

Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler

En screening av omega-3-oljer med hensyn til variasjon i oksidasjonsgrad, innhold av oksidasjonsprodukter og effekt på markørsystemer

Bente Ruyter, Stine Grimmer, Trine Thorkildsen, Marijana Todorčević, Marina Lalic og Gjermund Vogt





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Forretningsområdet marin driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringen. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, effektiv og bærekraftig produksjon, prosess- og produktutvikling av sjømat samt marin bioprospektering.

Nofima
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: marin@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Nofima

Postboks 6122, NO-9291 Tromsø
Besøksadr.: Muninbakken 9–13,
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
marin@nofima.no
www.nofima.no

Organisasjonsnr.:
NO 964 441 898 MVA

Rapport

ISBN: 978-82-7251-802-7 (trykt)
ISBN: 978-82-7251-803-4 (pdf)

Rapportnr.:
31/2010

Tilgjengelighet:
Åpen

<i>Tittel:</i> Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler En screening av omega-3-oljer med hensyn til variasjon i oksidasjonsgrad, innhold av oksidasjonsprodukter og effekt på markørsystemer	<i>Dato:</i> 25.10.2010
<i>Forfatter(e):</i> Bente Ruyter, Stine Grimmer, Trine Thorkildsen, Marijana Todorčević, Marina Lalic og Gjermund Vogt	<i>Antall sider og bilag:</i> 65
<i>Oppdragsgiver:</i> RUBIN	<i>Prosjektnr.:</i> 20858
<i>Tre stikkord:</i> Fiskeoljekvalitet, Helsemarkører, Omega-3	<i>Oppdragsgivers ref.:</i>
<i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> Se eget kapittel.	

Innhold

1	Sammendrag	1
1.1	Delprosjekt I: Kartlegge omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som selges i helsekostmarkedet.....	1
1.2	Delprosjekt II: Kartlegge hvilke biologiske markører som er egnet for helseeffektsstudier av oksidasjonsgrad i cellemodeller	2
2	Generell bakgrunn	3
2.1	Hovedmålsetting	4
3	Delprosjekt I: Kartlegging av omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3 oljer	5
3.1	Bakgrunn, delprosjekt 1	5
3.1.1	Fiskeoljer til helsekost	5
3.1.2	Alternativer til marine omega-3 kilder	5
3.1.3	Måling av oksidasjon i oljer.....	6
3.1.4	Kvalitetskrav for fiskeoljer	8
3.1.5	Kontroll og tilsyn med omega-3-markedet.....	9
3.1.6	Omega-3-oljer, kvalitet og helse.....	9
3.1.7	Kartlegging av markedet.....	11
3.1.8	Utvalg av oljer.....	11
3.2	Metode, delprosjekt 1.....	13
3.2.1	Peroksidverdi.....	14
3.2.2	PeroxySafe™ STD Kit.....	14
3.2.3	Anisidinverdi	14
3.2.4	TOTOX-verdi	15
3.2.5	Fettsyresammensetning av oljer.....	15
3.2.6	Stressing av oljer gjennom kapsulering.....	15
3.2.7	Statistiske analyser.....	16
3.3	Resultat, delprosjekt 1.....	16
3.3.1	Utvalg av ulike oljer	16
3.3.2	Oksidasjonsnivå i omega-3-produkter	16
3.3.3	Oksidasjonsnivå sammenlignet med grenseverdier	17
3.3.4	Oksidasjon og konsentrasjon av EPA og DHA.....	18
3.3.5	Oksidasjonsnivå og ulike oljer	19
3.3.6	Innkapslede og flytende omega-3-produkter.....	21
3.3.7	Stressing av oljer gjennom kapsulering og lagring	22
3.3.8	Innhold av EPA og DHA i anbefalte dagsdoser.....	22
3.3.9	Pris per dagsdose og innhold av EPA og DHA	23
3.4	Diskusjon, delprosjekt 1	23
3.4.1	Utvalg	23
3.4.2	Resultater av nivå av oksidasjonsprodukter	24
3.4.3	Bruk av monografier	25
3.4.4	Oksidasjonsnivå og oljetyper.....	26
3.4.5	Oksidasjonsnivå og konsentrasjon av EPA og DHA	27
3.4.6	Oksidasjonsnivå i innkapslede versus flytende oljer	28
3.4.7	Stressing av oljer gjennom kapsulering og lagring	29
3.4.8	Metodediskusjon.....	29
3.5	Konklusjon, delprosjekt 1	30
3.6	Referanser, delprosjekt 1	31

4	Delprosjekt II: Kartlegge hvilke biologiske markører som er egnet for helseeffektsstudier av oksidasjonsgrad i celle-modeller	35
4.1	Bakgrunn, delprosjekt 2: Fiskeoljekvalitet og helse	35
4.1.1	Hvordan verifisere gunstig helseeffekt av oljer fra ferskt norsk råstoff?	35
4.1.2	Kartlegging av effekter på mennesker – human studier	35
4.1.3	Kartlegging av effekter - alternative modellsystemer.....	36
4.1.4	Cellemodell systemer (in vitro)	36
4.2	Metode, delprosjekt 2: Cellemodellssystemer	36
4.2.1	Isolasjon og dyrking av hepatocytter	36
4.2.2	Humane cellelinjer.....	37
4.2.3	Oljer som substrat for humane cellelinjer (tarmceller og monocytter)	37
4.2.4	MTT assay.....	37
4.2.5	Tre metoder for tillaging av oljesubstrater for leverceller fra Atlantisk laks	37
4.2.6	Fettsyresammensetning	38
4.2.7	Lipidklassesammensetning	38
4.2.8	Superoxide dismutase	38
4.2.9	Glutathione peroksidase.....	39
4.2.10	Bestemmelse av thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).....	39
4.2.11	Lipidperoksidering (DPPP)	39
4.2.12	Kvantitativ real-time PCR	39
4.3	Resultat og diskusjon, delprosjekt 2: Cellemodeller.....	39
4.3.1	Eksperiment 1. Uttesting av ulike metoder for å gjøre fiskeoljesubstratet tilgjengelig for celler i kultur og videre studere biologiske effekter av de ulike substratene i celler	39
4.3.2	Eksperiment 2 - primære hepatocytter fra laks – en dose-respons studie og tidsstudie	44
4.3.3	Eksperiment 3 – Dose-respons studie.....	49
4.3.4	Eksperiment 4 - Kartlegging av respons i celler med ulike oljekilder.....	53
4.3.5	Eksperiment 5 - Kartlegging av respons, på ulik harskningsgrad av oljer, i en human Caco-2 cellelinje	57
4.3.6	Effekter i human monocytcellerlinje	61
4.4	Konklusjon, delprosjekt 2: Cellemodeller	62
4.4.1	Kartlegging av effekter på helsemarkører - celle modellsystemer.....	62
4.5	Referanser delprosjekt 2: Cellemodeller	63
5	Felles oppsummering delprosjekt 1 og 2.....	65

1 Sammendrag

Marine oljer har et høyt innhold av sunne flerumettede fettsyrer som lett utsettes for oksidasjon. Dette gir opphav til dårlig smak og lukt på produktene og en usikkerhet om sunnhet for forbruker. Oksidasjon er en kontinuerlig prosess og den kan ofte ligge latent før den øker eksponentielt. Kvaliteten på råstoffet er med dette viktig for oksidasjonsstaus til ferdig prosessert olje, og en av de viktigste konkurransefortrinn for oljer produsert av ferskt norsk marint råstoff kan nettopp være knyttet til oksidasjon.

Gjennom prosjektet er det fremskaffet en oversikt over variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som selges i helsekostmarkedet (delrapport1). Det er videre gjennomført en innledende kartlegging for å se hvilken effekt denne variasjonen i oksidasjonsgrad har på parametre av betydning for helse (delprosjekt 2).

1.1 Delprosjekt I: Kartlegge omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som selges i helsekostmarkedet.

Det er gjennomført en kartlegging av omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som finnes i helsekostmarkedet. Ulike omega-3-produkter (oljer og kapsler) er samlet inn fra dagligvarehandel og helsekostforretninger i Norge og Europa. Totalt 113 produkter er analysert med hensyn på oksidasjon i form av peroksidtall og anisidintall.

De offisielle metodene (AOCS) for måling av oksidasjon i form av peroksidtall (PV) og anisidintall(AV) har klare begrensninger for måling av oksidasjon (harskning) i helsekostprodukter som inneholder andre tilsetninger i tillegg til oljer. Av de 113 analyserte omega-3-produktene lot kun 56 seg analysere med peroksidtall- (PV) og anisidintallmetodene (AV). Årsaken til dette ser ut til å skyldes at mange omega-3-produkter på helsekostmarkedet er tilsatt andre komponenter som direkte virker inn på analysemetodene og derfor gir unøyaktig eller totalt feil resultat.

Av de resterende 56 oljene som lot seg analysere med sikkerhet var det bare 4 produkter som tilfredsstilte GOED sin egen monografi (anbefalt grenseverdier på PV5 og AV 20). Av disse fiskeoljene var det bare en nordeuropeisk fiskeolje og en selolje som var innenfor GOED`s grenseverdier for både PV og AV. Syv av åtte 18/12-oljer hadde AV under grenseverdien, mens 17 av 18 konsentrater og 5 nordeuropeiske fiskeoljer også lå under grenseverdien. Ingen 18/12-oljer eller oppkonsentrerte fiskeoljer hadde PV under GOED`s grenseverdi for PV, mens 1 nordeuropeisk fiskeoljer og 1 selolje hadde PV under GOED`s grenseverdi.

En 18/12-olje lå over høyeste grenseverdi angitt i den europeiske farmakopø for både PV og AV (PV 10 og AV 30), og var det mest oksiderte omega-3-produktet i dette utvalget. Det var dessuten kun en 18/12-olje som hadde PV og AV under grenseverdiene.

Samtlige 18/12-oljer, 13 oppkonsentrerte fiskeoljer, to nordeuropeiske fiskeoljer og fire seloljer hadde TOTOX verdi over 26.

Nordeuropeiske oljer hadde tendens til lavere AV enn søramerikanske oljer.

Parallelt testede norske "functional food"-oljer hadde klart lavest verdi på både PV og AV.

Resultatene av undersøkelsen viser kun et øyeblikksbilde av hva som var tilgjengelig høsten 2009 i markedet. Det er kun kjøpt et produkt av hver type så en kan ikke si om det analyserte produkt er representativt for produktet generelt.

