



Rapport
2015

Vågehval:

Økt utnyttelse og fangstverdi kan gi ny næring.
Grunnlag for utvikling av ny industriell verdikjede
med produksjon basert på utnyttelse av vågehval

FHF Prosjekt nr. 901025
Møre og Romsdal fylkeskommune tilsagn nr. 2014-0111

Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag	3
2. Terminologi	5
3. Innledning	6
3.1 Problemstilling og formål.....	7
3.2 Regelverk.....	8
3.3 Stoffgruppene som er inkludert i prosjektet	9
4. Prosjektgjennomføring	9
4.1 Prøver	9
4.2 Analysemetoder.....	9
4.2.1 Næringsstoff	9
4.2.2 Elementer og råanalyser	11
4.3 Oppsett museforsøk	12
5 Resultater	12
5.1 Metodeutvikling og validering av metode for baleninbestemmelse.....	12
5.2 Dyreforsøk.....	12
5.2.1 Litteratursøk, definering av endepunkt og forsøksplanlegging	12
5.2.2 Pre-pilot dyreforsøk og pilotforsøk	13
6 Leveranser	16
7 Videre arbeid	16
8 Referanser	17
9 Vedlegg	18

1. Sammendrag

Norsk:

Dette prosjektet har vært finansiert av FHF og Møre og Romsdal Fylkeskommune. Den overordnede målsettingen med prosjektet har vært å bidra til å skape et bærekraftig grunnlag for utvikling av en ny verdikjede med produksjon av unike helsefremmende produkter for et nasjonalt og internasjonalt marked i fremtiden. Dette har blitt gjort ved å gjennomføre følgende hovedmål:

- Lage metode som kan produsere kvantitative tall for balenin i ulike prøver fra hval.
- Lage forsøksprotokoll og gjennomføre et pilotforsøk med mus slik at positive effekter og fravær av negative effekter av balenin kan avdekkes i fremtidige større dyreforsøk med mus.
- Sammenfatte alle resultatene i en avslutningsrapport som vil bli offentlig tilgjengelig til fri benyttelse for hele næringen

Resultatene i prosjektet har vist at balenin kan bestemmes kvantitativt i hvalprøver med metoden som ble ferdigutviklet og validert i dette prosjektet. Dyreforsøk med mus viste ingen negative effekter av balenin i de mengdene som ble brukt og i den tiden forsøkene pågikk. Det ble ikke funnet signifikante positive helseeffekter i museforsøkene bortsett fra at mengde fett i lever var lavere i mus som hadde spist fôr med balenin. Med større dyreforsøk, lengre fôring og/eller høyere innhold av balenin i fôret i fremtidige forsøk er det mulig at trendene i resultatene fra dette prosjektet kunne blitt funnet signifikante. Med videre dokumentasjon, forskning og finansiering vil funnene i dette prosjektet derfor kunne være med på å bidra til en bedre totalutnyttelse av hval i fremtiden.

Summary in English:

This project has been financed by FHF and Møre og Romsdal county. The overall objective of the project was to help create a sustainable basis for the development of a new value chain with production of unique health products for the national and international market in the future. This has been done by implementing the following goals:

- Create method that can produce quantitative figures for balenine in various samples from whales.
- Create a research protocol and conduct pilot experiments with mice so that the positive effects and the absence of negative effects of balenine may be uncovered in future larger animal experiments with mice.
- Summarize the results in a final report that will be publicly available for free use by the industry.

The results of the project have shown that balenine can be determined quantitatively in whale samples with the method which was developed and validated in this project. Animal studies with mice showed no negative effects of balenine in the amounts used in the mica trials. No significant positive health effects were uncovered in mouse experiments except that amount of fat in the liver was lower in mice that had eaten feed containing balenine. With larger animal trials, longer feeding and/or higher content of balenine in the feed in future trials, the trends in the results of this project may be found significant. With further documentation, research and financing the findings of this project may contribute to a better overall utilization of harvested whales in the future.

2. Terminologi

DAD	Diode array detektor
FID	Flamme ionisasjonsdetektor
GC/GLC	Gass kromatografi/Gass væskekromatografi
HPLC	Høytrykks væskekromatografi
ICP	Induktivt koblet plasma
IWC	Den internasjonale hvalfangstkommisjonen
LOQ	kvantifiseringsgrense
MS	Massespektrometri
NMR	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi
UV	Ultrafiolett

3. Innledning

Den norske forvaltningen av hval er tuftet på FNs havrettskonvensjon. Hvalforvaltningen er basert på den beste tilgjengelige vitenskapelige kunnskapen om bestanden og på rådene fra Den internasjonale hvalfangstkommisjonen – IWC. Norges offentlige syn i tilknytning til hvalfangst er basert på to viktige hensyn; bærekraft og folkeretten til å høste av de levende marine ressursene. Når hval blir høstet er totalutnyttelse av ressursen viktig. Stortingsmelding 27 fra 2004 påpeker nettopp viktigheten av å utnytte hele hvalen, dette omfatter å benytte både spekk, hjerte og innmat i tillegg til kjøttet ("Norsk sjøpattedyrpolitikk," Det kongelige fiskeridepartementet 2004). IWC har de siste tyve årene vurdert bestanden av vågehval i Nordøst Atlanteren til å bestå av mellom 65 000 til over 100 000 dyr (IWC, <https://iwc.int/estimate>). Det norske kvoten har vært 1286 dyr årlig siden 2010, men hele kvoten har aldri blitt fangstet ("Kvalfangst," <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiske-og-havbruk/hval-og-sel-listeside/kvalfangst/id2001553/>).

Med utvikling av flere produkter som har dokumentert helsevirkning, vil den norske hvalfangsten i større grad kunne utnytte hele kvoten – dobling av dagens fangst – samt bruke alle restråstoffene som i dag går på havet. Den industrielle aktiviteten på hvalspekk og hvalolje har opphørt i Norge. Tidligere norsk forskning (Bjørkekjær og professor Berstad ved Haukeland sykehus) indikerer imidlertid at hvalolje med sin unike fettsyresammensetning, er minst like god og kan være overlegen fiskeolje og tran når det gjelder å forebygge/lindre muskel og skjelettplager.

Nyere prosjekt med forskningsfangst og prøveproduksjoner av olje fra spekk og skjelett underbygger at det sannsynligvis, med anvendelse av ny teknologi, er kommersielt grunnlag for ny industriell produksjon. Laboratorietester viser også at det er mulig å utvinne balenin fra muskelmasse og avskjær av kjøtt. Dette kan gi grunnlag for utvikling av en ny verdikjede med produksjon av unike helsefremmende produkter for et nasjonalt og internasjonalt marked i fremtiden.

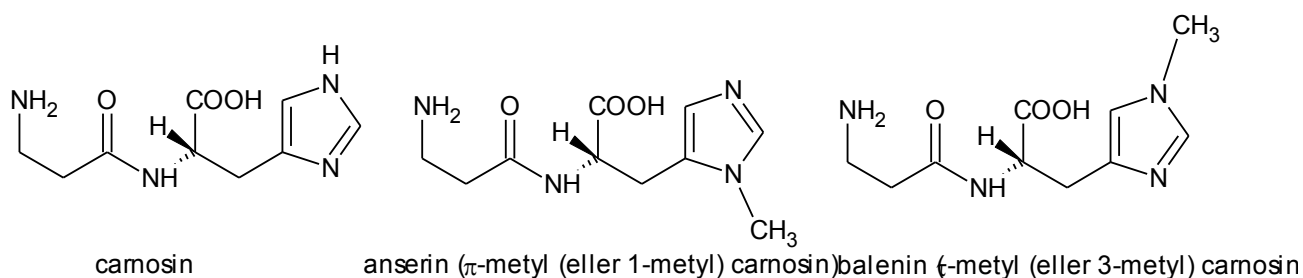
Dette prosjektet har vært et samarbeid mellom NIFES og næringsaktører og har blitt finansiert av FHF og Møre og Romsdal Fylkeskommune. Prosjektgruppen har bestått av Stig Valdersnes, Amund Måge og Livar Frøyland, mens styringsgruppen har bestått av Johnny Torp (MRB AS), Ole M. Myklebust (Myklebust AS) og Steinar Jonassen (NFF)

3.1 Problemstilling og formål

FHF prosjekt nr. 900921 «Kjemisk testing av hvalolje og sammenligning med tidligere produkt av spekk» i forbindelse med prosjektet «helsebringende merverdi – utnyttelse av spekk og skjelett fra Vågehval» har tidligere dokumentert innholdet av positive ernæringskomponenter og fremmedstoff i ulike deler av hvalen. For mer informasjon om dette prosjektet vises det til sluttrapport innsendt til FHF ("Kjemisk testing av hvalolje og sammenligning med tidligere produkt av spekk," <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900921>). Oppdagelsen av balenin indikerer et stort potensial som vil kunne gi en bedre totalutnyttelse av hval.

