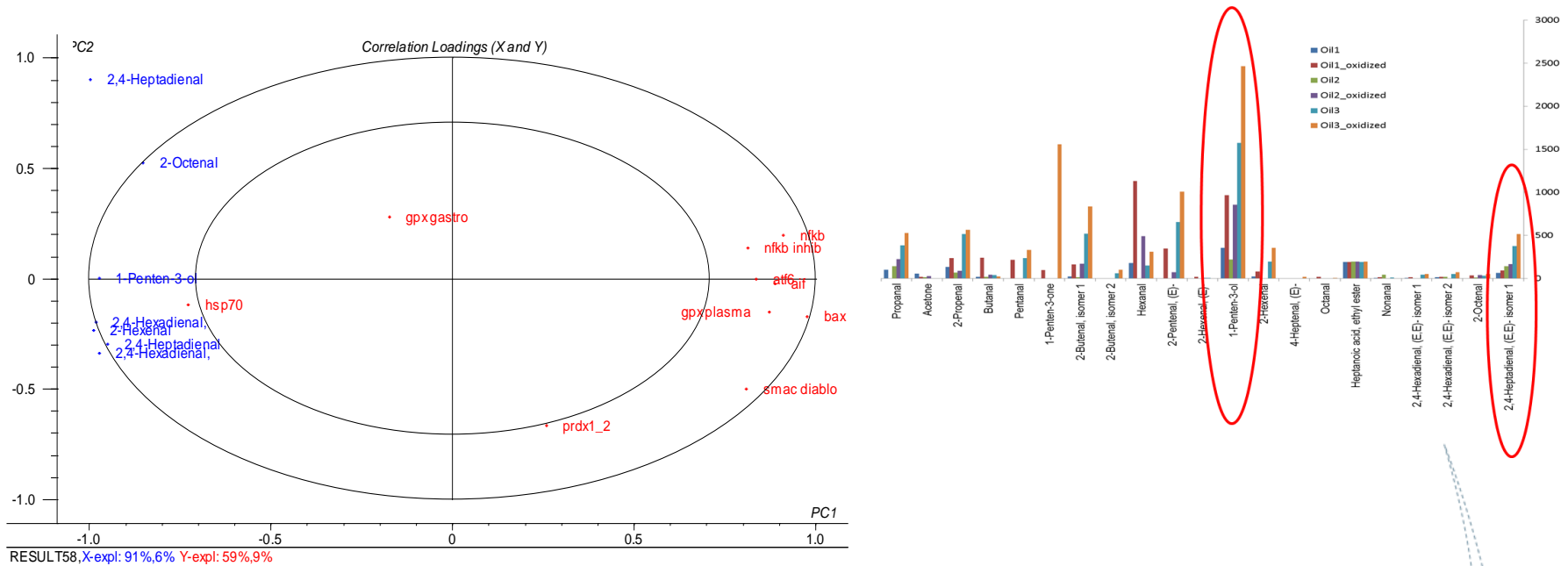
- Økt oksidasjon av membranlipider
- Økt uttrykk av stressresponsgener, antioksidanter og inflammatoriske markører
- Høy oksidasjonsgrad av oljer slår ut respons

Humane kreftceller:

- Økt lipidperoksidering av cellemembraner
- Reduserer den inhiberende virkning av fiskeoljer på vekst av kreftceller

Kilde: Rubin rapport nr 196

Innledende forsøk med leverceller fra laks viste høy korrelasjon mellom flyktige oksidasjonsprodukter i ulike oljer og helsemarkører i celler ($r > 0,9$)



Ingen korrelasjon til PV og AV

Gen markører : PV $r=0,1$

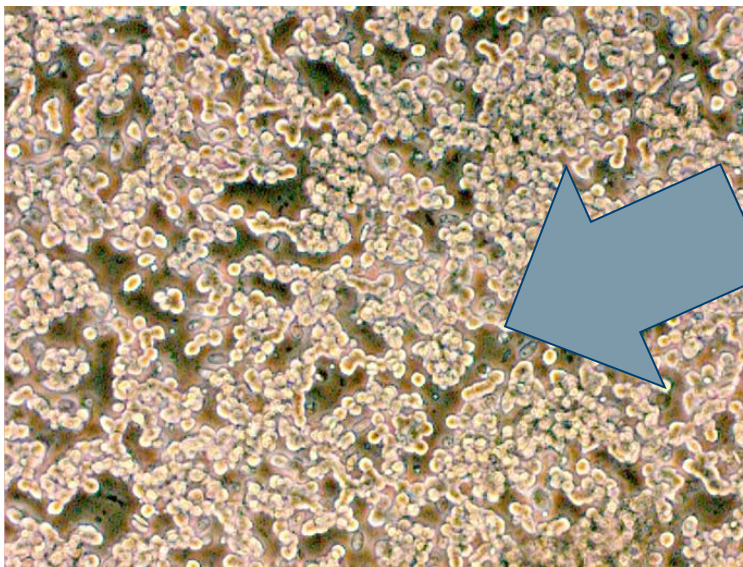
Gen markører: AV $r=0,01$

Enzymer : PV og AV $r= 0,2-0,3$

Multivariat analysen viser en sannsynlig sammenheng mellom sekundære Oksidasjonsprodukter som 1-Penten-3-ol, 2,4 hexadienal, 2 heksanal og uttrykk av stress respons markører