I utgangspunktet regner man med at oljene forlater raffineriet i en kvalitet som tilfredsstillende GOED sine grenseverdier. Mange av de analyserte oljene tilfredsstilte ikke disse grenseverdiene. Dette kan derfor skyldes at oljene ikke er stabile over tid. Årsaken til dette kan være ting som ugunstige betingelser som feil behandling og logistikk, for høy lagringstemperatur, feil luftfuktighet, lyspåvirkning, og ikke optimal bruk av antioksidanter. Med dårlig råvare i utgangspunkt gir det også raskere oksidasjon av oljen, noe som kan forklare en del av resultatene i dette studiet.

1.2 Delprosjekt II: Kartlegge hvilke biologiske markører som er egnet for helseeffektsstudier av oksidasjonsgrad i cellemodeller

Det er gjennomført komparative studier med ulike oljetyper/kvaliteter for å kartlegge eventuelle positive og negative helseeffekter. I prosjektet er primære leverceller fra fisk og tarm- og immuncellelinjer fra menneske blitt benyttet som modellsystem for å kunne forstå hvilke mekanismer som eventuelt ligger til grunn for biologiske responser. En viktig del av dette forsøket har vært å optimalisere metoder for hvordan omega-3-produkter i relevante konsentrasjoner kan introduseres til ulike celledsystemer, og å etablere et sett med biologiske markører som sier noe om hvilken effekt disse oljene kan ha på en organisme. Følgende metoder/ markørsystemer ble testet ut:

- Lipidperoksidering i cellemembraner og analyse av membranfosfolipider
- Enzymaktivitet av intracellulære antioksidanter, superoxide dismutase (SOD) og glutathione peroxidase (GPX)
- Analyse av malondialdehyd som markør for sekundære oksidasjonsprodukter.
- Endringer i genuttrykk av markører for oksidativt stress og betennelsesreaksjoner (og NF- κ B aktivitet i human monocytt cellelinje).
- Grad av celledeling (humane Caco-2 celler)

I prosjektet har vi foretatt en screening av et utvalg av kommersielle oljekvaliteter og deres effekter på helsemarkører i cellemodeller. Når leverceller fra laks og humane cellelinjer ble dyrket i media tilsatt fiskeoljer med avtagende harskingsgrad (avtagende PV og AV verdier), førte det til lavere grad av lipidperoksidering av cellemembraner. Våre resultater viste videre at avtagende harskingsgrad av oljer tilsatt celler i kultur hadde positiv effekt på grad av celledeling, uttrykk av markører for oksidativt stress og inflammasjon, enzymaktivitet av intracellulære antioksidanter og membranfosfolipid sammensetning.

Videre studier er nødvendig for å verifisere om resultatene fra modellsystemene gjelder for levende dyr og mennesker generelt.

2 Generell bakgrunn

Omega-3-markedet har opplevd en sterk vekst de siste årene. Norske leverandører er blant de ledende leverandører av fiskeoljer til markedet for kosttilskudd og funksjonell mat (functional food) internasjonalt. Pronova Biopharma har i tillegg hatt en fantastisk utvikling for sitt høykonsentrerte omega-3 legemiddel. På tross av denne utviklingen har ikke oljer utvunnet fra norsk råstoff opplevd samme positive utvikling. Dette skyldes først og fremst at omega-3-markedet er fokusert på innholdet av omega-3. Råvarer fra norsk oppdrett og norske fiskerier har et lavere innhold av omega-3 enn oljer fra ansjos, sardin og hestemakrell i Sør-Amerika og Nord-Afrika. Disse oljene har blant annet derfor blitt foretrukket ved raffinering og oppkonsentrering av omega-3-fettsyrer.

Det spekuleres i om konsum av oksiderte flerumettede fettsyrer og oljer som er oksidativt ustabile kan ha reduserte helseeffekter i forhold til oljer som har lav grad av oksidasjon. Det er imidlertid lite som er gjort på dokumentasjon av effekten av oksidasjon in-vivo. Oljer som er skånsomt utvunnet fra ferskt råstoff regnes for å være mer stabile mot oksidasjon og foretrekkes derfor til produksjon av "functional food" oljer. Man vet imidlertid ikke i hvilken grad oljens forhistorie har effekt på graden av oksidasjon in-vivo, eller hvorvidt skånsomt utvunnet olje fra ferskt råstoff har en mer gunstig profil i forhold til oksidasjon in-vivo enn høyt konsentrerte fettsyrer.

Påvisning av positive helseegenskaper (eller fravær av negative) kan derfor være en mulighet for oljer basert på norsk ferskt råstoff. Hvis vi kan utvikle analyseparametere, standarder og dokumentasjon på mer positive effekter ved bruk av lavoksiderte oljer, vil dette kunne åpne for et stort marked for norske høykvalitetsoljer inn mot kosttilskudd og lignende applikasjoner.

Økt verdi på råolje fra ferskt råstoff er en viktig faktor for å øke lønnsomhet og attraktivitet i bearbeidingen av råstoff fra fiskeri- og oppdrettssektoren. Økt verdi og bearbeiding av ferskt råstoff vil igjen bedre muligheten for å utvikle og få lønnsomhet på andre høyverdi produkter fra samme råstoff.

Perioder med stort fall i priser på fiskeolje vil antas å redusere lønnsomheten til produsentene av råolje fra ferske biprodukter på kort sikt. For å sikre utviklingen til hele biproduktsektoren, er det derfor viktig å videreføre et arbeid for å øke verdien på disse oljene i forhold til standard fôrøljer. En av de mest sentrale forutsetningene for å hente ut en merverdi fra råolje basert på norsk råstoff med høy grad av ferskhets er at den i realiteten innehar spesifikke helsefortrinn. Disse helsefordelene må dokumenteres på en slik måte at det ikke kan stilles tvil om dem. For å kunne verifisere hvorvidt oljer fra ferskt norsk råstoff har høyere kvalitet, er mindre oksidert og har helsefortrinn fremfor andre oljer på markedet er det helt nødvendig å gjennomføre komparative studier med ulike oljetyper/kvaliteter for å kartlegge eventuelle positive og negative helseeffekter. Dette kan i utgangspunktet gjøres direkte gjennom intervensjonsstudier på mennesker, men flere forhold tilsier at dette ikke bør være første trinn i en dokumentasjonsprosess:

- Tidkrevende og kostbart å kartlegge eventuelle helseeffekter i mennesket

- Relativt vanskelig å få klare resultater på effekter - først og fremst fordi forsøkspersoner har forskjellig kosthold og helsestatus
- Avhengig av å basere seg kun på helsemarkører som kan påvises i blodprøver og urinprøver
- Begrenser muligheten til å teste mange oljer for potensielle helseeffekter.

Prosjektet vil gjennomføres som en dokumentasjonsstudie i 3 faser: Fase 1 – Innledende screening av produkter som finnes på markedet

- Fase 2 – Dokumentasjon av effekt på biologiske modellsystemer
- Fase 3 – Dokumentasjon av effekt på menneske

Denne prosjektrapporten retter seg mot første og andre fase i dokumentasjonsstudiet "Innledende screening av produkter som finnes på markedet og dokumentasjon av effekt på biologiske modellsystemer".

2.1 Hovedmålsetting

Skaffe oversikt over variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som selges i helsekostmarkedet, og gjennomføre en innledende kartlegging for å se hvilken effekt denne variasjonen har på parametre av betydning for helse.

Viktige delmål:

- Kartlegge omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3-oljer som finnes i helsekostmarkedet som grunnlag for videre arbeid knyttet til dokumentasjon, samt pilotstudie på effekt av prosess og lagring (delprosjekt 1).
- Kartlegge biologiske markører som egner seg til bruk i studier av effekt av oksidasjonsgrad, og videreutvikle etablerte cellekultursystemer som verktøy for å studere biologiske effekter av oksiderte oljer / oksidasjonsprodukter (delprosjekt 2).

3 Delprosjekt I: Kartlegging av omfang og variasjon i oksidasjonsgrad på omega-3 oljer

3.1 Bakgrunn, delprosjekt 1

3.1.1 Fiskeoljer til helsekost

Til produksjon av omega-3-oljer for helsekostmarkedet benyttes i dag hovedsakelig fisk fra Chile og Peru, til dels Marokko, samt Argentina og Vest-Sahara (International Fishmeal and Fish Oil Organisation, 2006). Fiskeslagene som i størst grad benyttes fra disse områdene er ansjos, sardiner, pilchard (type sardin), menhaden og hestemakrell (Alasalvar & Taylor, 2002; Nichols, 2007). Oljene fra de ulike fiskeslagene blandes ofte sammen slik at en får en fiskeolje som inneholder ca. 18 % EPA og 12 % DHA. Disse selges internasjonalt under betegnelsen 18/12-oljer og gjenspeiler omtrentlig konsentrasjonen av de to fettsyrene. Fiskeslagene som benyttes i 18/12-oljer har et høyere innhold av omega-3 enn oljer fra nordeuropeiske fiskeslag (Nichols, 2007). Nordeuropeiske fiskeslag som benyttes til oljer for humant konsum er i dag hovedsakelig torsk og laks. En antar at et høyere innhold av flerumettede fettsyrer, samt annen produksjonsteknologi og logistikk, gjør 18/12-oljer mer utsatte for oksidasjon enn nordeuropeiske fiskeoljer som har en lavere konsentrasjon av omega-3. Internasjonalt har oljer fra helfisk, siden 1999, blitt mer vanlig å benytte i oljer til humant konsum enn leveroljer (Hjaltason & Haraldsson, 2007).

Konsentrasjonen og sammensetningen av fettsyrer i en fiskeolje varierer med type fisk, men også hvor fisken geografisk er fanget, sjøvannets temperatur, samt fiskens næringsgrunnlag. For å skille mellom fiskeoljer av ulik opprinnelse kan fettsyresammensetningen brukes som en enkel metode, mens NMR (nuclear magnetic resonance) spektroskopi gir en sikrere identifikasjon med hensyn på autentisitet. Det er større forskjeller i EPA-innhold mellom fiskeslag, mens forskjeller i DHA-innhold stort sett er mindre (Allen, 1995).

Nordeuropeiske fiskeslag inneholder høyere konsentrasjoner av fettsyren gadoleinsyre (C20:1) enn søramerikansk/nordafrikansk fisk. Dette gjør at oljer basert på nordeuropeisk fisk skiller seg fra søramerikansk/nordafrikansk fisk, samt fra vegetabiliske oljer og annet animalsk fett, som har et lavere innhold av fettsyren. Innholdet av C20:1 kan derfor også brukes for å identifisere olje fra nordeuropeisk fisk i tillegg til forholdet EPA/DHA (Allen, 1995).