Histidinholdige dipeptider er imidazolrelaterte forbindelser som bare har blitt påvist i dyr. Slike forbindelser består av varianter av aminosyrene alanin og L-histidin. Forbindelsene er postulert å ha flere positive biologiske funksjoner som pH-buffer, ioneregulator, neurotransmitter, beskyttelse mot frie radikaler, antioksidant og regulering av glukose nivå i blodet (Abe & Okuma, 1991; Baran, 2000; A. Boldyrev, Bulygina, Leinsoo, Petrushanko, Tsubone, & Abe, 2004; Bragadóttir, 2001 ; Dunnett & Harris, 1992; Guiotto, Calderan, Ruzza, & Borin, 2005; Kohen, Yamamoto, Cundy, & Ames, 1988; Leinsoo, Abe, & Boldyrev, 2006; Mei, Cromwell, Crum, & Decker, 1998; Nagai, Nijima, Yamano, Otani, Okumra, Tsuruoka, et al., 2003; Petroff, Hyder, Rothman, & Mattson, 2001; Sauerhofer, Yuan, Braun, Deinzer, Neumaier, Gretz, et al., 2007). Det spekuleres i om disse egenskapene til histidinholdige dipeptider kan gjøre at de kan ha en positiv effekt på blant annet diabetes, demens og kreft (Budzen & Rymaszewska, 2013; Mizuno, Konoha-Mizuno, Mori, Sadakane, Koyama, Ohkawara, et al., 2015). Strukturaktivitets analyser av slike forbindelser indikerer at antioksidant og pH-buffer egenskapene er relatert til imidazoldelen av molekylet mens alanindelen er relatert til metabolisme (A. A. Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013).

Hval er en av få dyrearter som har et høyt innhold av den imidazolrelaterte forbindelsen balenin (Figur 1) i muskelvev (A. A. Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013). Anserin finnes blant annet i sel og fisk, mens mennesker bare har carnosin (A. A. Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013).



Figur 1: Kjemisk struktur til tre imidazolrelaterte dipeptider

Helseeffekter av balenin er lite undersøkt i litteraturen og det meste som er gjort på imidazolrelaterte forbindelser er gjort på carnosin. Litteratursøk for å bestemme viktigste biokjemiske virkning som kan avdekkes i dyreforsøk (endepunkt/helseeffekt) og eventuelle negative effekter eller fravær av slike må derfor undersøkes gjennom dyreforsøk.

Den overordnede målsettingen med prosjektet har vært å bidra til å skape et bærekraftig grunnlag for utvikling av en ny verdikjede med produksjon av unike helsefremmende produkter for et nasjonalt og internasjonalt marked i fremtiden. Dette har blitt gjort ved å gjennomføre følgende delmål:

- Lage metode som kan produsere kvantitative tall for balenin i ulike prøver fra hval.
- Lage forsøksprotokoll og gjennomføre pilot dyreforsøk slik at positive effekter og fravær av negative effekter av balenin kan dokumenteres i fremtidige større dyreforsøk med mus.
- Skrive avslutningsrapport med alle resultater som vil bli offentlig tilgjengelig til benyttelse for hele næringen.

3.2 Regelverk

Det vil kreve flere års forskning og utvikling med både dyreforsøk og humane forsøk for å kunne dokumentere en godkjent og positiv helsepåstand. EU og Norge har nedfelt slike krav i Reg. 2006/1924 cons. leg «..on nutrition and health claims made on foods». Dette er implementert i Norsk lov gjennom «forskrift om ernærings- og helsepåstander om næringsmidler». Dyreforsøkene i dette prosjektet var godkjent av Forsøksdyrutvalget (FOTS godkjenning # 5358).

3.3 Stoffgruppene som er inkludert i prosjektet

Prosjektet har hatt fokus på validering av metode for balenin-bestemmelse i prøver fra hval. I tillegg ble næringssammensetningen av baleninpulveret bestemt med en rekke ulike målemetoder. Innholdet av basiske aminosyrer ble bestemt i ulike prøver av forsøksdyrene etter museforsøk. Kroppssammensetning av mus og fettprosent i muselever ble videre bestemt med NMR.

4. Prosjektgjennomføring

4.1 Prøver

Prøvene som ble sendt inn av næringsaktører i løpet av prosjektet var hvalkjøtt og baleninekstrakt. Etter at prøvene ankom NIFES ble prøvene gitt et journalnummer, den medfølgende informasjonen om prøvene ble lagt inn i NIFES sitt laboratorieinformasjonshåndteringssystem (LIMS) og aktuelle analyser ble lagt på prøvene.

4.2 Analysemetoder

Baleninpulveret ble analysert for en rekke næringsstoff slik at optimal sammensetning av føret kunne bestemmes. Resultatene fra analysene av baleninpulveret er gitt i Vedlegg 1, bortsett fra resultatene fra bestemmelsen av balenin som finnes i Vedlegg 2. En oversikt over prinsippene for analysemetodene er gitt under, bortsett fra metoden for baleninbestemmelse som finnes i Vedlegg 2.

4.2.1 Næringsstoff

Metode 247: Fysiologisk aminosyrebestemmelse i pulver, ninhydrindeteksjon

Innveid homogenisert prøve ekstraheres med ekstraksjonsreagens. Proteinene felles med presipitasjonsreagens. Deretter sentrifugeres prøven, pH justeres før prøven fortynnes og filtreres. Tilslutt bestemmes prøven ved ionebytting og ninhydrinderivatisering og deteksjon ved 570 nm og 440 nm. Metoden bestemmer 31 aminosyrer.

Metode 339: Totalfett, bestemmelse ved hjelp av syrehydrolyse, minimetode

Innveid prøvemengde pre-ekstraheres med n-heptan i sentrifugerør. Ekstraktet pipetteres av fra den faste rest etter sentrifugering og ekstraktet dampes inn og inndampingsresten veies. Den faste resten hydrolyseres med varm saltsyre og n-heptan i minimum to timer i varmeskap. Heptanfasen overføres til LLE-kolonne. Fettet ekstraheres med petroleumbensin og overføres til ekstraksjonsrør, løsemiddelet dampes av og

inndampingsresten veies. Totalt fettinnhold (g/100g) beregnes ut fra summen av vekten av de to inndampingsrestene og innveid mengde prøve.

Metode 41: Fettsyresammensetning av totalfettsyrer ved hjelp av GLC

Innveid homogenisert prøve tilsettes internstandard og ekstraheres med kloroform/metanol. Prøvene filtreres og dampes inn før de forsåpes med natrium hydroksid løst i metanol med bortrifluorid som katalysator. Deretter ekstraheres de forsåpede fettsyrene med heksan. Prøven bestemmes med GC-FID analyse og internstandardkvantifisering. Metoden bestemmer 45 fettsyrer med varierende kjedelengder og grader av umetting.

Metode 366: Aminosyrebestemmelse i hydrolysat vha UPLC

Innveid prøve tilsettes internstandard og hydrolyseres i 6M saltsyre. Etter hydrolyse blir saltsyren fjernet ved hjelp av vakuum. Prøven tilsettes vann, filtreres og derivatiseres med Accq.Tag reagens. Analysen blir gjort med HPLC og UV-deteksjon og innholdet kvantifiseres ved hjelp av intern standard og ekstern standardkurve.

Metode 243: Histamin, bestemmelse vha HPLC

Innveid prøve ekstraheres med fortennet perklorsyre. Ekstraktet derivatiseres med dansylklorid og innholdet blir bestemt ved hjelp av HPLC og UV-deteksjon.

Metode 266: Total Kolesterol bestemmelse ved hjelp av GLC

Innveid prøve forsåpes og det uforsåpbare materialet ekstraheres. Ekstraktet dampes inn, fortynnes og analyseres med GC-FID. Innholdet beregnes med internstandard og responsfaktor.

Metode 093: TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), bestemmelse ved bruk av spektrofotometer

Innveid prøve ekstraheres ved Bligh and Dyer ekstraksjon. En alikvot av metanol:vann fasen tilsettes thiobarbituric acid i overskudd og varmes. Absorpsjonen ved 532 nm måles og innholdet beregnes vha standardkurve. Metoden måler vesentlig malondialdehyd men andre aldehyder kan gi utslag.

049 - Vitamin A bestemmelse ved hjelp av HPLC

Innveid prøve forsåpes og det uforsåpbare materialet ekstraheres. Prøven analyseres på HPLC-DAD og innholdet bestemmes ved hjelp av ekstern standardkurve.

Metode 036: Vitamin D3/D2 bestemmelse ved hjelp av HPLC

Innveid prøve forsåpes og det uforsåpbare materialet ekstraheres. Prøven renses på en preparativ normalfasekolonne og fraksjonen som inneholder vitamin D2 og D3 samles. Samlet fraksjon analyseres deretter på en analytisk reversfasekolonne og innholdet av vitamin D3/D2 bestemmes ved hjelp av UV-detektor og innholdet beregnes ved hjelp av intern standard.

251 - Tokoferol og tokotrienol- isomer bestemmelse ved hjelp av HPLC

Innveid prøvemengde forsåpes og det uforsåpbare materialet ekstraheres. Vitamin E (α , β , γ , δ -tokoferol og α , β , γ , δ -tokotrienol) analyseres med HPLC og bestemmes med fluorescensdetektor. Innholdet beregnes ved bruk av ekstern standardkurve.