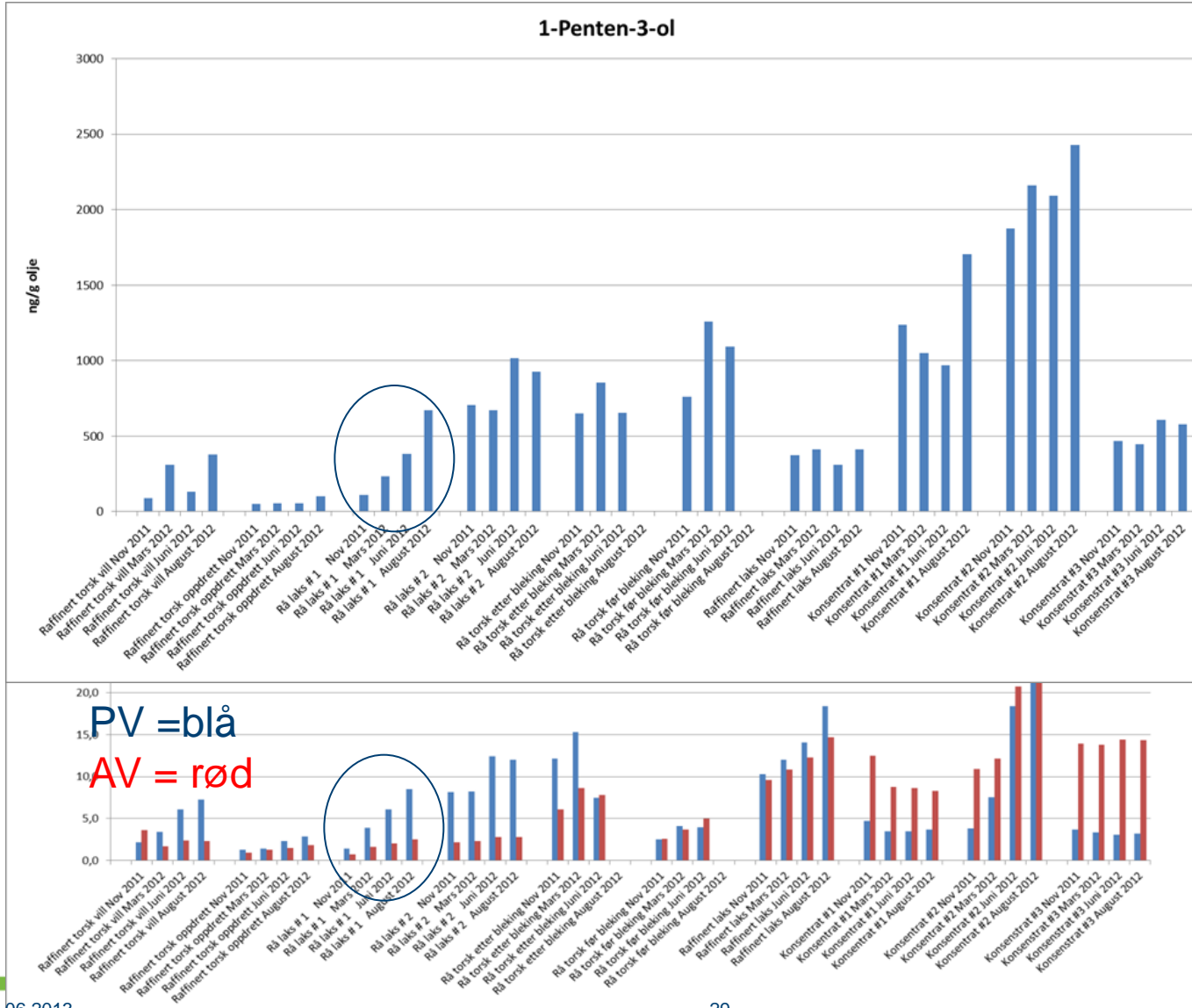
Bruk av primære leverceller fra laks som modellsystem

Undersøke hvordan ulik oksidasjonsgrad av olje og ren 1-penten-3-ol påvirker cellulære responser