Lakseolje har generelt et høyere nivå av DPA enn torskeleverolje (Nichols, 2007), og fisk fra nordlige farvann har ofte mer DHA enn EPA. Fisk fra sørekvatoreale områder har derimot ofte mer EPA enn DHA. Oljer på markedet som inneholder ca 30 % EPA og/eller 20 % DHA eller mer, ansees å være oppkonsentrerte. Unntaket er tunfiskolje som kan inneholde over 25 % DHA (Nichols, 2007).

3.1.2 Alternativer til marine omega-3 kilder

I de senere årene har det blitt et økt fokus på alternative kilder til fisk for omega-3 fettsyrer, og hvilke fortrinn disse potensielt kan ha. Både vegetabiliske og marine kilder blir undersøkt

som mulige kilder. Olje fra planten *Ormehode (Echium Vulgare)*, rik på stearidonsyre, har vært nevnt. Likeledes genmodifisert raps, soya, alger etc. Av marine råvarer er både nordatlantisk sildefisk, calanus og antarktisk krill, alternativer. Av disse er det i dag bare krill som har noe kvanta. Krill er rik på fosfolipider og karotenoiden astaxanthin. Den inneholder omkring 20% EPA og 10% DHA, men fettsyreprofilen vil variere avhengig av region og tid på året (Logan, 2003; Nichols, 2007). Det hevdes at EPA og DHA i fosfolipidform gir bedre opptak enn fettsyrer i triglyseridform og forbedrer lipidprofilen i blod (Bunea, Farrah & Deutsch, 2004; Werner, Havinga, Kuipers & Verkade, 2004). Det foreligger liten vitenskapelig dokumentasjon vedrørende krillolje og helse, men det foregår stadig flere undersøkelser vedrørende denne oljen. Algeolje karakteriseres gjerne som en vegetabilsk olje som er rik på DHA. Algeolje er lite utbredt i helsekostmarkedet, men har en utbredelse i spesialprodukter som for eksempel barnemat og morsmelkerstatninger.

Selolje er en "animalsk" marin olje som hovedsakelig utvinnes fra sel fanget i områder omkring Grønland og som prosesseres i Canada. Det er først og fremst grønlandssel og klappmyss som fangstes. Fordi sel er et pattedyr har den en noe annerledes posisjon-isomerisering av omega-3-fettsyrene på triglyseridet enn fiskeoljer. Denne strukturelle forskjellen kan muligens føre til ulik absorpsjon, distribusjon og metabolisme av omega-3-fettsyrene, men dette er ikke tilstrekkelig dokumentert (Murphy, Wright, Scott, Timmins & Ackman, 1999; Vognild et al., 1998). Selolje inneholder om lag åtte prosent DHA, sju prosent eller mer EPA, og mellom fire og seks prosent DPA (Murphy, Wright, Scott, Timmins & Ackman, 1999; Nichols, 2007). Hovedsakelig på grunn av fangstmetoden vil salg av produkter fra sel bli forbudt i EU-land i løpet av 2010 (Regulation on trade in seal products, 2009).

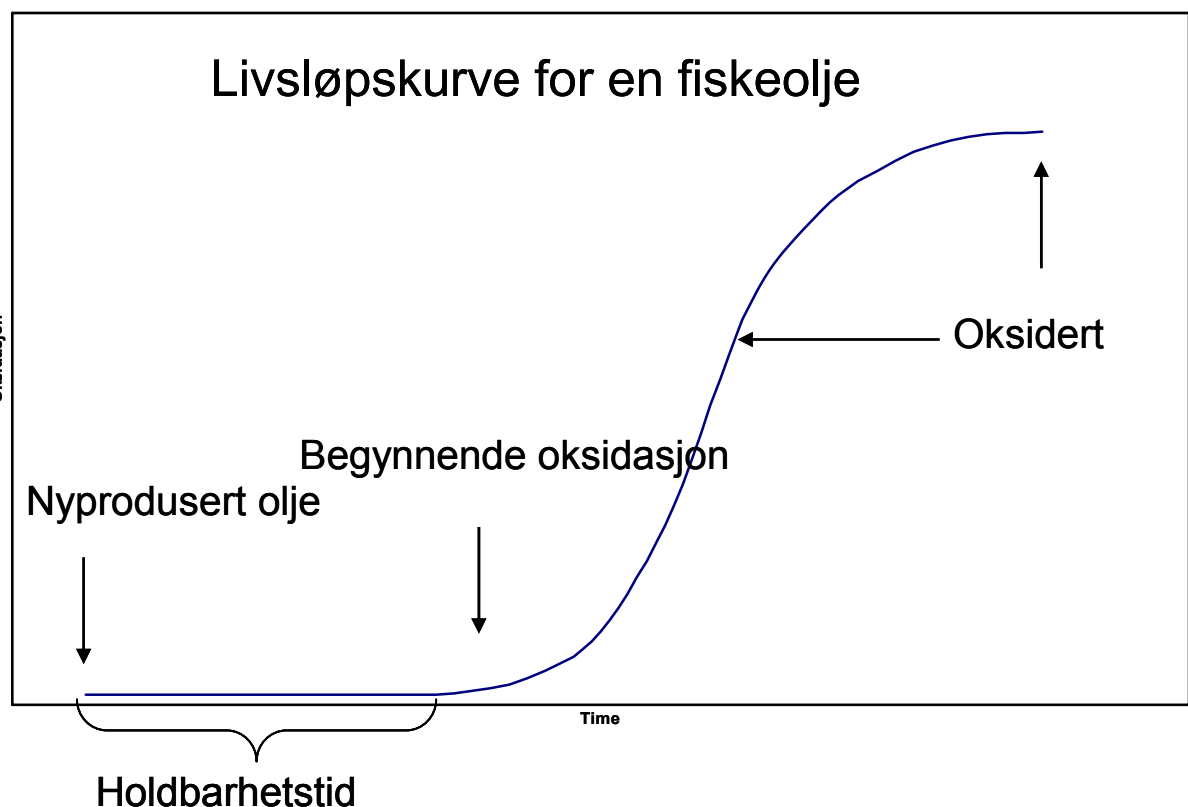
Haileverolje har blitt mindre vanlig fordi mange haiarter er utrydningstruede. Haileverolje på markedet i dag er stort sett basert på bifangst. Nordatlantisk haileverolje kan inneholde fra tre til sju prosent EPA og mellom fem og ti prosent DHA. Haileverolje er ellers rik på squalen som har vært mye brukt i kosmetikkindustrien og i teknisk industri. På grunn av overfiske har mange haiarter havnet på rødlisten over utrydningstruede arter. Derfor har andre kilder, som for eksempel olivenolje, blitt brukt som råstoff til utvinning av squalen. Imidlertid finnes det haileveroljer med opp mot 70 % squalen på helsekostmarkedet (Smith, 2000; Owen et al 2004). Det er gjerne andre effekter enn omega-3 som derfor tilskrives haileveroljer.

Kommersiell muslingolje på markedet er som krillolje ikke raffinert og rensert på samme måte som vanlige fiskeoljer. Derfor inneholder den i tillegg til fettsyrer forskjellige sterolestere og noe fosfolipider. Oljeinnholdet i muslinger er lavt, men konsentrasjonen av EPA og DHA er høy. Avhengig av art, sesong og geografisk fangststed har det blitt vist at konsentrasjonen av EPA for enkelte arter kan være på opp mot 38 %, og DHA kan i andre arter være opp mot 26 % (Chan et al. 2007; Taylor & Savage, 2006). På det norske helsekostmarkedet er det *Lyprinol* som dominerer. Dette er et produkt fra grønnleppet musling fra New Zealand hvor oljen er utvunnet ved hjelp av superkritisk ekstraksjon av frysetørret skjellmasse.

3.1.3 Måling av oksidasjon i oljer

Ved oksidasjon av flerumettede fettsyrer dannes et stort antall hydroperoksider som lett dekomponeres og derfor er vanskelige å analysere kvantitativt. NMR-studier av oksidasjon

av blant annet EPA og DHA (i termisk behandlet laks) viser større tendenser til oksidasjon av de ytterste dobbeltbindingene, og liten skade på de i midten av kjeden. Lipidhydroperoksider er stabile ved gunstige betingelser som lav temperatur, nok antioksidant og ingen katalysatorer til stede. I realiteten er imidlertid forholdene vanligvis ikke så gunstige. Dermed vil hydroperoksidene dekomponere via kompliserte reaksjonsveier til en kompleks blanding av blant annet monomere, dimere, polymere samt lavmolekylære og flyktige oksidasjonsprodukter. Det er de flyktige oksidasjonsproduktene som er årsak til uønsket smak og lukt i fiskeoljer. En fiskeolje av høy kvalitet smaker egentlig ingen ting eller svært lite og en kan vanskelig skjelve smaken fra en vanlig matolje. Imidlertid vil oljen før eller siden utvikle uønsket en smak på grunn av oksidasjon, dersom den ikke er behandlet og stabilisert riktig. Utviklingene av oksidasjon i oljene vil komme uansett ved vanlig lagring (kjøl, kapsulert, på flaske etc). Dette er smaken vi oppfatter som harsk, eller "fiskeoljesmak". Jo mer oksidert oljen er, jo mer fremtredende blir smaken. Det finnes ingen klar definisjon av hva som er en "harsk" fiskeolje utover monografier. Imidlertid sier en generelt for næringsmidler at når et produkt har fått en ubehagelig smak og lukt på grunn av oksidasjon regnes den for harsk.



Det er en mengde ulike metoder tilgjengelig for måling av lipidoksidasjon. Tilgjengelige metoder for måling av oksidasjon deles i to hovedgrupper, avhengig av om det er primære eller sekundære oksidasjonsprodukter som skal måles. Primære oksidasjonsprodukter som vi måler med PV er uten farge, smak og lukt, mens enkelte sekundære oksidasjonsprodukter, spesielt flyktige aldehyder som vi måler ved blant annet AV, er luktintense (Min, 1998; Olsen, 2005) og bidrar til begrepet harsk smak. For sekundære oksidasjonsprodukter skiller det noen ganger mellom flyktige og ikke-flyktige

oksidasjonsprodukter. Mens flyktige sekundære oksidasjonsprodukter er lavmolekylære aldehyder er ikkeflyktige sekundære oksidasjonsprodukter oksiderte fettsyrerester som sitter fast i triglyseridet. Disse kalles ofte "core-aldehyder" Det er disse målemetodene som benyttes for å angi krav under produksjonen av omega-3-oljer. I handel av omega-3-oljer sertifiseres også oljene med disse metodene (European Pharmacopoeia, 2009; RUBIN, 2009). *The American Oil Chemists' Society* (AOCS) har angitt måling av PV og AV som offisielle målemetoder i kommersielt fett og oljer (AOCS, 1990a; AOCS, 1990b). Det finnes imidlertid en rekke andre metoder som kan gi et meget godt bilde av oksidasjonsstatusen til fiskeoljer. Slike metoder er nevnt i tidligere rapporter fra Rubin. Imidlertid antas at den beste metoden for måling av oksidasjon er et godt fungerende sensorisk panel.