4.2.2 Elementer og råanalyser

Metode 099: Aske bestemmelse - gravimetrisk metode

Med aske menes den uorganiske rest som gjenstår etter at vann og organisk materiale er brent av i nærvær av luftas oksygen. Foraskningen utføres i muffelovn ved 550 ± 5 °C og ved normalt trykk.

Metode 171: Råproteinbestemmelse ved hjelp av nitrogenanalysator

Metoden benytter seg av forbrenning av prøven i nærvær av oksygen, Dumas metode.

Metode 097: Tørrstoffbestemmelse ved 104 °C

Vanninnholdet i en prøve er definert som den vektdifferanse som oppstår i prøven etter tørking ved 104 °C.

Metode 197: Multielement bestemmelse med induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS) etter våtoppslutning i mikrobølgeovn.

Innveid homogenisert prøve tilsettes konsentrert salpetersyre og hydrogenperoksid og oppsluttes i mikrobølgeovn. Bestemmelsen gjøres med ICP-MS og elementkonsentrasjonene beregnes ved hjelp av ekstern standardkurve. Metoden bestemmer 16 elementer/grunnstoffer.

4.3 Oppsett museforsøk

For å undersøke eventuelle biologiske effekter av hvalpulver (balenin-innhold ~60 mg/ g), ble det gjennomført to musestudier. I det første, som var et korttidsstudie på 2 uker, undersøkte vi biotilgjengelighet av balenin fra eksperimentelt fôr i musene ved å fôre dietter med og uten balenin, for deretter å måle innhold av balenin, samt beta-alanin og 3-metylhistidin i ulike vev fra musene. I det andre forsøket ville vi undersøke om inntak av balenin kunne påvirke kroppsammensetning og aktivitetsnivå i mus. En nytt sett med mus spiste derfor diettene i 4 uker, og underveis målte vi spist mengde energi, vekst, kroppsammensetning ved hjelp av NMR og frivillig løping ved hjelp av løpehjul med elektronisk registrering av omdreininger, som ble plassert i burene under forsøket. I begge forsøkene ble mus gitt dietter med en sammensetning med hensyn til energi fra makronæringsstoffer lik en typisk Vestlig diett (16 energi% protein, 35 energi% fett og 49 energi% karbohydrater). I kontrolldietten (WD casein) var kasein (melkeprotein) proteinkilden, mens alt kaseinet var erstattet med hvalpulver i balenindietten (WD Balenin). Dette gav en baleninkonsentrasjon i fôret på omtrent 10 mg/ g diett. I begge forsøkene ble unge hannmus av type C57Bl/6J benyttet. Disse musene utvikler fedme og fedme-relaterte problem.

5 Resultater

Resultatene for hvert hovedmål i prosjektet er gitt under.

5.1 Metodeutvikling og validering av metode for baleninbestemmelse

Etter at resterende metodearbeid var utført (delmål 1) ble metoden validert på baleninekstrakt og hvalkjøtt med henblikk på å dokumentere metodens egenskaper (delmål 2). Valideringsrapport (delmål 3) finnes i vedlegg 2.

5.2 Dyreforsøk

5.2.1 Litteratursøk, definering av endepunkt og forsøksplanlegging

Litteratursøk viste at det meste som er gjort på imidazolrelaterte dipeptider er gjort på andre forbindelser enn balenin, i hovedsak carnosin og anserin. På grunn av dette ble det besluttet at det var nødvendig å gjennomføre et pre-pilotforsøk for å avdekke om baleninet ble tatt opp i musene (absorbent) gjennom fôret og om det hadde akutte negative effekter på musene. I pilotprosjektet besluttet prosjektgruppen i samråd med næringsaktørene i referansegruppen å fokusere på om balenin kunne stimulere til økt aktivitet og dermed forhindre utvikling av

fedme. Aktivitetsnivå, kroppssammensetning, energiomsetning og fett i lever ble derfor satt som endepunkt når museforsøket ble planlagt. Forsøkene ble satt opp som beskrevet i 4.3 og resultatene er beskrevet i 5.2.2.

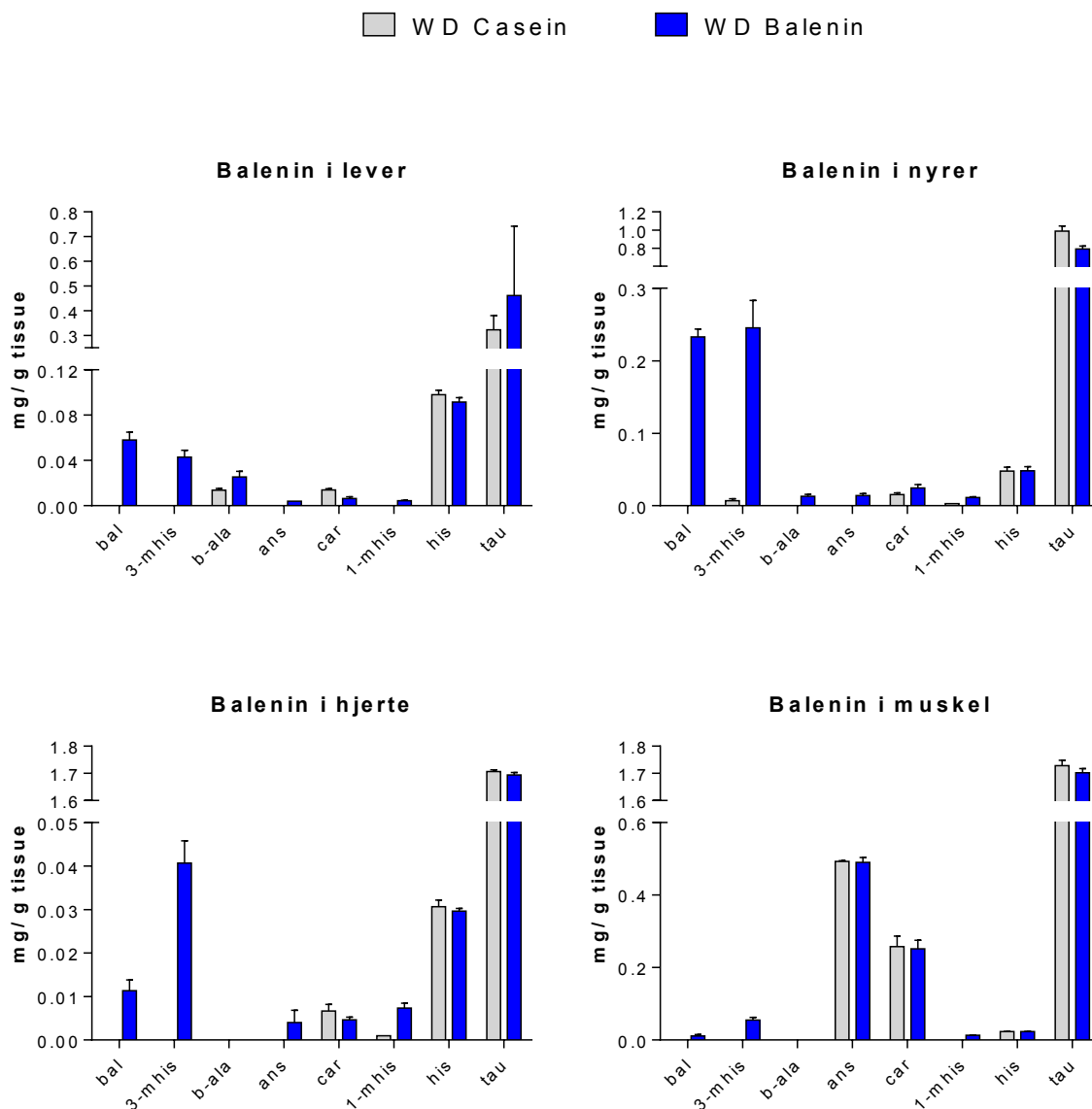
5.2.2 Pre-pilot dyreforsøk og pilotforsøk

Pre-pilot dyreforsøk.

Ni mus per gruppe ble gitt de to diettene, men fra hver diettgruppe ble vev fra 3 mus slått sammen, slik at måledata er basert på n=3 per diettgruppe. Musene spiste godt og vokste normalt i pilotstudien. Som fremgår i Figur 2, fant vi balenin i lever, nyrer, hjerte, og i mindre konsentrasjon i muskel fra mus som hadde spist hvalpulveret, mens balenin ikke kunne detekteres i vev fra musene som hadde spist kontrollfôret. Videre ble det funnet forhøyede vevsnivåer av 3-metyl histidin, og forhøyede nivå av beta-alanin i lever og nyrer fra, i mus som hadde spist hvalpulver (Figur 2).

Konklusjon:

Balenin blir tatt opp i mus fra dietten, og noe av dipeptidet balenin bevares intakt i vev, mens noe av baleninet blir splittet til aminosyrene beta-alanin og 3-metylhistidin.