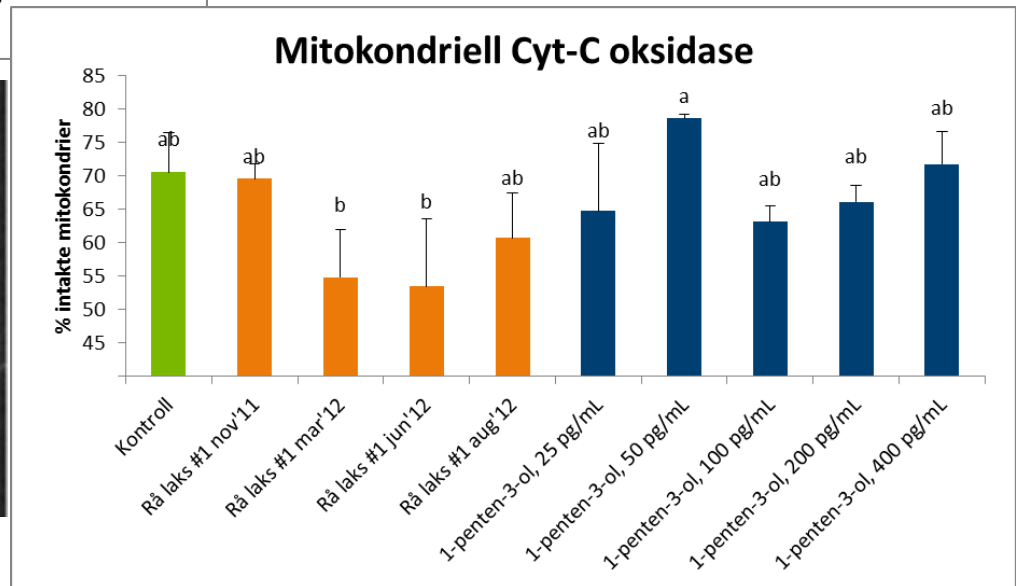
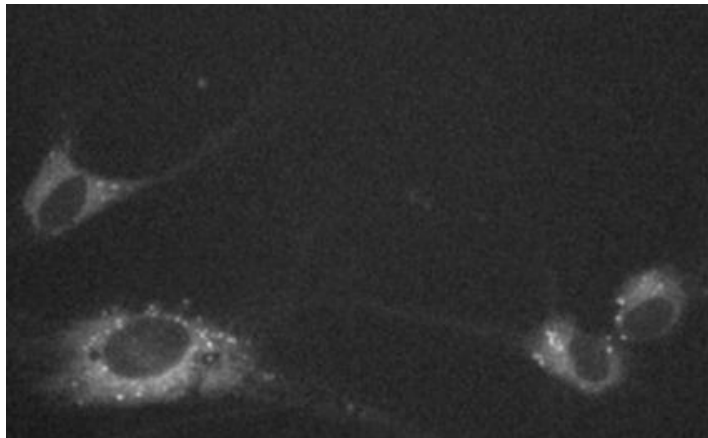
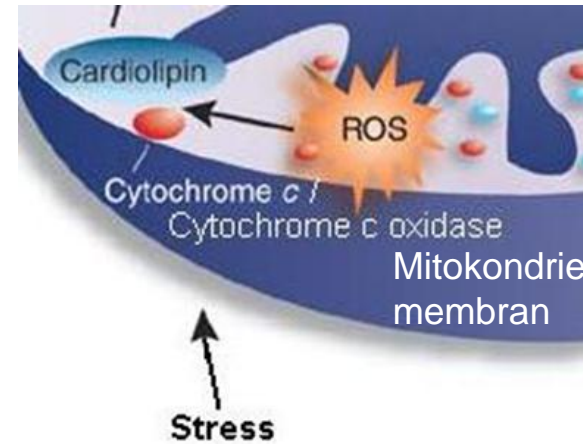
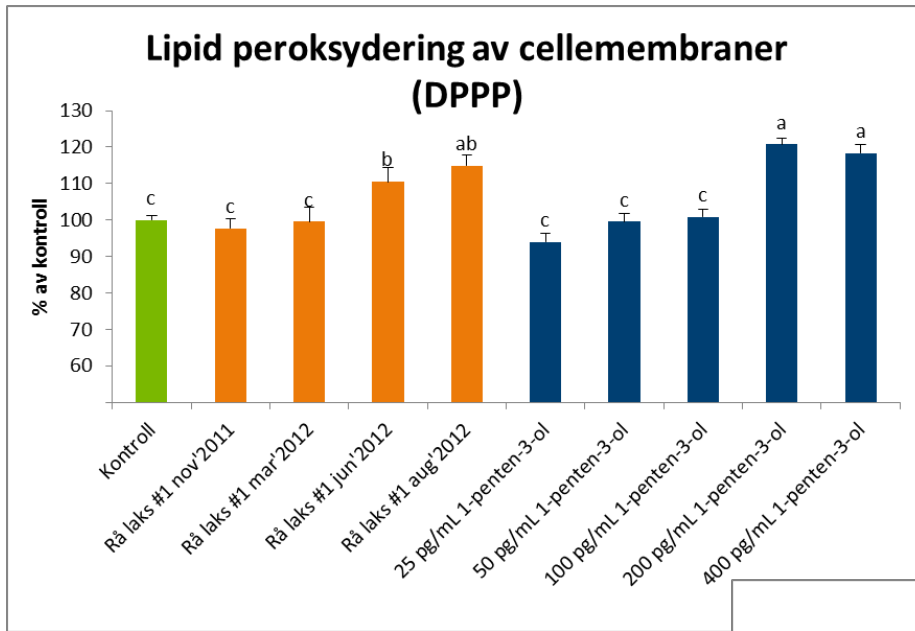