3.1.4 Kvalitetskrav for fiskeoljer

Forskrift om fiskemel, fiskeolje m.v. omfatter råstoff, behandling, produksjon, lagring, omsetning, transport, innførsel og utførsel fra villfanget fisk og råvarer til produksjon. Fiskeolje eller dens råstoff skal tilfredsstillende krav fastsatt i forskriften. Denne forskriften omhandler rutinemessige krav til behandling av råstoff, men disse er lite spesifikke og omhandler ikke oksidasjon (*Forskrift om fiskemel, fiskeolje m.v.*, 1999).

Det stilles ingen krav til omega-3-produkter som selges når det gjelder oksidasjon. Derimot inneholder den europeiske farmakopøkrav som gjelder i forbindelse med raffinering av fiskeoljer. Det foreligger ulike farmakopømonografier for ulike fiskeoljer, avhengig av hvilke fiskeslag som er opphav til oljen. I oppkonsentrerte oljer angis kravene i sammenheng med i hvilken form fettsyrene er på i oljen. Maksimum tillatt innhold av oksidasjonsprodukter etter endt raffinering er for torskeleverolje og 18/12-oljer satt til PV 10 meq/kg og AV lik 30. De samme maksimumsgrenser gjelder for oppkonsentrerte fiskeoljer på triglyseridform (Council of Europe, 2008). I tillegg foreligger farmakopømonografier for oljer utvunnet fra oppdrettslaks og oppdrettstorsk, tunfiskolje og oppkonsentrerte fiskeoljer i etylesterform og i form av frie fettsyrer. Laveste angitte nivå er PV lik 5 meq/kg og AV lik 10, som gjelder for oppdrettslaks og oppdrettstorsk. Farmakopømonografiene omhandler verken musling-, krill-, sel- eller haileveroljer.

Council for Responsible Nutrition, som representerer kosttilskuddprodusenter i USA, utarbeidet i 2002 en monografi basert på daværende europeiske farmakopømonografier og farmakopøforslag. I denne monografien ble grenseverdiene satt til PV 5 meq/kg og AV 20, som gjenspeiler de strengeste grenseverdiene i den anvendte litteraturen. I tillegg inkluderer monografien maksimumsverdi for beregning av den totale oksidasjonsverdien (TOTOX-verdien) til 26, for å indikere at en olje ikke skal ha høyeste verdier på begge parametre (Council for Responsible Nutrition, 2002; Council for Responsible Nutrition, 2006). Denne monografien går nå under navnet *GOED Voluntary Monograph*, og monografien er frivillig for produsenter å etterfølge. GOED, *Global Organization for EPA and DHA omega-3s*, er en internasjonal sammenslutning av produsenter, distributører, markedsførere, forhandlere og støttespillere av produkter som inneholder EPA og DHA (GOED, 2007). Monografien gitt av GOED er ment å gjelde for EPA- og DHA-oljer til kosttilskudd fra kildene fisk, planter og encellede organismer, men derimot ikke for torskeleveroljer, produkter med høyere konsentrasjon av EPA og DHA enn 80 %, eller omega-3 i form av frie fettsyrer. I motsetning til farmakopømonografiene presiserer denne monografien at omega-3-produktene er ment å

være innenfor maksimumsverdiene hele produktets holdbarhetsperiode (GOED, 2006). Kanadiske helsemyndigheter anbefaler også at produsenter av seloljer følger de samme grenseverdiene (Health Canada, 2009) som GOED..

3.1.5 Kontroll og tilsyn med omega-3-markedet

Mattilsynet forvalter alle lover som omhandler produksjon og omsetning av mat og kosttilskudd i Norge, og skal blant annet sikre forbrukerne helsemessig trygg mat. Virksomheter plikter selv å etterleve lover og forskrifter, og *Mattilsynet* utfører kontroller og følger opp pålagte krav (*Mattilsynet*, 2010).

I Norge ble i 2006 omega-3-produkter solgt for 488 millioner kroner på helsekostmarkedet. Disse tallene utgjør 22 % av det totale helsekostsalget, og gjør dermed omega-3-produkter til den mest solgte varegruppen innen helsekostsegmentet (Bransjerådet for Naturmidler, 2010). Likevel fører verken *Mattilsynet*, *Bransjerådet for Naturmidler* eller andre instanser tilsyn med hvilke omega-3-produsenter eller produkter som er på markedet i Norge, og heller ikke hvor mange omega-3-produkter som importeres eller selges. Dette medfører at det per i dag ikke finnes noen oversikt over omega-3-produkter som er tilgjengelig for forbruker. Det finnes følgelig heller ingen oversikt over hvilke omega-3-produkter som det selges mest av. Rutinemessige kvalitetskontroller av omega-3-produkter foretas ikke, verken når det gjelder oksidasjon eller andre kvalitetsparametre. Det foreligger heller ingen enkeltstående kontroll av oksidasjonskvalitet hos omega-3-oljeprodusenter eller av omega-3-produkter. I Norge er det oljeprodusentene selv som har ansvaret for å overholde kravene i farmakopømonografiene (*Mattilsynet*, 2010). Flere produsenter har i tillegg interne retningslinjer som er enda strengere

3.1.6 Omega-3-oljer, kvalitet og helse

Fiskeoljer blir i økende grad tilsatt i matvarer, kalt *functional food*. Kravene til disse oljene når det gjelder oksidasjon må av praktiske årsaker være strengere for at smaken skal være akseptabel for forbruker. Oljer med lavt nivå av oksidasjonsprodukter blir derfor benyttet til dette formålet. Functional food oljer har normalt oksidasjonsverdier PV under 0.5, AV under 2 og TOTOX-verdi under 5. Dette viser at det faktisk er mulig å produsere oljer av svært høy kvalitet.

På bakgrunn av dokumenterte helseeffekter av EPA og DHA er det ønskelig at disse inkluderes i kostholdet (Landmark, Aursnes, Reikvam & Alm, 2007; Burr et al, 1989; Daviglus et al., 1997; Kromhout, Bosschieter & de Lezenne Coulander, 1985; Wang et al., 2006; Nordic Council of Ministers, 2004; Statens råd for ernæring og fysisk aktivitet, 2002). Det har i den senere tid blitt fremmet påstander om at oksiderte flerumettede fettsyrer eller oksidasjonsprodukter av disse kan ha ugunstige effekter på helsen (Turner, McLean & Silvers, 2006). Derimot foreligger det få humane studier hvor effekten av oksiderte fiskeoljer er undersøkt (Rubin rapport, 173, 2009). I tillegg fremkommer sjeldent, om ikke aldri, oksidasjonsgraden i omega-3-oljer benyttet i kliniske studier hvor helseeffekter av omega-3 blir studert. Hvorvidt oksidasjonskvaliteten på omega-3-oljer påvirker effekten av omega-3-fettsyrer er ukjent. Samtidig er nivået av oksidasjonsprodukter i omega-3-produkter ukjent.

En fiskeolje som skal inngå i helsekostprodukter gjennomgår en rekke forskjellige prosesser før den ender opp hjemme hos en konsument, og det kan være mange faktorer som kan påvirke sluttkvaliteten. Skal en produsere oljer av topp kvalitet som er tilnærmet smak- og luktfrie er det viktig at råvarene er av topp kvalitet, og ferskhetsgrad av råoljen er meget viktig. Allerede oksiderte oljer inneholdende for eksempel core-aldehyder vil kunne følge oljen, og føre til økt anisidintall på sluttproduktet. Core-aldehyder er et ikke-flyktig oksidasjonsprodukt som dannes når hydroperoksider bundet i triglyserider brytes ned og aldehydgruppen forblir festet til glyseridet (Frankel, 2005). Disse kan være vanskelige å fjerne under vanlig raffineringen. (Allen & Hamilton, 1994). Nedbrytingsprodukter av hydroperoksider, innhold av core-aldehyder og lavere innhold av naturlige antioksidanter gjør at en meget oksidert råolje vil være mer utsatt for oksidasjon også etter raffinering (Allen & Hamilton, 1994; Frankel, 2005). Ferskhetsgrad på fisken forut for prosessering er en viktig faktor for kvaliteten på råoljen. Grad av ferskhetsgrad vil påvirke innholdet av frie fettsyrer, nivået av oksidasjonsprodukter, farge på oljen, samt innhold av tokoferoler. Også skånsom og effektiv utvinning vil kunne være med på å gi en olje med et lavere innhold av frie fettsyrer, oksidasjonsprodukter, proteinrester og spormetaller som kobber og jern. Oljen vil i tillegg være av lysere farge og med et høyere tokoferolinnhold. Omega-3-oljer som er skånsomt utvunnet fra ferskt råstoff vil være mer stabile mot oksidasjon enn omega-3-oljer utvunnet fra råstoff av dårligere kvalitet (Allen, 1995; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1986). Et hygienedirektiv fra EU setter en grense på 36 timer fra fangst til prosessering dersom fisken er lagret uten kjøling og oljen skal gå til human konsum (Commission Regulation (EC) No 1020/2008, 2008).

Også gjennom raffineringprosessen er oljen utsatt for stress, og en kan fort få initiert en oksidasjon. Forurensningene i råoljer er først og fremst miljøgifter, frie fettsyrer, fosfolipider, pigmenter, spormetaller, oksidasjonsprodukter, svovel- og halogenkomponenter. Flere av disse komponentene kan få oljen til å oksidere videre. Det er mange årsaker til at forurensningene er til stede i råoljen, og de kan være et naturlig resultat av geografisk område, fiskens kost og sesong. Alle råoljer varmes opp uten tilgang til oksygen under raffineringen. Primære og flyktige sekundære oksidasjonsprodukter som har blitt dannet vil da reduseres eller fjernes. Det samme vil nivået av naturlige antioksidanter. En olje som i utgangspunktet er meget oksidert vil få et lavt innhold av primære oksidasjonsprodukter etter raffinering. Det er likevel sannsynlig at nedbrytingsproduktene av de primære oksidasjonsproduktene som fortsatt er i oljen, vil kunne fortsette oksidasjonen (Allen & Hamilton, 1994).