Figur 2. Balenin taes opp fra dietten i mus og gjenfinnes i vev. Mus spiste WD kasein (kontroll) eller WD balenin fôr i 2 uker. Deretter ble mus avlivet uten faste, vev dissekert ut og analysert ved etablert balenin analysemetode. Resultat er vist som gjennomsnitt + standardfeil (n=3). Forkortelser: balenin (bal), 3-metylhistidin (3-mhis), beta-alanin (b-ala), anserin = beta-alanine + 1 metylhistidine (ans), carnosine = beta-alanine + histidine (car), 1 metylhistidine (1-mhis), histidin (his), taurine (tau).

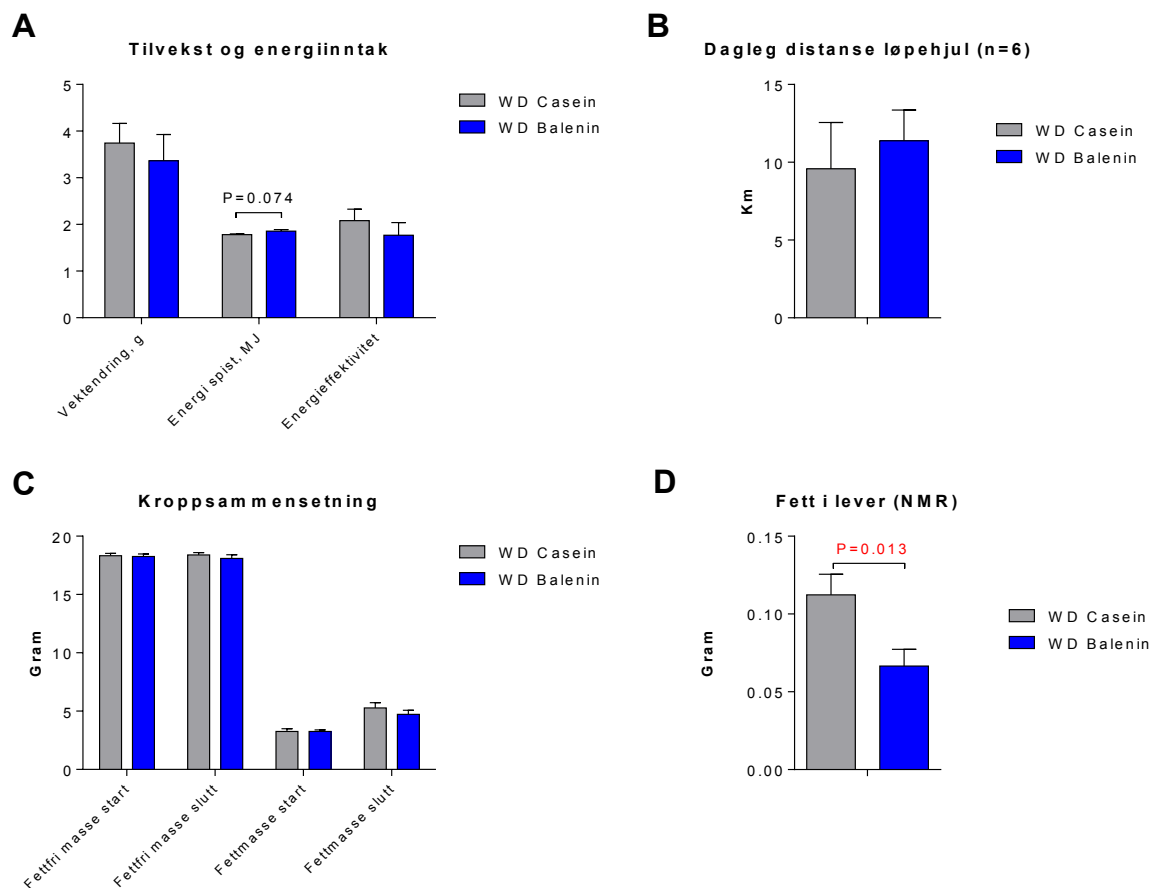
Pilotforsøk.

I oppfølgingsforsøket fikk et nytt sett med mus (n=12 per gruppe) spise diettene i 4 uker, og vi ville undersøke om dietter med balenin kunne stimulere til økt aktivitet og dermed forhindre utvikling av fedme. Det var ingen forskjell i tilvekst, eller energieffektivitet (tilvekst per spist mengde energi), men musene som fikk balenin i fôret tenderte til å spise mer (Figur 3A). Vi fant ingen forskjell i frivillig løping på løpehjul eller kroppsammensetning mellom

diettgruppene i forsøket (Figur 3B, C). Derimot observerte vi at mus som fikk balenin-fôret hadde mindre fett i lever etter forsøket (Figur 3D). Dette er interessant fordi en økt mengde fett i lever kan være en tidlig indikator på senere utvikling av hjerte- og karsyke og type 2 diabetes.

Konklusjon:

Balenin i fôret ser ikke ut til å påvirke frivillig aktivitet eller kroppsammensetning i mus som spiste dietter i 4 uker. Mengde fett i lever var lavere i musene som hadde spist fôr med balenin.



Figur 3. Mindre leverfett i mus som fikk balenin i fôret. Mus spiste WD kasein (kontroll) eller WD balenin fôr i 4 uker. Mellom diett-gruppene var det ingen forskjell i vekt-ending, spist mengde eller energieffektivitet (g tilvekst/ MJ spist energi) (A), i frivillig distanse løpt på løpehjul (B), eller i kroppsammensetning (C). Etter 4 vekers fôring hadde mus som fikk WD Balenin-diett lavere fett i lever (D). Resultat er vist som gjennomsnitt + standardfeil (n=12, unntatt i B; n=6). Forkortelse: Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR).

6 Leveranser

Resultatene i prosjektet har vist potensialet for at med mer forskning kan balenin fra hval danne grunnlag for utvikling av en ny bærekraftig verdikjede med produksjon av unike helsefremmende produkter fra vågehval for et nasjonalt og internasjonalt marked. Dette kan komme i tillegg til bedre utnyttelse av det marine fettene på hvalen som i dag i liten grad blir brukt.

Prosjektet har levert:

- en validert metode som kan bestemme balenin i ekstrakter fra hval og hvalkjøtt.
- preforsøk og pilot museforsøk viste ingen negative effekter av balenin på mus i de mengdene som ble brukt, mens de undersøkte positive effektene ikke ble funnet signifikante bortsett fra at musene som fikk føret med balenin hadde mindre mengde fett i lever.
- denne avslutningsrapporten med alle resultater fra prosjektet som vil bli offentlig tilgjengelig til fri benyttelse for hele næringen.

7 Videre arbeid

For å dokumentere de postulerte helsemessig gunstige effektene av balenin, samt å evaluere eventuelle negative effekter, er det nødvendig med ytterligere dyreforsøk. I en framtidig forlengelse av prosjektet er det derfor nødvendig å gjøre større og mer omfattende dyreforsøk slik at forventede positive helseeffekter av balenin kan avdekkes før humane spiseforsøk kan initieres i fremtiden.

8 Referanser

- Abe, H., & Okuma, E. (1991). EFFECT OF TEMPERATURE ON THE BUFFERING CAPACITIES OF HISTIDINE-RELATED COMPOUNDS AND FISH SKELETAL-MUSCLE. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(11), 2101-2107.
- Baran, E. J. (2000). Metal complexes of carnosine. *Biochemistry-Moscow*, 65(7), 789-797.
- Boldyrev, A., Bulygina, E., Leinsoo, T., Petrushanko, I., Tsubone, S., & Abe, H. (2004). Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 137(1), 81-88.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF CARNOSINE. *Physiological Reviews*, 93(4), 1803-1845.
- Bragadóttir, M. (2001). *Endogenous antioxidants in fish*.
- Budzen, S., & Rymaszewska, J. (2013). The Biological Role of Carnosine and Its Possible Applications in Medicine. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22(5), 739-744.
- Dunnett, M., & Harris, R. C. (1992). DETERMINATION OF CARNOSINE AND OTHER BIOGENIC IMIDAZOLES IN EQUINE PLASMA BY ISOCRATIC REVERSED-PHASE ION-PAIR HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 579(1), 45-53.
- Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P., & Borin, G. (2005). Carnosine and carnosine-related antioxidants: A review. *Current Medicinal Chemistry*, 12(20), 2293-2315.
- IWC. (<https://iwc.int/estimate>). International Whaling Commission - Whale Population Estimates.
- Kjemisk testing av hvalolje og sammenligning med tidligere produkt av spekk. (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900921>).
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., & Ames, B. N. (1988). ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CARNOSINE, HOMOCARNOSINE, AND ANSERINE PRESENT IN MUSCLE AND BRAIN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(9), 3175-3179.
- Kvalfangst. (<https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiske-og-havbruk/hval-og-sel-listeside/kvalfangst/id2001553/>).
- Leinsoo, T. A., Abe, H., & Boldyrev, A. A. (2006). Carnosine and related compounds protect the double-chain DNA from oxidative damages. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 42(5), 570-574.
- Mei, L., Cromwell, G. L., Crum, A. D., & Decker, E. A. (1998). Influence of dietary beta-alanine and histidine on the oxidative stability of pork. *Meat Science*, 49(1), 55-64.
- Mizuno, D., Konoha-Mizuno, K., Mori, M., Sadakane, Y., Koyama, H., Ohkawara, S., & Kawahara, M. (2015). Protective activity of carnosine and anserine against zinc-induced neurotoxicity: a possible treatment for vascular dementia. *Metallomics : integrated biometal science*, 7(8), 1233-1239.
- Nagai, K., Nijima, A., Yamano, T., Otani, H., Okumra, N., Tsuruoka, N., Nakai, M., & Kiso, Y. (2003). Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Experimental Biology and Medicine*, 228(10), 1138-1145.
- Norsk sjøpattedyrpolitikk. (Det kongelige fiskeridepartementet 2004). *St.meld.nr.27*.
- Petroff, O. A. C., Hyder, F., Rothman, D. L., & Mattson, R. H. (2001). Topiramate rapidly raises brain GABA in epilepsy patients. *Epilepsia*, 42(4), 543-548.
- Sauerhofer, S., Yuan, G., Braun, G. S., Deinzer, M., Neumaier, M., Gretz, N., Floege, J., Kriz, W., van der Woude, F., & Moeller, M. J. (2007). L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*, 56(10), 2425-2432.