Celler dyrkes in medium
Tilsatt 0,5 mg/ml olje med økende oksidasjonsgrad eller ren 1-penten-3-ol i økende konsentrasjon fra 25 til 400 pg/ml (48 timer).

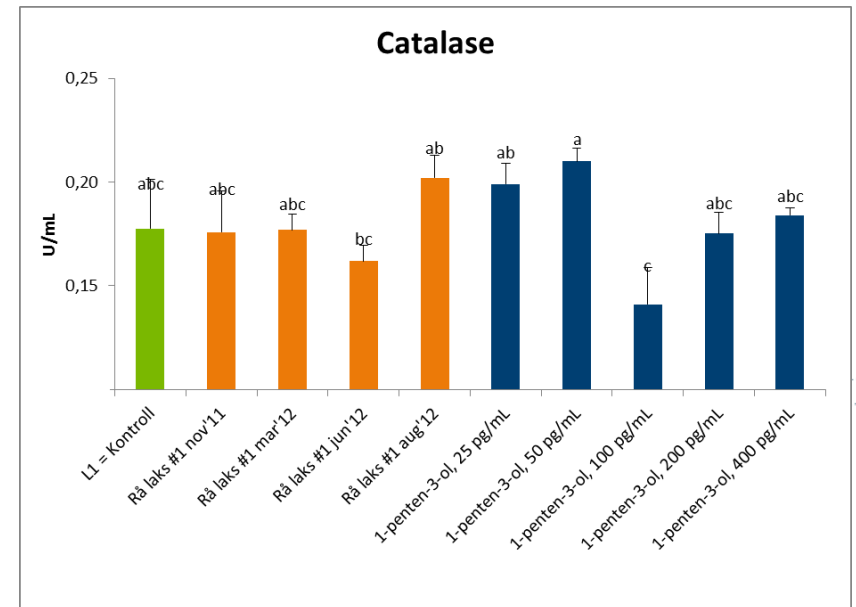
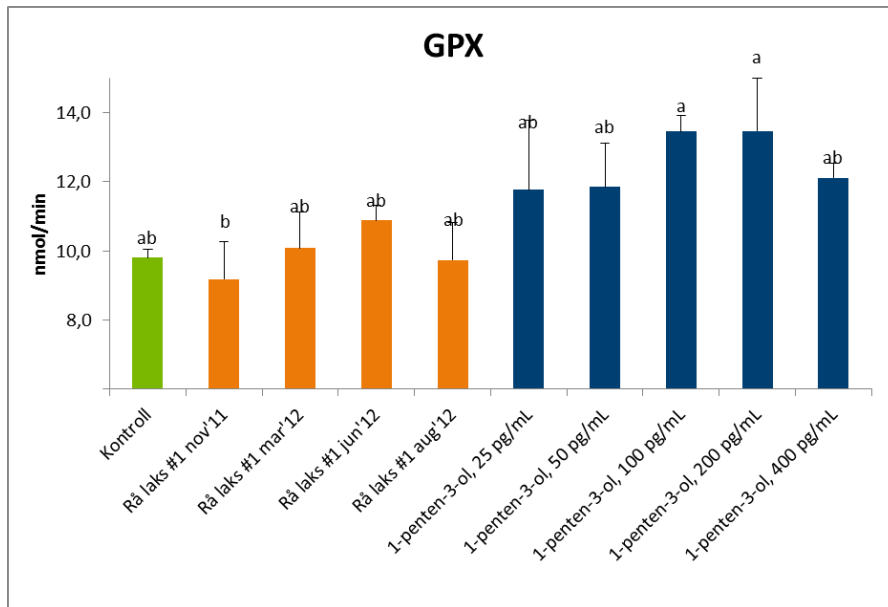
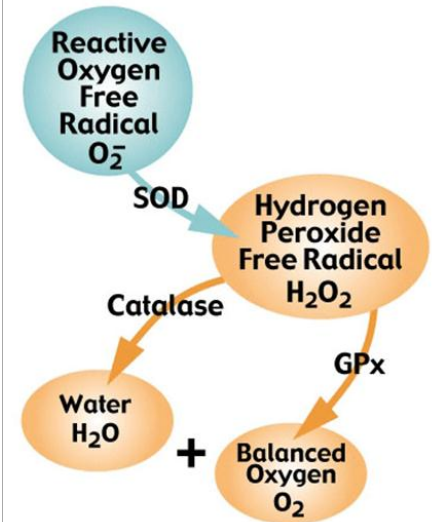
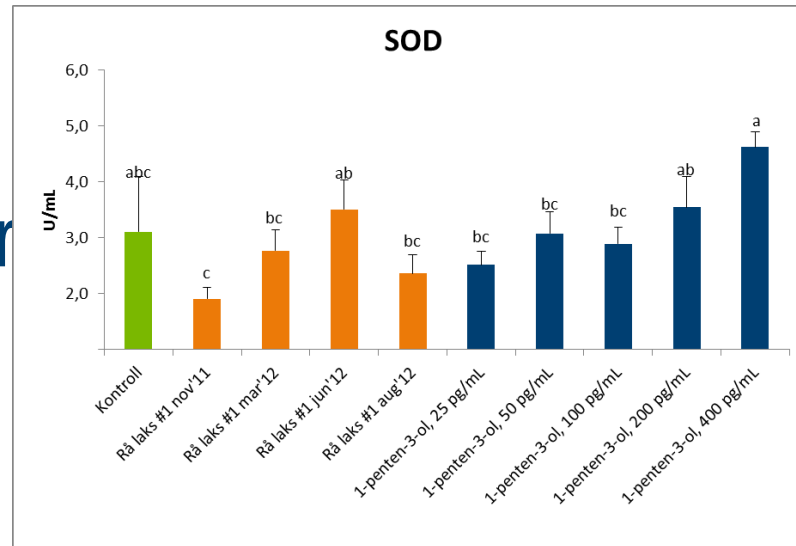
Rå lakseolje velges til forsøket. 1-penten-3-ol har samme konsentrasjon i oljen som i form av ren komponent i forsøket