Fremstilling av oppkonsentrerte omega-3-oljer gjøres vanligvis ved ureafraksjonering og/eller molekylærdestillasjon. Under molekylærdestillasjon vil core-aldehyder, i tillegg til andre urenheter, fjernes (ALASALVAR & TAYLOR, 2002; FRANKEL, 2005). Det høye innholdet av C20:1 i de nordeuropeiske pelagiske fiskeslagene utgjør en teknologisk utfordring når det gjelder å oppkonsentrere disse oljene, fordi denne fettsyren ofte er vanskelig å skille fra EPA og DHA under oppkonsentrering. Lav konsentrasjon av EPA og DHA, samt høyt innhold av C20:1 i nordeuropeisk fiskeolje gjør at 18/12-oljer ofte foretrekkes til oppkonsentrering.

Raffineriene har gode kvalitetsstyringsrutiner som skal forhindre at oljen blir oksidert gjennom prosessen. En ferskprosessert olje kunne imøtekomme kravet til GOED. Etter raffinering vil en olje umiddelbart begynne å oksidere, og det er av stor viktighet å få

stabilisert oljen. Mest brukt som antioksidant er tokoferoler. Oljer til helsekostmarkedet blir gjerne kapslet i gelatinkapsler. De fleste kapslene på markedet i dag består av bovint gelatin, men det er et økende marked for fiskegelatinkapsler. Under tapping og transport for kapsulering kan oljen bli utsatt for ytterligere stress og muligheter for kontaminering (eks stålfat med dårlig eller ingen lakk), dårlige lagringsbetingelser etc. Under kapsuleringen er det videre risiko for at oljen kan bli oksidert gjennom blant annet tørking av kapsel etter fylling. Etter kapsulering blir produktene pakket, transportert og lagret, både på vanlig lager og i butikkhyllene. Her kan temperaturfluktueringer og luftfuktighet påvirke graden av oksidasjon. Det er derfor mange muligheter til at en høykvalitetsolje som forlater et raffineri kan bli oksidert før den når frem til forbruker. Det finnes ingen kontrollsystemer for å fange opp dette, og helsekostmarkedet som kjøper og selger disse oljene har i mange tilfeller minimal kunnskap om fiskeoljer, kvalitet og behandling av disse.

3.1.7 Kartlegging av markedet

Som nevnt tidligere utvinnes fiskeoljer primært fra fisk fra Sør-Amerika og Nord-Afrika eller Nord-Europa. I tillegg benyttes andre kilder til å produsere marine omega-3-oljer, som krill, sel, hai og musling. Marine oljer inneholder spesielt mye av de høyt flerumettede fettsyrene EPA og DHA. Konsentrasjonen av EPA og DHA er høyere i oljer med opprinnelse i fisk fra Sør-Amerika og Nord-Afrika, enn i oljer med utgangspunkt i nordeuropeisk fisk. I tillegg oppkonsentreres fiskeoljer for å få høyere konsentrasjon av EPA og DHA. På grunn av høy konsentrasjon av disse fettsyrene er marine omega-3-oljer utsatt for oksidasjon.

I 2006 ble omega-3-produkter i Norge solgt for nærmere en halv milliard kroner. Likevel foreligger ingen offisielle krav, verken nasjonalt eller internasjonalt, vedrørende kvalitet på omega-3-produkter som selges, med tanke på oksidasjonsnivå. Da det heller ikke gjennomføres rutinemessige kontroller av marine omega-3-oljer, er det ikke kjent hvorvidt nivået av oksidasjonsprodukter i omega-3-produkter på markedet er forskjellig fra de krav som settes for fiskeoljeproduksjon i de europeiske farmakopøer eller grenseverdier for oksidasjon i frivillig monografi gitt av GOED, som i tillegg gjelder for omega-3-produkter i salg.

Hensikten med denne kartleggingen var å undersøke nivå av primære og sekundære oksidasjonsprodukter, målt ved PV og AV, samt ved beregnet total oksidasjonsverdi (TOTOX-verdi) i marine omega-3-produkter tilgjengelig for norske forbrukere. Oksidasjonsnivået i omega-3-produktene ble i tillegg sammenlignet med grenseverdier angitt i europeiske farmakopømonografier og monografi utarbeidet av GOED.

3.1.8 Utvalg av oljer

Markedsundersøkelsesbyrået *AC Nielsen* innehar oversikt over omega-3-produkter i dagligvarehandelen, men denne er ikke komplett. En mer komplett liste over omega-3-produkter på markedet i Norge ble forsøkt utviklet ved å ta kontakt med produsenter, butikkjedekontorer og grossister. Dette var svært vanskelig fordi interessen for å bidra med informasjon hos enkelte butikker/leverandører/produsenter blant annet ikke var til stede, samtidig som utskiftingen av produktet på markedet var stor. Produktlisten fra *AC Nielsen* ble redigert og supplert med informasjon fra fire produsenter, tre grossister og seks større

kjedekontorer innen dagligvare, helsekost, sportsforretninger og apotek. Listen omfattet cirka 155 produkter (se Vedlegg 1), og arbeidet med denne ble avsluttet i desember 2009. Innkjøp ble gjort parallelt med utarbeidelse av produktlisten i perioden august til november 2009 i forretninger i Oslo- og Akershusområdet. I november/desember ble perioden mellom hver gang nye produkter ble funnet i butikkhyllene lengre, og innsamlingen avsluttet. Dette gjorde at innkjøp og utarbeidelse av produktliste ble avsluttet ved omtrent samme tidspunkt. Verken innkjøpslisten eller oversiktslisten kan anses å være komplette, men gir en pekepinn på hva som var tilgjengelig for konsument i angjeldende tidsperiode. De marine omega-3-produktene i dette utvalget var i kommersielt salg i innkjøpsperioden i helsekostforretninger (n = 41), apotek (n = 21), dagligvare (n = 18), sportsbutikker (n = 6) og via internett/post (n = 17). I tillegg var enkelte omega-3-produkter å finne i forretninger som var kombinasjon av parfymeri og helsekost (n = 7), og butikker som selger ulike artikler og til dels mat (n = 3). Listen over inkluderte produkter (n = 113) er vist i *Vedlegg 2*.

Internettprodukter (n = 16) ble valgt ut ved å bruke søkemotoren *Google*, og søkeord *omega 3*, begrenset til søkervalget *Sider fra Norge* den 8. september 2009. Søket gav cirka 120 000 treff den aktuelle dagen. Av disse ble omega-3-produkter som lå som annonser valgt ut. I tillegg kom ett produkt tilfeldig som prøvepakke med reklamepost i innkjøpsperioden og ble også inkludert. Inklusjonskriterier var at produktene måtte ha minst seks måneders gjenstående holdbarhet fra september 2009, samt være deklarerert med minst en marin oljekilde. Der hvor samme produkt fantes både med og uten aroma, ble produktet uten aroma valgt. De fleste produktene i dette utvalget var i kapselform (n = 94) eller som flytende oljer (n = 17), i tillegg til i tablettform (n = 1) og kapsler med pulver (n = 1).

Informasjon fra varedeklarasjonene viste at de fleste av omega-3-produktene inneholdt utelukkende én marin oljekilde, men enkelte inneholdt en kombinasjon av fiskeolje og krillolje (n = 6) eller sel- og fiskeolje (n = 1). Marine oljekilder i produktene var fiskeolje (n = 86), selolje (n = 17), krillolje (n = 12), haileverolje (n = 4) og muslingolje (n = 1). Mange av produktene inneholdt i tillegg andre ikke-marine oljekilder (*Tabell 1*). Generelt oppgis verken fettsyreform i oljene benyttet i de oppkonsentrerte produktene eller type fiskeolje i varedeklarasjonen.

Tabell 1 Oversikt over ulike oljekilder som er brukt i de testede produktene.

Oljekilde	Antall produkter	% av alle produktene
Fisk	86	(76)
Sel	17	(15)
Krill	12	(11)
Hailever	4	(4)
Musling	1	(1)
Soya	10	(9)
Agurkurt	7	(6)
Kjempenattlys	7	(6)
Solsikke	5	(4)
Oliven	3	(3)
Linfrø	3	(3)
Raps	2	(2)
Palme	1	(1)
Druekjærne	1	(1)
CLA	1	(1)

Tabell 1 gir oversikt over ulike oljekilder som er brukt i de testede produktene, og hvor mange som inneholdt disse, i de marine omega-3-produktene i utvalget (n = 113). Et produkt kunne inneholde flere kilder til omega-3-fettsyrer.

I tillegg til oljene beregnet for helsekostmarkedet, ble oljer av "functional food"-kvalitet analysert. Disse oljene har gjerne en annen historie og prosessering, og kan ikke sies å direkte kunne sammenliknes med konvensjonelle helsekostprodukter. Oljene til "functional food"-produkter har for eksempel en PV på under 1 og er laget av meget ferskt råstoff. Siden disse oljene skiller seg såpass ut, har vi latt være å ta disse med i resultatene. Blant annet på grunn av pris inngår normalt ikke disse oljene i helsekostsegmentet. Imidlertid finnes det i dag noen helsekostprodukter i kapselform som er basert på "functional food"-kvalitetsoljer. Disse er analysert separat, men er imidlertid ikke med i undersøkelsen og selges kun i mindre kvanta.

3.2 Metode, delprosjekt 1

Flaskene med flytende oljer ble umiddelbart etter prøveuttaking flushet med nitrogengass for å forhindre videre oksidasjon. Flaskene ble oppbevart i kjøleskap mellom hver analyse. Innkapslede produkter ble oppbevart som de var, i romtemperatur uten lyseksposering, da dette var angitt som anbefalt lagringsform på de forpakninger hvor lagringsbetingelser var angitt. Alle analyser (PV, AV og fettsyresammensetning) er kjørt som paralleller, og alle verdier er beregnet på bakgrunn av gjennomsnittet for parallellene. To oljer med kjent oksidasjonsverdi ble benyttet som referanse i analysene av oksidasjonsprodukter for å kontrollere målemetodene ved hver sekvenskjøring.

3.2.1 Peroksidverdi

Nivået av hydroperoksider kan fastslås ved å måle PV, som er en av de eldste og mest benyttede metodene for vurdering av oksidativ status i oljer (Council of Europe, 2008; Frankel, 2005; GOED, 2006). Det finnes flere analytiske metoder, og ulike analytiske målemetoder er kommersielt tilgjengelig på markedet. Resultatene man får vil derfor variere, avhengig av hvilken metode som benyttes. Resultater fra ulike metoder er derfor ikke alltid direkte sammenlignbare. For fett og oljer fastsettes ofte PV ved bruk av en jodometrisk metode. Metoden baseres på at hydroperoksidgrupper reduseres av jodioner (I^-). Mengden jod (I_2) som frigjøres er proporsjonal med konsentrasjonen av peroksider til stede i oljen. Frigjort I_2 måles ved titrering mot en standardløsning av natriumthiosulfat ved bruk av en stivelsesløsning som indikator. PV uttrykkes som milliekvivalenter jod per kg av lipider¹ (Frankel, 2005; Shahidi & Wanasundara, 1998). Metoden har normalt en sensitivitet på 0.5 meq/kg (Frankel, 2005). Målemetoden ble utført i henhold til *AOCS Official Method Cd 8-53* på 24 omega-3-produkter. I tillegg ble det analysert på enkelte "vanskelige" prøver inneholdende andre tilsetninger. For omega-3-produkter som viste seg å være lavoksiderte ble 0.01 N natriumthiosulfat benyttet.