9 Vedlegg

Vedlegg 1: Analyse av baleninpulver

Analyse	Analytt	Innhold	Enhet
Aske	Aske	6	g/100 g
Fysiologisk aminosyrebestemmelse	1-MHIS	0.25	mg/g
	3-MHIS	0.23	mg/g
	AABA	0.14	mg/g
	ALA	4.4	mg/g
	AMM	1.8	mg/g
	ANS	4.6	mg/g
	ARG	0.46	mg/g
	ASN	0.59	mg/g
	ASP	0.84	mg/g
	CAR	5.7	mg/g
	CITR	0.50	mg/g
	GABA	1.3	mg/g
	GLU	3.2	mg/g
	GLY	1.3	mg/g
	HIS	0.79	mg/g
	ILE	2.8	mg/g
	LEU	9.6	mg/g
	LYS	1.7	mg/g
	MET	2.1	mg/g
	NOR	0.16	mg/g
	ORN	0.79	mg/g
	PEA	0.021	mg/g
	PHE	3.6	mg/g
	PRO	0.54	mg/g
	SER	1.4	mg/g
	TAU	0.81	mg/g
	THR	1.9	mg/g
TRP	0.48	mg/g	
TYR	0.64	mg/g	
UREA	4.5	mg/g	
VAL	3.2	mg/g	
Totalfett	Totalfett syrehydrolyse	<LOQ	g/100 g
Fettsyresammensetning	14:1n-9	0.01	mg/g
	16:1n-7	0.46	mg/g
	16:1n-9	0.02	mg/g
	16:2n-4	0.02	mg/g
	16:3n-3	0.01	mg/g
	16:4n-3	0.05	mg/g
	18:1n-11	0.06	mg/g
	18:1n-7	0.26	mg/g
	18:1n-9	0.85	mg/g
	18:2n-6	0.07	mg/g

Analyse	Analytt	Innhold	Enhet
	18:3n-3	0.02	mg/g
	18:3n-6	<LOQ	mg/g
	18:4n-3	0.07	mg/g
	20:1n-11	0.07	mg/g
	20:1n-7	0.03	mg/g
	20:1n-9	0.84	mg/g
	20:2n-6	0.01	mg/g
	20:3n-3	<LOQ	mg/g
	20:3n-6	<LOQ	mg/g
	20:3n-9	<LOQ	mg/g
	20:4n-3	0.03	mg/g
	20:4n-6	0.01	mg/g
	20:5n-3 EPA	0.14	mg/g
	21:5n-3	0.01	mg/g
	22:1n-11	0.83	mg/g
	22:1n-9	0.09	mg/g
	22:4n-6	0.01	mg/g
	22:5n-3	0.02	mg/g
	22:5n-6	<LOQ	mg/g
	22:6n-3 DHA	0.11	mg/g
	24:1n-9	0.03	mg/g
	24:5n-3	<LOQ	mg/g
	24:6n-3	<LOQ	mg/g
	n-3/n-6	4	mg/g
	Sum 16:1	0.47	mg/g
	Sum 18:1	1.2	mg/g
	Sum 20:1	0.94	mg/g
	Sum 22:1	0.92	mg/g
	Sum en-umettet	3.5	mg/g
	Sum EPA + DHA	0.25	mg/g
	Sum fettsyrer	6.1	mg/g
	Sum flerumettet	0.60	mg/g
	Sum identifiserte	5.8	mg/g
	Sum mettet	1.7	mg/g
	Sum n-3	0.46	mg/g
	Sum n-6	0.11	mg/g
	Sum uidentifiserte	0.32	mg/g
	06:00	<LOQ	mg/g
	08:00	0.01	mg/g
	10:00	0.02	mg/g
	12:00	0.01	mg/g
	14:00	0.45	mg/g
	15:00	0.03	mg/g
	16:00	0.92	mg/g

Analyse	Analytt	Innhold	Enhet
	17:00	0.02	mg/g
	18:00	0.18	mg/g
	20:00	0.01	mg/g
	22:00	<LOQ	mg/g
	24:00	0.01	mg/g
Aminosyrebestemmelse	ALA	53	mg/g
	ARG	49	mg/g
	ASP	64	mg/g
	GLU	115	mg/g
	GLY	72	mg/g
	HIS	23	mg/g
	HYP	23	mg/g
	ILE	26	mg/g
	LEU	53	mg/g
	LYS	68	mg/g
	MET	15	mg/g
	PHE	24	mg/g
	PRO	46	mg/g
	SER	28	mg/g
	TAU	0.7	mg/g
	THR	30	mg/g
TYR	15	mg/g	
VAL	32	mg/g	
Histamin	Ace_Spermidin	<LOQ	mg/kg
	Ace_Spermin	<LOQ	mg/kg
	Cadaverin	710	mg/kg
	Histamin	65	mg/kg
	Phenylethylamin	92	mg/kg
	Putrescin	120	mg/kg
	Serotonin	<LOQ	mg/kg
	Spermidin	<LOQ	mg/kg
	Spermin	9.4	mg/kg
	Tyramin	560	mg/kg
Elementer	Ag	<LOQ	mg/kg
	As	0.64	mg/kg
	Ba	<LOQ	mg/kg
	Cd	0.019	mg/kg
	Co	<LOQ	mg/kg
	Cu	1.2	mg/kg
	Fe	68	mg/kg
	Hg	0.27	mg/kg
	Mn	0.66	mg/kg
	Mo	<LOQ	mg/kg
	Pb	<LOQ	mg/kg

Analyse	Analytt	Innhold	Enhet
	Se	0.54	mg/kg
	Sn	<LOQ	mg/kg
	Sr	1.2	mg/kg
	V	0.012	mg/kg
	Zn	8	mg/kg
Kolesterol	Kolesterol	30	mg/kg
Protein	Protein	94	g/100 g
TBARS	TBARS	247	nmol/g
Tørrstoff	Tørrstoff	96	g/100 g
Vitamin A	Vitamin A1	<LOQ	mg/kg
	Vitamin A2	<LOQ	mg/kg
Vitamin D	Vitamin-D3	0.04	mg/kg
Vitamin E	Vitamin E (alfa- tokoferol)	0.43	mg/kg
	Vitamin E (alfa- tokotrienol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (beta- tokoferol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (beta- tokotrienol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (delta- tokoferol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (delta- tokotrienol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (gamma- tokoferol)	<LOQ	mg/kg
	Vitamin E (gamma- tokotrienol)	<LOQ	mg/kg

Vedlegg 2: Valideringsplan og rapport for metode for baleninbestemmelse

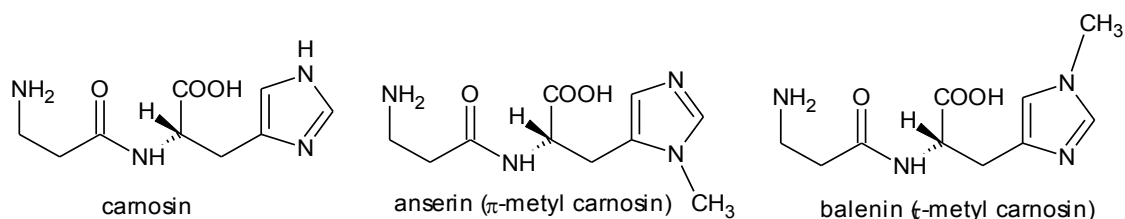
NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 1 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

GENERELL DEL AV PLAN:

1. INNLEDNING

Akvatiske pattedyr som hval og sel har et høyt innhold av imidazolrelaterte forbindelser (Figur 1) som balenin i muskelvev. Slike forbindelser er postulert å ha flere positive biologiske funksjoner som pH-buffer, ioneregulator, neurotransmitter, beskyttelse mot frie radikaler, antioksidant og regulering av glukose nivå i blodet.