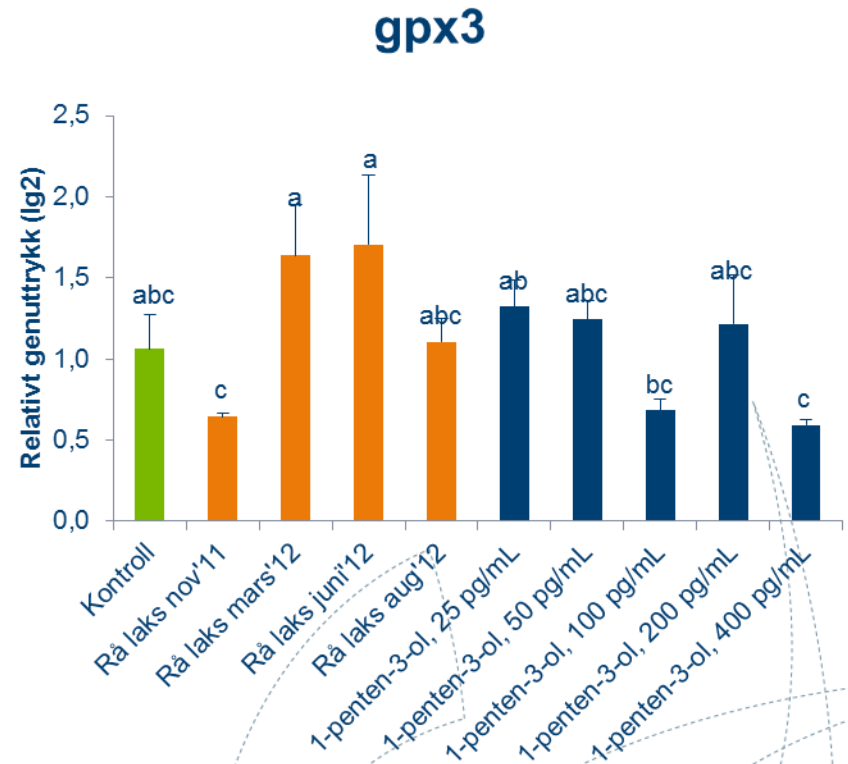
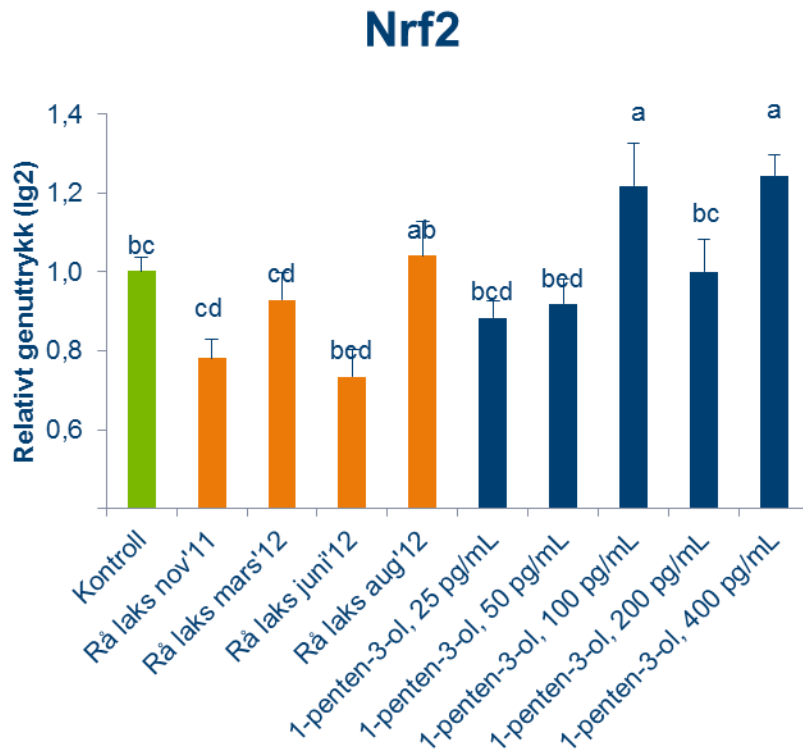
Effekt på celle- og mitokondriemembran