3.2.2 PeroxySafe™ STD Kit

PeroxySafe™ STD Kit er en kjemisk kolorimetrisk målemetode, som er basert på overføring av frie radikaler til et metallkromogent kompleks. Metoden ble tatt med for å få en evaluering av denne som en hurtig og enkel metode som baserer seg på spektrofotometri. Resultater avleses som meq/kg prøve, og økning i hydroperoksider er direkte proporsjonal med økning i absorbans. Målemetoden angir PV i området mellom 0.02 og 50 meq/kg. For å kalibrere metoden benyttes tre kalibratorer med ulike konsentrasjoner av hydroperoksider (MP Biomedicals, 1994; MP Biomedicals, årstall ikke oppgitt).

Metoden ble validert mot *AOCS Official Method Cd 8-53* ved å analysere 24 marine oljer uten tilsetninger (utover antioksidanter) med ulik PV. *PeroxySafe™ STD Kit* metoden gav et systematisk avvik fra den offisielle metoden som måtte korrigeres for. Etter korrigering viste målemetoden god korrelasjon med referansemetoden ($r = 0.98$). Alle resultater av kittet ble omregnet i henhold til formelen for å direkte kunne sammenligne resultatene med *AOCS Official Method Cd 8-53*. Alle resultater av *PeroxySafe*-metoden ble konvertert til AOCS-verdier. Peroxysafe er AOAC sertifisert.

3.2.3 Anisidinverdi

Måling av AV gir et uspesifikt estimat av innhold av sekundære oksidasjonsprodukter, hovedsakelig i form av aldehyder som følge av nedbrytning av hydroperoksider. Måling av AV ved spektrofotometri er en vanlig metode for å anslå nivå av sekundære oksidasjonsprodukter i marint, animalsk og vegetabilsk fett og oljer. Aldehyder i oljen reagerer med para-anisidin i en eddik/isooktanløsning. Nivået av reaksjonsprodukter fastslås deretter spektrofotometrisk ved 350 nanometers (nm) bølgelengde (Allen & Hamilton, 1994; Shahidi & Wanasundara, 1998). AV er definert som 100 ganger absorbansen i en løsning hvor ett gram fett eller olje er løst i 100 ml blanding av løsemiddel og para-anisidin, avlest

¹ PV kan også uttrykkes som millimol hydroperoksider per kg lipider. Dette gjøres ved å multiplisere PV uttrykt som meq jod/kg med 2 (Frankel, 2005)

ved 350 nm bølgelengde i en 1 cm celle (Allen & Hamilton, 1994; AOCS, 1990a). Det er aldehydene 2-alkanaler og 2,4-dienaler som primært har blitt antatt å utgjøre de største utslagene på AV (AOCS, 1990a). Senere studier har likevel vist at det kan være at metoden ikke er så spesifikk i hvilke sekundære oksidasjonsprodukter den måler (Frankel, 2005; Olsen, 2005). Anisidintall har ingen benevning.

Fargeintensiteten på reaksjonsproduktet som dannes avhenger ikke kun av mengde aldehydkomponenter, men også av deres struktur. Para-anisidin måler både mettede og umettede aldehyder (Allen & Hamilton, 1994). Para-anisidin ble renset i henhold til AOCS Official Method Cd 18-90 (AOCS, 1990a). Metoden er gjennomført i henhold til AOCS Official Method Cd 18-90. Samtlige produkter er analysert ved bruk av metoden. Anisidintall er en velkjent metode hos alle fiskeoljeprodusenter og inngår som en av analysemetodene i monografiene.

3.2.4 TOTOX-verdi

Fordi PV i en olje endres over tid, og fordi AV øker som følge av at hydroperoksider brytes ned, vil oksidasjonskvaliteten på en olje best beskrives ved å se disse to verdiene i sammenheng med hverandre. I industrien gjøres dette ofte ved å beregne den totale oksidasjonsverdien, TOTOX-verdien. TOTOX-verdien kombinerer dermed historien til en olje (gjenspeilet i AV) med dens nåværende tilstand (ved PV). Derfor har beregning av TOTOX-verdien blitt utført i utstrakt grad for å estimere den oksidative forringelsen i en olje (Allen & Hamilton, 1994). Til tross for dens praktiske fordel har ikke TOTOX-verdi noen solid vitenskapelig basis fordi den kombinerer variabler med ulik benevning (Shahidi & Wanasundara, 1998). PV multipliseres fordi en PV-ekvivalent antas å gi opphav til to AV-ekvivalenter (Allen & Hamilton, 1994). TOTOX-verdi kan beregnes ved formelen:

$$\text{TOTOX} = 2 \times \text{PV} + \text{AV}$$

3.2.5 Fettsyresammensetning av oljer

Fettsyresammensetning ble bestemt ved hjelp av gasskromatografi (GC) på fettsyremetylestere (FAME) på en Agilent 5890 gasskromatograf med helium som bæregass. FAME ble separert på SGE BPX-70 kapillærkolonne (60 m* 0,25 mm i.d* 0,25 µm film) og detektert ved hjelp av en flammeionisasjonsdetektor (FID) Fettsyresammensetning ble verifisert ved hjelp av standard 68D (Nu-Check Prep Inc) og GC/MS analyser.

3.2.6 Stressing av oljer gjennom kapsulering

Fersk raffinert olje basert på ferske norske råvarer av "functional food"-kvalitet ble flushet med nitrogen og tilsatt en antioksidantmikts bestående av tokoferolmikts, askorbylpalmitat og rosmarinekstrakt, fylt på 50 liters tønner med innvendig lakkering og sendt til England for kapsulering. Peroksid tall, anisidintall og fettsyresammensetning ble analysert før og etter kapsulering. Etter mottak av oljen ble kapsler lagret mørkt i hvite medisinbokser (Duca) ved romtemperatur i 6 måneder før ny analyse av peroksid tall, anisidintall og fettsyresammensetning.

3.2.7 Statistiske analyser

I denne studien er resultatene av oksidasjonsverdier og EPA- og DHA-konsentrasjon i omega-3-produktene hovedsakelig presentert ved bruk av deskriptive analyser. Dataene var ikke normalfordelte for PV, AV eller TOTOX-verdi. Derfor er resultatene presentert som median og med minimums- og maksimumsverdi (spredning). Ved sammenligning av to undergrupper ble *Mann-Whitney U Test* benyttet. For å undersøke hvorvidt det var korrelasjon mellom konsentrasjon av sum EPA og DHA med målte oksidasjonsverdier (PV, AV og TOTOX-verdi) ble *Spearman's Rho* analyse benyttet. *Wilcoxon Signed Rank Test* ble benyttet for å sammenligne deklarerert innhold av EPA og DHA versus konsentrasjon av EPA og DHA målt ved GC. Statistisk signifikans er definert som $p \leq 0.05$. Ved testing av de ulike oljetyperne mot hverandre ble *Kruskall Wallis Test* utført. Når disse gruppene deretter ble testet to og to ved hjelp av *Mann Whitney U Test* ble signifikansnivået beregnet ved å dividere på antall tester utført på det opprinnelige signifikansnivået ($p = 0.05$). I dette tilfellet ble derfor signifikansnivået satt til $p \leq 0.0125$. Alle analyser av nivå av oksidasjonsprodukter og innhold av EPA og DHA i omega-3-produkter er gjennomført i *Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS, versjon 16.0.

3.3 Resultat, delprosjekt 1

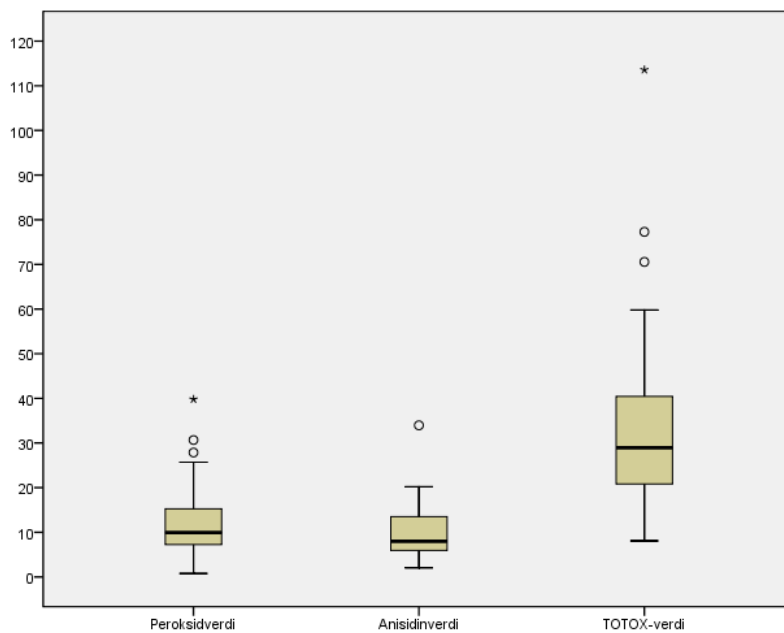
3.3.1 Utvalg av ulike oljer

Det ble gjennomført måling av oksidasjon på alle omega-3-produktene ($n = 113$) ved bruk av PV- og AV-metodene slik som beskrevet tidligere i rapporten. Imidlertid viste det seg at PV og AV for en rekke omega-3-produkter ikke lot seg detektere, eller resultatet viste unormale eller ekstremt høye verdier i forhold til øvrige omega-3-produkter i utvalget. I tillegg gav måling av AV negative verdier for flere av de testede produktene. Omega-3-produkter hvor det var tilsatt forskjellige komponenter til oljene, så ut til å påvirke analysene på en slik måte at resultatene ble feil. Dette førte til at alle produkter som inneholdt krillolje, og alle produkter som var i emulsjonsform eller inneholdt spor av vann, ble ekskludert fra PV- og AV-analysene. Likeledes var det med omega-3-produkter som var tilsatt aroma i form av estere og terpenener, fargestoff, Q10, spormetaller, samt produkter i tablettform, da disse gav resultater som vi måtte anta var feilaktige på grunn av ekstremverdier. Utvalget ble dermed redusert fra 113 til totalt 56 omega-3-produkter.