Figur 1: Kjemisk struktur til tre imidazolrelaterte dipeptider

Forskere ved NIFES har lenge jobbet med imidazolrelaterte forbindelser i organer hos fisk i forbindelse med å definere behov for histidin i fiskefôr for å dekke både vekst og hindre utvikling av øyelidelsen katarakt hos laks. Anserin utgjør normalt opptil halvparten av de frie aminosyrene i laksens muskel, mens andre histidinforbindelser dominerer i linsen og andre organer. Siden slike forbindelser er vannløselige vil de normalt ikke finnes i oljer. Metoden som skal valideres for baleninbestemmelse tar utgangspunkt i allerede eksisterende metodikk på NIFES (metode 247) for bestemmelse av carnosin og anserin, siden alle disse forbindelsene er nært beslektet. Målet med valideringen er at det også skal kunne utgis kvantitative tall på innholdet av balenin slik som det gjøres for carnosin og anserin allerede. Siden balenin er en komponent som har svært like egenskaper til de andre basiske aminosyrene med imidazolring vil den inngå mot slutten av kromatogrammet sammen med de basiske aminosyrene som en tilleggskomponent

2. METODENS PRINSIPP

Aminosyrer, peptider og løselig protein ekstraheres v.h.a ekstraksjonsreagens. Proteinet fjernes v.h.a felling men presipitasjonsreagens. Prøvene sentrifugeres, pH justeres, fortynnes og filtreres. Innholdet av aminosyrene bestemmes v.h.a. ionebytting med påfølgende ninhydrin-deteksjon.

3. TIDSPLAN OG PERSONELL

Dette arbeidet blir gjennomført på Næringsstoff laboratorium ved NIFES tilknyttet et prosjekt 10087000 hvalolje i 2014 med SVA som ansvarlig forsker.

ABI skal være analytikere under valideringen. ABI skriver valideringsplan og valideringsrapport. Rapporten gjennomgås av prosjektansvarlig forsker. Arbeidet med rapporten skal være ferdig innen utgangen av desember 2014.

4. UTSTYR OG INSTRUMENTERING

Det skal kun benyttes utstyr som står i metodeteksten.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Sidenr: 2 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

5. REAGENSER, LØSNINGER, PRØVER OG REFERANSEMATERIALER

Løsninger og kjemikalier

Ingen kjemikalier og løsninger utover det som står i metodebeskrivelsen skal benyttes.

5.2 Standard

- 2,5 mM (2,5 µmol/ml) fysiologiske aminosyrer sure og nøytrale aa standard fra Sigma
- 2,5 mM (2,5 µmol/ml) fysiologiske aminosyrer basiske aa standard fra Sigma
- 10 mM (2,5 µmol/ml balenin) laget av kjemikalier fra Hamari Chemicals, Ltd.

5.2.1. Standarder til balenin linearitetsbestemmelse n=7

Konsentrasjon balenin i standard	FAA sure 2,5 mM	FAA basiske 2,5 mM	Norleucin 2,5 mM	Balenin 10,0 mM	Loading Buffer	Totalvolum
1. 2,5 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	0,0 µl	200 µl
2. 2,25 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	45 µl	5,0µl	200 µl
3. 2,0 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl
4. 1,5 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	37,5 µl	62,5 µl	250 µl
5. 1,0 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl	75 µl	250 µl
6. 0,5 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl	87,5 µl	250 µl
7. 0,2 µmol/ml	50 µl	50 µl	50 µl	5,0 µl	95 µl	250 µl

5.3 Prøver

Følgende matriser skal valideres:

Frysetørket hvalkjøtt og baleninpulver.

Alle resultater skal oppgis i mg balenin / g prøve.

6. METODEBESKRIVELSE

Se metodebeskrivelse; metode 394.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Sidenr: 3 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

VALIDERINGSDEL AV PLAN:

7. VALIDERING

Følgende parametere skal vurderes i valideringen:

Spesifisitet (Selektivitet)

Det skal analyseres 6 blankprøver (prøve uten matriks og analytt). Blankprøven skal sammenlignes med en matriks som inneholder analytt. Blankprøven skal tilsettes norleucin som intern standard.

Separasjon

Det bør ikke fremkomme noen forurensede topper i blankprøver, prøver eller standard som kan forstyrre bestemmelsen av balenin. Ved eventuell kromatografisk overlapp skal innflytelsen til den overlappende toppen på resultatet for balenin estimeres.

Toppfasong

Toppfasong skal være tilsvarende for prøve og standard.

Matriseeffekter

Matriseeffekter skal undersøkes ved å sammenligne retensjonstid til balenin i standard og prøver.

Lineært område (LO)

Det lineære området bestemmes ved å analysere baleninstandarder med ulike konsentrasjoner.

Følgende grenser for regresjonsparametere skal gjelde:

Krumningskoeffisient (n-verdi) bør ligge mellom 0,9 og 1,1.

Korrelasjonskoeffisienten R må minimum være 0,99.

Følgende konsentrasjoner av balenin skal benyttes i standardkurven, n=7:
0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.25, og 2.5 µmol/ml

Det skal analyseres 2 standardkurver pr.dag. Dette skal gjøres 2 ganger.

Verdi for vinkelkoeffisient(a) og skjæringspunkt(b) skal bestemmes ($y=ax+ b$), samt krumningskoeffisient (n) og regresjonskoeffisient (R) og resultatene skal legges inn i tabell. Kurven tvinges gjennom origo og b er dermed lik 0. Utskrifter over areal og standardkurver fra Empower skal legges i valideringsperm.

Deteksjonsgrense (LOD)/Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Blankprøvene som analyseres under spesifisitet benyttes til å bestemme LOD og LOQ. Disse bestemmes henholdsvis som 3 og 10 ganger signal/støy forhold i blanken. Ideelt sett burde signal/støy forhold i en relevant matriks uten analytt vært bestemt, men dette er vanskelig å finne.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Sidenr: 4 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

For å bestemme LOD og LOQ velges et område på baselinjen der balenintoppen forventes, dette forstørres opp og en topp som kan være representativt for balenin velges ut. Toppen integreres som prøver og LOD og LOQ bestemmes.

Tabell:

Areal av støyttopp, areal støyttopp x 3 og areal støyttopp x 10 legges inn i tabell.

Riktighet

Vi har lenge bestemt fysiologiske aminosyrer på NIFES, med det har vært vanskelig å bestemme riktighet når det ikke er noen ringtester på markedet. Balenin er et nytt dipeptid som ikke analyseres andre steder i Europa og det er derfor ikke noe referanser til riktighet.

Riktighet blir derfor bestemt ut ifra å kjøre gjenfinningsforsøk.

Riktigheten (som gjenfinning) skal ligge mellom 80 – 120 %.

I tillegg skal andre fysiologiske aminosyrer bestemmes i prøvene både med eksisterende metode og metoden som valideres for balenin og resultatene sammenlignes.

Presisjon

Repetierbarhet

Presisjon som repeterbarhet skal regnes ved å analysere 10 paralleller av samme prøve på ett nivå samme dag. Her har vi valgt et baleninpulver som vi skal bruke til internt kontrollmateriale. Det skal beregnes gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik. Resultatene skal legges inn i tabell.

Intern reproducerbarhet

Følgende prøvematiser skal benyttes: Frysetørket hvalkjøtt og baleninpulver.

Matrisene over skal analyseres over 5 dager med 2 paralleller hver gang. Forskjellige analytikere er å foretrekke. Det skal helst være en uke mellom hver analyse. Det skal beregnes gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik, og resultatene skal føres inn i tabeller.

Måleområde (MO)

Skal fastsettes etter vurdering av de øvrige valideringsparameterne.

Måleusikkerhet (MU)

Vurderes ut fra intern reproducerbarhet og riktighet. MU skal fastsettes i hele metodens måleområde og kan om nødvendig deles inn i flere nivå som for eksempel lavt, middels og høyt. Bidrag til måleusikkerhet skal vurderes. Punkt som bør vurderes er bl.a. homogenitet, innveining, fortynning, etc. Resultater fra innkjøring av metode kan benyttes her. Vurdering av bidrag til måleusikkerhet skal klassifiseres som ubetydelig bidrag, middels bidrag og stort bidrag og legges inn i tabell.

Robusthet

En indikasjon på metoden robusthet fås ved å analysere parallelle prøver over tid med varierende betingelser (opparbeidelsesmetode, kolonner, reagenser, mobilfaser, løsninger etc.). Variasjon av kontrollprøven vil over tid

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 5 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

gi informasjon om metodens robusthet. Det er ikke mulig å få full oversikt over metodens robusthet i løpet av den relativt korte valideringen, men midlertidige konklusjoner skal formuleres med bakgrunn i erfaring fra valideringen og tilsvarende erfaring med anserin og carnosin over mange år.

Utførelse

Utførelse av validering er beskrevet under hver valideringsparameter i teksten over.

HMS

For utfyllende opplysninger se valideringsdokument kapittel 5 (teori) og 9 (praktisk eksempel)

Dato/Signatur:

Anita Birkenes

Stig Valdersnes

Annbjørg Bøkevoll

.....
Forfatter Vitenskapelig metodeansvarlig

.....
Avdelingsleder/forskningsjef

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 6 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Rapport del:

8. RESULTATER OG DRØFTING:

8.1 Avvik fra generell del

Det var ingen avvik i rapporten i forhold til planen.

8.2 Resultater fra valideringsparameterne

Spesifisitet (Selektivitet)

Separasjon

Det er kjørt 6 blankprøver (prøve uten matris og analytt). Det er ikke funnet topper i blankprøven som kan interferere med balenin.