Effekt på intracellulære antioksidanter

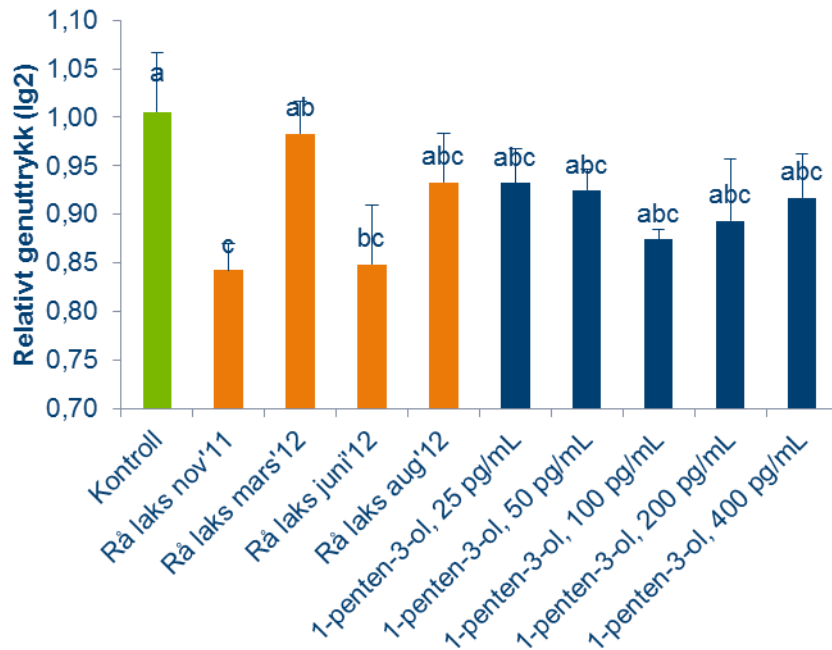


Uttrykk av gener involvert i intracellulært antioksidant forsvar

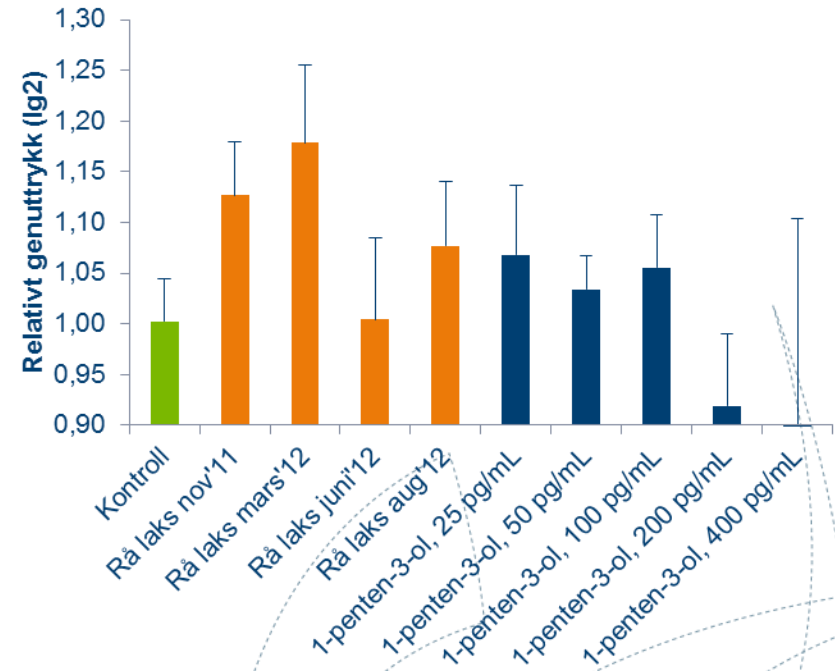


Uttrykk av gener relatert til mitokondrie funksjon og inflammasjon

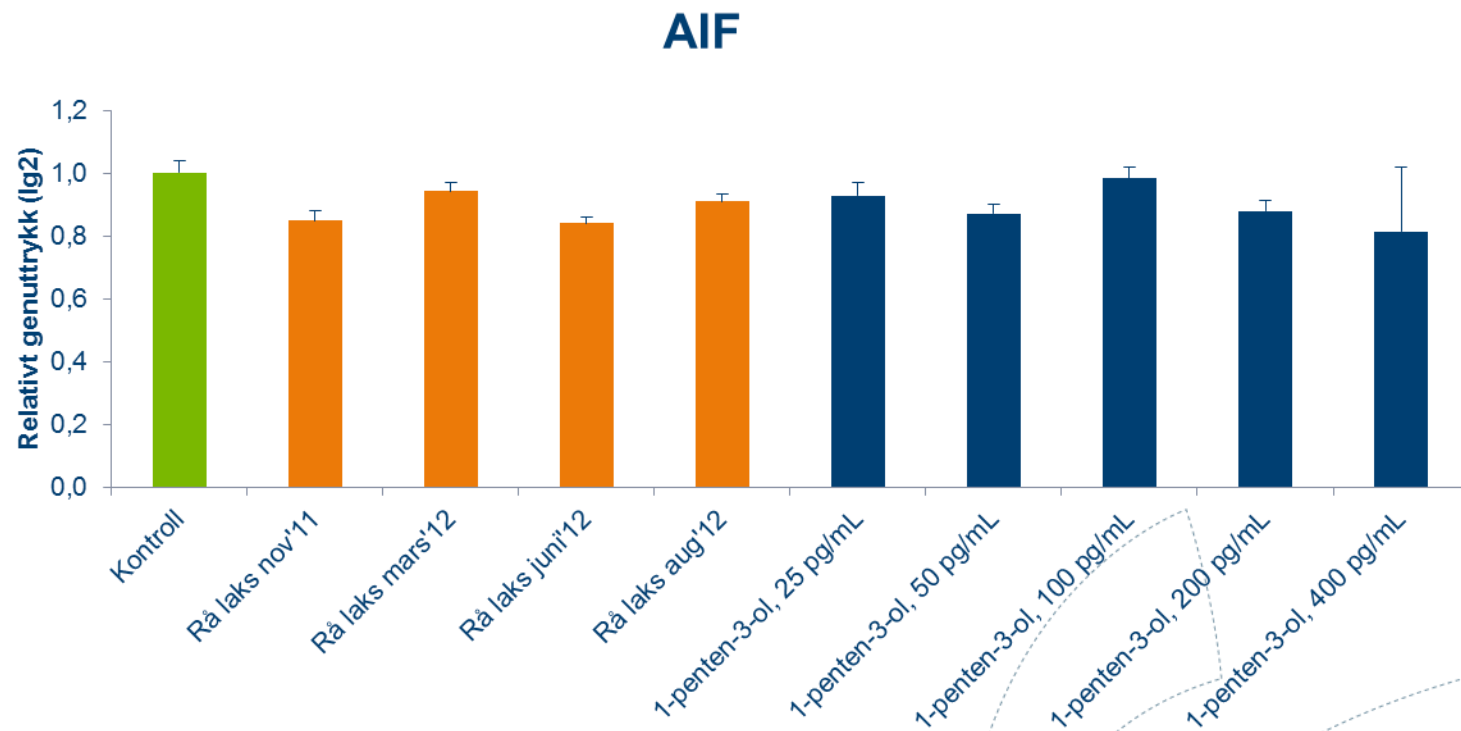
Mitokondrie fisjon



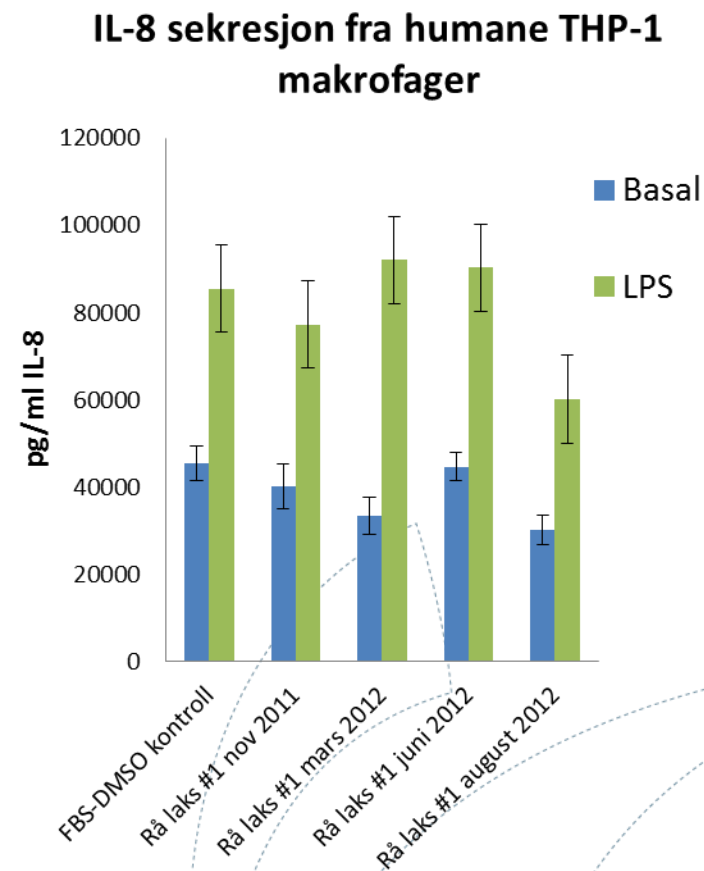
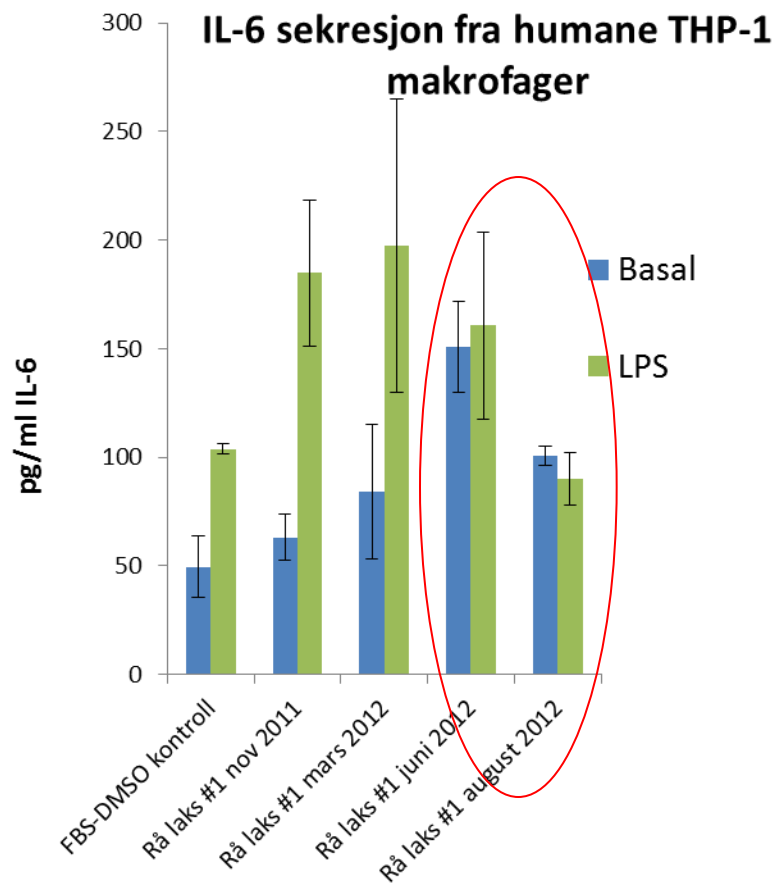
NFKB



Genuttrykk av apoptose (celledød) induserende faktor (AIF)



Økende oksidasjonsnivå av olje og effekt på interleukin sekresjon fra humane makrofager



Oppsummering