I dette reduserte utvalget var 38 av omega-3-produktene deklarerert med fiskeolje som eneste marine oljekilde, 13 var deklarerert med selolje, tre var deklarerert med haileverolje, ett produkt var deklarerert med kombinasjon av sel- og fiskeolje og ett omega-3-produkt var deklarerert med muslingolje som marin oljekilde.

3.3.2 Oksidasjonsnivå i omega-3-produkter

Median verdi av PV (i meq/kg), AV og TOTOX-verdi for hele gruppen av omega-3-produkter ($n = 56$) var henholdsvis 9.9 (0.8-39.8), 8.0 (2.1-34.0), og 29.0 (8.1-113.6). Figur 1 viser spredningen i materialet. 25 % av omega-3-produktene hadde verdier tilsvarende eller lavere enn 7.3, 9.9 og 15.3 for henholdsvis PV, AV og TOTOX, mens 25 % hadde PV, AV og TOTOX-verdi tilsvarende eller høyere enn 15.3, 13.6 og 40.9. Tre produkter skiller seg ut med høye verdier for både PV og TOTOX-verdi. I tillegg hadde ett produkt høy AV.

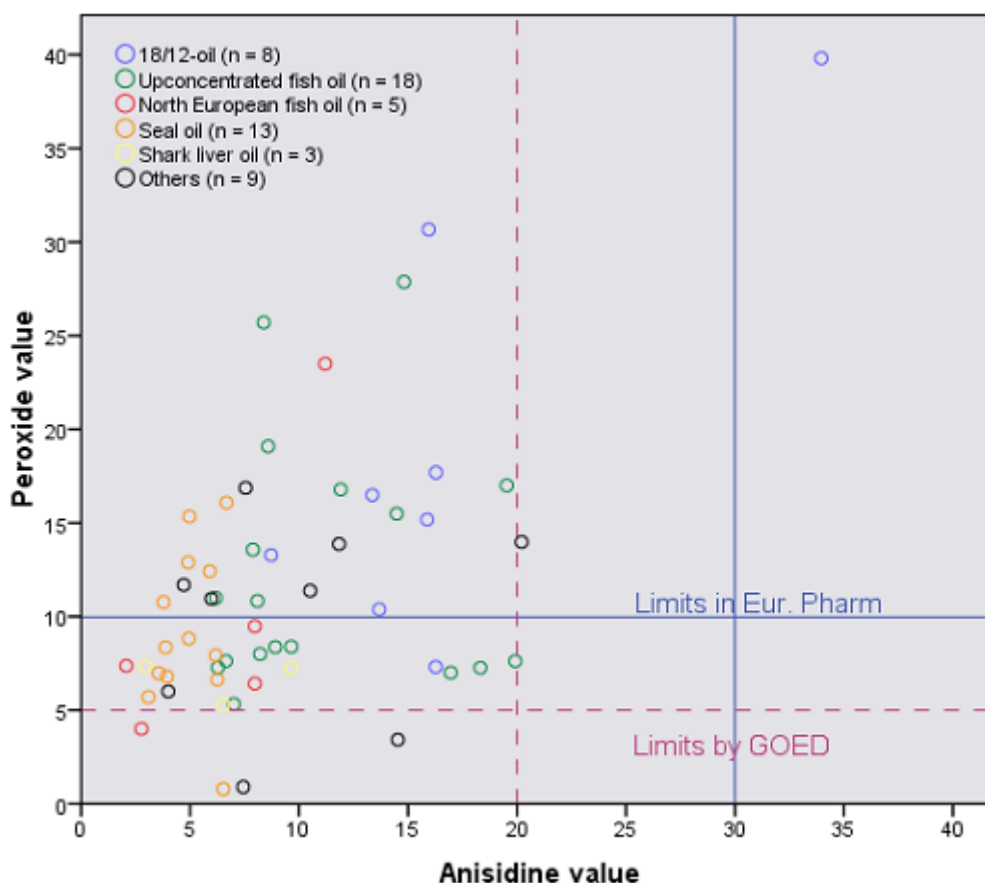


Figur 1 "Box and whiskers plott" viser fordelingen av peroksidverdi (PV), anisidinverdi (AV) og TOTOX-verdi for 56 omega-3-produkter. Median, 25- og 75-persentiler er angitt ved midtre, nedre og øvre linje i boksene, og laveste og høyeste verdi er angitt ved "whiskerne". Uteliggere er markert med sirkler (verdier som er 1.5 bokselengder eller mer over hver boks) eller stjerner (verdier som er 3 bokselengder eller mer over hver boks).

3.3.3 Oksidasjonsnivå sammenlignet med grenseverdier

Det er, som nevnt tidligere, ulike grenseverdier for oksidasjon i de europeiske farmakopømonografiene avhengig av fiskeoljetype. Høyeste angitte grenseverdi for PV er 10 og for AV 30. Grenseverdi for TOTOX benyttes ikke i denne sammenheng, men kan ved bruk av verdiene nevnt over beregnes til maks 50. Det var interessant å undersøke nivå av oksidasjon i omega-3-produktene i forhold til disse grenseverdiene angitt i flere farmakopømonografier.

Vi finner at 28 av de 56 omega-3-produktene hadde en PV over høyeste grenseverdi angitt i flere farmakopømonografier. Ett omega-3-produkt hadde høyere AV enn grenseverdien, og dette produktet hadde i tillegg høyeste nivå av PV (Figur 1). Sju omega-3-produkter hadde TOTOX-verdi over 50. Når vi sammenligner nivå av oksidasjonsprodukter med grenseverdier i monografi fra GOED, som har noe strengere krav enn den europeiske farmakopøen ($PV < 5$, $AV < 20$, $TOTOX\text{-verdi} < 26$), finner vi at 52 av 56 omega-3-produkter i denne studien hadde PV høyere enn GOEDs grenseverdi, og at to omega-3-produkter hadde AV over grenseverdien angitt i GOEDs monografi (Figur 2). Trettititre av 56 omega-3-produkter hadde TOTOX-verdi over 26.



Figur 2 viser peroksidverdi (PV) og anisidinverdi (AV) i hver av omega-3-produktene ($n = 56$) i forhold til grenseverdi angitt i europeiske farmakopømonografier som heltrukne linjer (for PV 10 og AV 30). Forholdet til grenseverdi angitt i monografi fra GOED (PV 5 og AV 20) er vist som stiplede linjer i diagrammet. Figuren viser at kun fire produkter har PV og AV innenfor grenseverdi fra GOED.

3.3.4 Oksidasjon og konsentrasjon av EPA og DHA

Fordi høy konsentrasjon av flerumettede fettsyrer gjør en olje mer utsatt for oksidasjon, ønsket vi å undersøke om konsentrasjonen av sum EPA og DHA målt ved GC korrelerte med nivå av PV og AV funnet i denne studien. Alle omega-3-produkter i det reduserte utvalget er inkludert ($n = 56$). Vi fant en svak positiv korrelasjon mellom økende konsentrasjon av EPA og DHA, basert på GC-resultater og PV ($r = 0.3$, $p = 0.025$), og middels sterk positiv korrelasjon i forhold til AV ($r = 0.6$, $p < 0.001$) og TOTOX-verdi ($r = 0.5$, $p < 0.001$). Ved oksidasjon er EPA og DHA de mest utsatte fettsyrene, og fettsyrene kan potensielt ødelegges. Det var derfor interessant å undersøke konsentrasjonen av fettsyrene i oljene, og sammenligne deklart konsentrasjon med analysert konsentrasjon av EPA og DHA i hele utvalget av 113 omega-3-produkter. Alle produkter er likevel ikke inkludert, fordi varedeklarasjon for enkelte produkter var mangelfull. Det var statistisk signifikant høyere nivå estimert fra GC-analyser av EPA, median 170 (8-670) mg/g olje versus 188 (10-590) mg/g olje ($p < 0.001$), DHA, median 145 (8-455) mg/g olje versus 142 (14-538) mg/g olje ($p < 0.001$), og sum EPA og DHA, 300 (49-860) mg/g olje versus 318 (40-790) mg/g olje ($p < 0.001$), enn deklart konsentrasjon ($n = 96$).

3.3.5 Oksidasjonsnivå og ulike oljer

Fiskeoljer kan også være oppkonsentrert på fettsyrene EPA og DHA. I tillegg kan annet marint råstoff benyttes i marine omega-3-oljer. Vi ønsket å undersøke om det var forskjell i oksidasjonsnivå mellom omega-3-produkter med ulik geografisk opprinnelse, ulik konsentrasjon av EPA og DHA eller ulik marin opprinnelse.

Inndelingen ble foretatt på bakgrunn av informasjon fra varedeklarasjon. For omega-3-produkter som hadde fiskeolje som eneste deklarererte marine oljekilde (n = 38) ble i tillegg gjennomførte analyser av fettsyresammensetning benyttet til å anslå opprinnelsesområde, samt om produktet var oppkonsentrert eller ikke. Dette ble gjort fordi kun et fåtall av produktene angir fiskeoljetype på varedeklarasjonen. For omega-3-produkter som ikke var basert på fiskeolje ble informasjon fra varedeklarasjonen benyttet for å angi marin opprinnelse. Omega-3-produkter som ble deklarerert med selolje og haileverolje ble inndelt i hver sine subgrupper. I tabell 2 er inndeling av de ulike subgruppene vist. I tillegg viser tabellen median og variasjon i konsentrasjon av EPA og DHA for hver av subgruppene. Det er sterk grunn til å anta ut i fra fettsyresammensetningen at samtlige av de oppkonsentrerte oljene har sitt utspring i 18/12 oljer.

47 av 56 omega-3-produkter er inkludert i analysen av subgruppene. Følgende omega-3-produkter ble ikke tatt med: seks produkter basert på fiskeolje som ikke lot seg kategorisere ved bruk av analyser av fettsyresammensetning, to produkter som var en blanding av flere marine oljekilder og ett produkt var basert på muslingolje.

Tabell 2 Inndeling og antall av omega-3-produkter.