OPPLØSNINGSEVNE MELLOM CARNOSIN-BALENIN OG BALENIN-ARGININ					
ved 0.5µmol/ml					
Aminosyre	t ₁	t _{w end}	t _{w start}	t _{w1}	R _{s1-2}
Carnosin	117.08	118.00	116.40	1.6	0.95
	t ₂			t _{w2}	
Balenin:	118.67	119.62	117.88	1.74	
	t ₃			t _{w3}	R _{s2-3}
Arginin	121.47	122.48	120.68	1.8	1.58
$R_s = (-t_1 - t_2) / (1/2)(t_{w1} + t_{w2})$					
t = retensjonstid					
tw = båndbredden					

Tabell 1: Oppløsningsevne

Oppløsningen mellom balenin og arginin er veldig god ($R_s = 1.6$) og overlapp mellom disse forventes derfor ikke i reelle prøver. Oppløsningen mellom balenin og carnosin var derimot noe dårligere ($R_s = 1$) og noe overlapp med carnosin kan forventes dersom prøvene inneholder carnosin og balenin i et forhold på mer enn 1:4 (eller 4:1). Prøvene i valideringen var ikke i nærheten av dette forholdet og det forventes heller ikke ut fra tidligere erfaring at dette vil forekomme i reelle prøver.

Toppfasong

Toppfasongen i standard var tilsvarende toppfasongen i prøvene. Se beregning av oppløsningsevne vedlagt i perm.

Matriseeffekter

Retensjonstid til balenin er helt lik i standard, pulver og hvalmuskel. Se kromatogram vedlagt i perm.

Konklusjon:

Metoden har god selektivitet for balenin og overlapp fra carnosin må ikke tas hensyn til før forholdet mellom balenin og carnosin er mindre enn 1:4 (eller 4:1).

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 7 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Lineært område (LO)

Det lineære området ble bestemt ved å analysere balenin med ulike konsentrasjoner. Verdi for vinkelkoeffisient (a) og skjæringspunkt (b) ble bestemt ($y=ax + b$). Kurven tvinges gjennom origo så $b=0$. Kurvens korrelasjonskoeffisient og krumningskoeffisient ble også bestemt.

Følgende grenser for regresjonsparametere skal gjelde:

Krumningsfaktor (n-verdi) bør ligge mellom 0.9 og 1.1.
Korrelasjonskoeffisient (R) skal minimum være 0.99.

Følgende konsentrasjoner ble benyttet, $n=7$:
0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.25, og 2.5 $\mu\text{mol/ml}$

Det ble analysert 2 standardkurver pr.dag. Dette ble gjort 2 ganger. Resultat av disse kjøringene er ført inn i tabell 2.

Balenin	Vinkelkoeffisient (a)	Korrelasjonskoeffisient [®]	Krumningskoeffisient (n)	Kommentar
Kurve 1 Dag 1	73,550	0.9999	0.9 - 1.0	
Kurve 2 Dag 1	135,981	0.9994	0.9 - 1.0	Ved kons 1,5 n=0.8
Kurve 1 Dag 2	135,981	0.9994	0.9 - 1.0	Ved kons 0,5 n=0.8
Kurve 2 Dag 2	15,375	0.9998	0.8 - 1.3	

Tabell 2: Standardkurvekoeffisienter

Konklusjon:

Kurve 2 dag 2 avviker fra anbefalt verdi for krumningsfaktorer. Dette kan skyldes unøyaktighet i pipetteringen. Korrelasjonsfaktoren ligger godt over minstekravet på for $R = 0.99$.

Deteksjonsgrense (LOD)/kvantifiseringsgrense (LOQ)

Beregning med forstørret støy gir en LOQ og LOD:

Paramete	mg/g TS	Metode
LOD	0.03	3 x støy i blank
LOQ	0.4	10 x støy i blank

Tabell 3: LOD / LOQ

Konklusjon:

Blankprøven ble analysert for å si noe om spesifisitet. De er og benyttet til å bestemme LOQ og LOD. Ved å legge inn vekt lik prøvevekt på 1,0 g og fortyning lik 150 ble blankprøven beregnet som om den var en prøve med analytt. Dette kan være for lavt og kan ikke verifiseres med laveste standard. Det er pr. i dag uansett ikke aktuelt å analysere prøver i det lave området.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Sidenr: 8 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Drøfting/konklusjon Riktighet

Det ble kjørt 2 matriser, pulver og hval på både høyt nivå og lavt nivå. Baleninpulver inneholder 58 mg balenin/g prøve og hval 49 mg balenin/g prøve. På høyt nivå ble begge matriksene «spiket» med 20 mg balenin /g prøve. I det lave området ble både baleninpulver og hval tilsatt soyapulver for å få baleninnivået lavt før «spiking». Baleninpulver med soya inneholder 5.5 mg balenin/g prøver og hval med soya inneholder 4.5 mg balenin/g prøve. På lavt nivå ble begge matriksene tilsatt 2.4 mg balenin/g prøve. Resultatene er vist i tabell 4.

MATRISSE	Gjenfinning %
Pulver høyt område	87.9
Pulver lavt område	88.3
Hval lavt område	89.7
Hval høyt område	89.3

Tabell 4: Gjenfinning

Riktigheten (som gjenfinning) ligger mellom 80 – 120 %.

I tillegg ble begge prøvene analysert med eksisterende metode og resultatene fra de to metodene for andre fysiologiske aminosyrer sammenlignet. Resultatene for baleninpulveret er vist i tabell 5 og resultatene for hvalbiff er vist i tabell 6.

Aminosyre	Baleninpulver metode nr.247		Baleninpulver metode nr.394		Snitt	Stdav	RSD%
tau	0.81	0.80	0.82	0.84	0.82	0.01	1.8
urea	4.49	4.44	4.07	4.04	4.26	0.24	5.6
asp	0.84	0.84	0.89	0.88	0.86	0.03	3.1
thr	1.96	1.97	1.81	1.83	1.89	0.08	4.47
ser	1.42	1.42	1.41	1.45	1.43	0.02	1.1
ile	2.76	2.70	2.89	2.90	2.81	0.10	3.4
leu	9.78	9.72	9.22	9.30	9.51	0.28	3.0
phe	3.63	3.59	3.76	3.79	3.69	0.10	2.6
amm	1.77	1.75	1.70	1.71	1.73	0.04	2.0
orn	0.79	0.79	0.73	0.75	0.77	0.03	3.7
lys	1.73	1.71	1.69	1.67	1.70	0.02	1.5
1-mhis	0.29	0.24	0.20	0.21	0.23	0.04	18.0
his	0.80	0.77	0.91	0.91	0.85	0.07	8.5
trp	0.51	0.54	0.77	0.71	0.63	0.13	20.0
3-mhis	0.25	0.24	0.16	0.14	0.20	0.05	27.6
ans	4.94	4.99	3.79	3.80	4.38	0.68	15.5
car	6.44	6.28	7.08	7.27	6.77	0.48	7.1
bal			58.36	58.6	58.5	0.14	0.3
arg	0.50	0.44	0.42	0.45	0.45	0.03	7.7

Tabell 5: Sammenligning av andre fysiologiske aminosyrer i baleninpulver bestemt med de to metodene

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 9 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Aminosyre	Hvalbiff metode nr. 247		Hvalbiff metoden nr.394		Snitt	Stdav	RSD%
tau	0.28	0.31	0.29	0.29	0.29	0.01	3.1
urea	3.61	3.64	3.30	3.31	3.46	0.18	5.2
asp	0.35	0.36	0.32	0.32	0.34	0.02	6.3
thr	0.87	0.90	0.83	0.84	0.86	0.03	3.7
ser	0.90	0.92	0.87	0.88	0.89	0.02	2.7
ile	0.92	0.93	0.94	0.94	0.93	0.01	1.0
leu	1.95	1.99	1.72	1.74	1.85	0.14	7.5
phe	1.21	1.22	1.13	1.15	1.18	0.04	3.8
amm	0.64	0.66	0.58	0.58	0.62	0.04	6.9
orn	0.15	0.16	0.11	0.12	0.14	0.02	18.3
lys	1.11	1.16	1.11	1.15	1.13	0.03	2.3
1-mhis	0.13	0.14	0.10	0.12	0.12	0.02	13.4
his	0.47	0.50	0.48	0.47	0.48	0.02	3.3
trp	0.26	0.27	0.27	0.25	0.26	0.01	4.9
3-mhis	0.17	0.18	0.14	0.12	0.15	0.03	19.7
ans	4.66	4.71	4.21	4.02	4.40	0.34	7.7
car	2.99	2.95	3.39	3.33	3.17	0.23	7.3
bal			49.8	50.2	50.0	0.23	0.5
arg	0.81	0.83	0.82	0.80	0.82	0.01	1.6

Tabell 6: Sammenligning av andre fysiologiske aminosyrer i hvalbiff bestemt med de to metodene

Konklusjon:

Tabell 4 viser at gjenfinning for begge matrisene ligger innenfor 80- 110% både i høyt og lavt område. Tabell 5 og 6 viser at de aller fleste andre fysiologiske aminosyrene, gir samme svar med de to metodene med en RSD på mindre enn 10%. Noen aminosyrer hadde noe høyere RSD%, men mange av disse var det også et svært lite innhold av i prøvene.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 10 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Presisjon, som Intern Reproduserbarhet (IR)

Repeterbarhet:

10 prøver med baleninpulver ble opparbeidet og kjørt samme dag. Resultater men gjennomsnitt, standardavvik og Rsd% er lagt inn i tabell 8.