- Dataene viser ulik oksidasjonskjemi og forløp i ulike typer olje
- Det er hovedsakelig innholdet av 1-Penten-3-ol som samsvarer med PV og AV verdiene, mens innholdet av flyktige aldehyder i stor grad ikke samsvarer.
- Resultatene så langt viser at man må benytte et spekter av ulike analysemetoder for å få et mest mulig riktig bilde av oljekvalitet.
- I videre arbeid er det spesielt viktig å utvikle gode analyseverktøy for analyse av ikke flyktige oksidasjonskomponenter

Oppsummering

- Oksidasjonsprodukter tilstede i oljer og alene, kan påvirke cellulære responser involvert i stress og inflammasjonsprosesser.
- Resultatene peker på viktigheten av å få kunnskap både om hvilket nivå og hvordan de enkelte oksidasjonskomponentene tilstede (og samspill mellom de ulike komponentene i oljen) kan påvirke cellulære responser.
- Foreløpige resultater fra cellemodeller må forøvrig verifiseres i mer relevante biologiske systemer som pattedyrmodeller og humane studier, før man kan konkludere vedrørende mulige helseeffekter i menneske.

Takk for oppmerksomheten

- Stine Grimmer
- John-Erik Haugen
- Marijana Todorcevic
- Tone Kari Østbye
- Frank Lundbye
- Inger Ø Kristiansen
- Bente Ruyter
- Gjermund Vogt



Nofima lipid plattform