SampleName	bal
Balenin pulver 1	56.99
Balenin pulver 2	57.24
Balenin pulver 3	56.85
Balenin pulver 4	57.25
Balenin pulver 5	57.46
Balenin pulver 6	57.39
Balenin pulver 7	57.31
Balenin pulver 8	57.85
Balenin pulver 9	57.46
Balenin pulver 10	57.10
Gjennomsnitt	57.29
Std.avvik	0.28
Rsd%	0.49

Tabell 8: Repeterbarhet.

Konklusjon:

Rsd% ligger godt under 1.0%. Vi har funnet tilsvarende lave nivå på intern reproduserbarhet for baleninpulver.

Intern reproduserbarhet:

To matriser, hvalbiff og baleninpulver, ble analysert over 5 dager med 2 paralleller med en analytiker. Dette ble gjort med en uke mellom hver analyse. Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik, og resultatene er ført inn i tabell 7.

Matrise mg/g	Hvalbiff	Baleninpulver	Gjennomsnitt
DAG 1	49.47	58.01	57.71
	48.75	57.42	
	48.86	57.28	57.49
	48.36	57.70	
DAG 2	46.33	57.09	57.29
	48.45	57.50	
DAG 3	49.60	58.18	58.16
	49.58	58.14	
DAG 4	49.44	57.61	57.86
	49.82	58.11	
DAG 5	49.33	57.76	57.75
	49.20	57.74	
Snitt	48.93	57.71	57.71
Stavik	0.9	0.35	0.30
Relativt Stavik	1.9	0.6	0.5

Tabell 7: Intern reproduserbarhet

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 11 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Konklusjon:

Rsd% ligger godt under 2.0% for alle matrikser og for baleninpulver er RSD% godt under 1% sannsynligvis fordi dette pulveret er mer homogent enn den frysetørkede hvalbiffen.

Konklusjon:

Det er liten forskjell i RSD% mellom repeterbarhet og intern reproduserbarhet for baleninpulveret med henholdsvis 0.6 og 0.5 noe som tyder på dette er en svært reproduserbar metode. RSD% for hvalbiff var noe større med 1.9 sannsynligvis på grunn av mindre homogenitet til denne prøven.

Måleområde (MO)

Måleområdet settes fra LOQ i det laveste området til høyeste standard.

Konklusjon:

Måleområdet blir satt fra 0.4 mg/g til 160 mg/g, som vil si fra LOQ til høyeste standard omregnet i forhold til innveid prøve.

Måleusikkerhet (MU)

Måleusikkerhet beregnes med utgangspunkt i resultatene fra bestemmelsen av intern reproduserbarhet. Siden riktigheten til bestemmelsen er basert på gjenfinningsforsøk, og det foreløpig ikke foreligger resultater fra ringtester, rundes måleusikkerhet oppover til nærmeste hele 5 % og i tillegg legges det til 5 %-poeng pga manglende ekstern sporbarhet på riktighet. For parallelle bestemmelser tolereres det en forskjell på inntil 5 %. Resultatene fra beregningen er ført inn i tabell 9.

Matrise mg/g	Hvalbiff	Baleninpulver
Snitt	48.9	57.7
Stavik	0.9	0.35
Relativt Stavik	1.9	0.6
RSD %	3.8	1.2
2 * RSD Avrundet, %	4	2
Måleusikkerhet	10 %	10 %

Tabell 9: Beregning av MU med utgangspunkt i resultatene fra intern reproduserbarhet

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 12 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

Bidrag til måleusikkerheten er vurdert i tabell 10.

Trinn	Lavt bidrag	Middels bidrag	Høyt bidrag
Homogenisering			X
Frysetørking	X		
Innveiging	X		
Ekstraksjon		X	
Felling av protein	X		
pH justering	X		
Filtrering	X		
Instrumentbestemmelse	X		
Integrering		X	

Tabell 10: Vurdering av bidrag fra de ulike trinnene til metodens usikkerhet

Konklusjon:

Måleusikkerheten ble beregnet til 2 % for homogene industrielle pulver slik som baleninpulver og 4 % for mindre homogene pulver. Måleusikkerheten til metoden settes derfor lik 10 % inntil resultater fra ringtester eller lignende foreligger. For parallelle bestemmelser tolereres det en forskjell på inntil 5 %. Måleusikkerheten settes i utgangspunktet lik i hele det validerte området inntil eventuelt flere resultater fra prøver med lavere innhold foreligger.

Drøfting/konklusjon Robusthet

Metoden synes å være meget robust med hensyn på ulike batcher av standarder, Ninhydrin, andre løsninger og matriser. Denne metoden for Baleninbestemmelsen synes derfor å være like robust som allerede eksisterende metode som NIFES har brukt til å analysere andre fysiologiske aminosyrer i en årrekke.

Drøfting/konklusjon HMS

Metodens risikomomenter og sikkerhetstiltak er ivaretatt i metode dokumentet. Ingen ekstra tiltak kreves utover det.

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 13 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

9. OPPSUMMERENDE KONKLUSJON

Den validerte metoden har vist seg å gi svært reproduserbare resultater for balenin med dertil hørende liten usikkerhet i bestemmelsen. Balenin-nivået er ganske høyt i de matrisene metoden er validert med. Metoden er derfor meget godt egnet for å kjøre pulver og frysetørke prøver. De analytiske kravene godt ivaretatt og målsettingen er oppfylt i forhold til matrisene.

Hvalkjøttet som er brukt i valideringen vil bli brukt som kontroll ved kjøring av balenin-pulver

10. DOKUMENTASJON OG REFERANSER

Valideringsplan og Valideringsrapport er arkivert i grønn perm merket " Validering av Validering av Balenin pulver metode 394" og står sammen med øvrige valideringspermer på Lab. for Næringsstoff.

Alle rådata er samlet i valideringspermen.

Elektronisk data er lagret på følgende område på server:

U: Næringsstoffer\Metoder\394metode\Validering

Referanser:

Mike Davis – The Biochrom 20 for Amino Acids in Feedstuffs and Foods, Biochrom, Cambridge, England
Met.NÆR.01-37 247 Fysiologisk aminosyrebestemmelse i pulver

Veiledende dokumenter:

- NMKL (1996), Kontrollkort og Kontrollprøve. NMKL-prosedyre nr. 3.
- NMKL (2009), Validering av kjemiske analysemetoder. NMKL-prosedyre nr. 4.
- NMKL (1997), Måleusikkerhet. NMKL-prosedyre nr. 5.
- NMKL (2007), Referansematerialer. NMKL-prosedyre nr. 9.

NMKL prosedyrer kan kjøpes av;

NMKL
Generalsekretariatet
c/o Veterinærinstituttet,
P.O.Box 750, Sentrum, N-0106 Oslo, Norway
E-post: nmkl@vetinst.no
www.nmkl.org

- NIFES Valideringsdokument (2009) versjon 1.3
- NIFES Kvalitetshåndbok

Dato/Signatur:

Anita Birkenes

Stig Valdernesnes

Annbjørg Bøkevoll

.....
Forfatter

.....
Vitenskapelig metodeansvarlig

.....
Avdelingsleder/forskningsjef

NIFES						Dok.id.: MET.NÆR.03-50
Valideringsplan og rapport for Metode 394 -Balenin						□
Utgave: 1.00	Opprettet: 02.12.2014	Sist endret: 05.12.2014	Godkjent av: ABO	Utskriftsdato: 28.08.2015	Fil: D02032	Siden: 14 av 14

Ved utskrift er dokumentet ikke gjeldende. Kun elektronisk versjon av dokumentet er oppdatert og gyldig.

11. LOGGBOK FOR REVIDERINGER OG VERIFISERING AV VALIDERINGSPARAMETRENE

Forklaring: Her føres plan, rapport og konklusjon for nye verdier for en eller flere av valideringsparametrene utover ringtestvurderinger og kontrollkort (nytt instrument, nye analytter, matriser etc). Siste utfylte versjon av valideringsrapporten fås ved å kontakte avdelingsleder. Målet med dette er å samle alle opplysninger om en metodes validering og verifiseringer i en rapport som er versjonsstyrt i EK. Fyll også inn aktuelle datoer i tabellen under for å få en oversikt over valideringshistorikken. Denne tabellen er lagt sist i malen så man slipper å skrive ut hele dokumentet hver gang.

Innhold, valideringslogg for metode:			
Dato	Kort beskrivelse	Status	Side
2014	Ny metode. Metoden er validert for Balenin.	Versjon 1.0	

Dato/Signatur:

.....
Forfatter

.....
Vitenskapelig metodeansvarlig

.....
Avdelingsleder/forsknings sjef