Oljetype (n)	Konsentrasjon a sum EPA og DHA mg/g
18/12-olje (8)	310 (270-330)
Oppkonsentrert fiskeolje* (18)	590 (490-790)
Nordeuropeisk fiskeolje** (5)	210 (140-240)
Selolje*** (13)	170 (120-320)
Haileverolje (3)	120 (70-130)

Tabell 2 viser inndeling og antall av omega-3-produkter for oljetyper med ulik marin opprinnelse, samt oppkonsentrerte fiskeoljer (n = 47) basert på varedeklarasjon, i tillegg til analyser av fettsyresammensetning for fiskeoljeprodukter. Konsentrasjonen av fettsyrene EPA og DHA oppgitt i mg/g er beregnet på bakgrunn av analyser av fettsyresammensetning ved bruk av GC-resultater. Konsentrasjon av EPA og DHA er presentert som median (spredning). *Olje basert på 18/12 olje, hvorav seks er ekskludert fordi de ikke kunne utelukkes å være i kombinasjon med ikke-oppkonsentrerte fiskeoljer, eller inneholdt vegetabiliske oljer. **Kun et produkt tydet på å være basert på lakseolje. Fordi produktet hadde lik oksidasjonsprofil som torskeleveroljene, er dette produktet slått sammen med torskeleveroljene til kategorien Nordeuropeiske fiskeoljer. *** Et produkt var kombinasjon av selolje og fiskeolje og er derfor ekskludert.

Medianverdi for PV, AV og TOTOX-verdi inndelt i forhold til de ulike oljetyper: 18/12-oljer, oppkonsentrerte fiskeoljer, nordeuropeiske fiskeoljer, seloljer og haileveroljer er vist i *Tabell 3*. Denne studien viser at 18/12-oljer hadde høyere medianverdier for PV, AV og TOTOX-verdi enn de øvrige gruppene og stor spredning i nivå av oksidasjonsprodukter. Nordeuropeiske fiskeoljer, seloljer og haileveroljer hadde alle en median under grenseverdi i den europeiske farmakopø for PV, i motsetning til 18/12-oljer, hvor median PV var over grenseverdi i den europeiske farmakopø, i tillegg til høyere median AV enn de øvrige subgruppene. Oppkonsentrerte fiskeoljer hadde noe høyere medianverdier enn nordeuropeiske fiskeoljer, seloljer og haileveroljer.

Tabell 3 PV, AV og TOTOX-verdi.

	PV	AV	TOTOX
18/12-oljer (n = 8)	15.8 (7.3-39.8)	15.9 (8.7-34.0)	46.3 (30.9-113.6)
Oppkonsentrerte fiskeoljer* (n = 18)	9.6 (5.3-27.9)	8.7 (6.2-19.9)	31.9 (17.7-70.6)
Nordeuropeiske fiskeoljer** (n = 5)	7.4 (4.0-23.5)	8.0 (2.1-11.2)	20.8 (10.8-58.2)
Seloljer*** (n = 13)	8.4 (0.8-16.1)	4.9 (3.1-6.7)	22.0 (8.1-38.8)
Haileveroljer (n = 3)	7.3 (5.3-7.4)	6.5 (2.9-9.6)	17.6 (17.1-24.2)

Tabell 3 viser medianverdier (spredning) for PV, AV og TOTOX-verdi for omega-3-produktene inndelt i ulike oljetyper (n = 47). To produkter inneholdt store mengder vegetabiliske oljer og hadde konsentrasjon av EPA og DHA til sammen lavere enn 10 % og lot seg ikke identifisere. Ett produkt var basert på muslingolje, og ett produkt tydet på å være kombinasjon av 18/12-olje og torskeleverolje (bekreftet ved varedeklarasjon). Disse er ekskludert. Tabellen viser at 18/12-oljer har høyeste medianverdier for nivå av oksidasjon og størst spredning i oksidasjonsverdier.*Seks oppkonsentrerte fiskeoljer er ekskludert fordi de ikke kunne utelukkes å være i kombinasjon med ikke-oppkonsentrerte fiskeoljer. Produktene inneholdt store mengder vegetabiliske oljer. **Kun et produkt tydet på å være basert på lakseolje. Fordi produktet hadde lik oksidasjonsprofil som torskeleveroljene, er dette produktet slått sammen med torskeleveroljene til kategorien Nordeuropeiske fiskeoljer. *** Et produkt var kombinasjon av selolje og fiskeolje og er derfor ekskludert.

Tilbake til figur 2 ser vi at sju 18/12-oljer, ni oppkonsentrerte fiskeoljer, en nordeuropeisk fiskeolje og fem seloljer hadde høyere PV enn 10. Ingen haileveroljer hadde PV over grenseverdien i den europeiske farmakopø. En 18/12-olje hadde AV over høyeste grenseverdi angitt i den europeiske farmakopø. Dette var i tillegg det mest oksiderte omega-3-produktet i utvalget når det gjaldt PV. Tre 18/12-oljer, tre oppkonsentrerte fiskeoljer og en nordeuropeisk fiskeolje hadde TOTOX-verdi over 50.

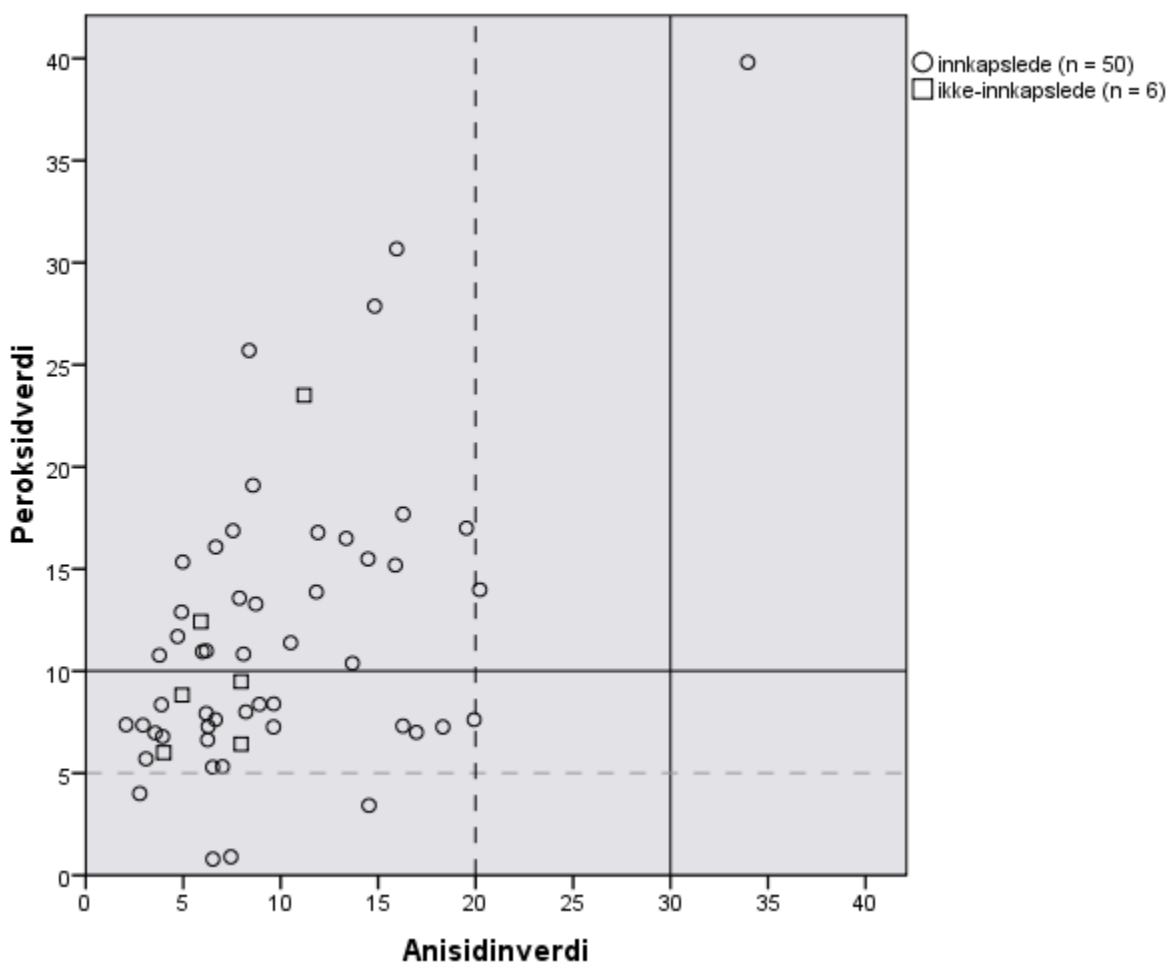
Sammenlignet med grenseverdier angitt av GOED hadde samtlige 18/12-oljer, oppkonsentrerte fiskeoljer og haileveroljer, i tillegg til fire nordeuropeiske fiskeoljer og 12 seloljer PV over GOEDs grenseverdi. Sju av åtte 18/12-oljer hadde AV innenfor grenseverdien angitt av GOED (Figur 2). Samtlige 18/12-oljer, 13 oppkonsentrerte fiskeoljer

og to nordeuropeiske fiskeoljer og fire seloljer hadde TOTOX-verdi over 26. Ingen haileveroljer hadde TOTOX-verdi over GOEDs grenseverdi.

3.3.6 Innkapslede og flytende omega-3-produkter

Det ble undersøkt om innkapslede omega-3-produkter (n = 50) hadde et oksidasjonsnivå ulikt flytende omega-3-produkter (n = 6), og deretter sammenlignet med grenseverdier i farmakopømonografier og monografi gitt av GOED. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom henholdsvis innkapslede omega-3-produkter og flytende omega-3-produkter for PV, 10.6 (0.8-39.8) versus 9.2 (6.0-23.5) (p = 0.8), AV, 8.2 (2.1-34.0) versus 6.9 (4.0-11.2) (p = 0.3), eller TOTOX-verdi, 30.2 (8.1-113.6) versus 24.8 (16.4-58.2) (p = 0.508).

Tjueseks innkapslede og to flytende omega-3-produkter hadde PV over høyeste angitte grenseverdi i den europeiske farmakopø. Ett innkapslet omega-3-produkt var over høyeste angitte grenseverdi for AV (Figur 3), og seks innkapslede og ett flytende omega-3-produkt var over beregnet TOTOX-grenseverdi. Alle de flytende (n = 6) og 46 av 50 innkapslede omega-3-produktene hadde PV over GOEDs grenseverdi. For PV skilte en flytende olje seg fra de øvrige flytende omega-3-produktene ved at den var innenfor GOEDs grenseverdi. De resterende flytende omega-3-produktene hadde PV mellom 6 og 12. To innkapslede omega-3-produkter hadde AV høyere enn 20, som er GOEDs krav, men ingen av de flytende. Samtlige omega-3-produkter som hadde AV over 12 var innkapslede (n = 15) (Figur 3). Tretti innkapslede og tre flytende omega-3-produkter hadde TOTOX-verdi over 26.



Figur 3 viser PV og AV i hver av omega-3-produktene (n = 56), inndelt i innkapslede og flytende omega-3-produkter, i forhold til grenseverdi angitt i europeiske farmakopømonografier som heltrukne linjer (PV 10 og AV 30). Forholdet til grenseverdi angitt i monografi gitt av GOED (PV 5 og AV 20) er vist som stiplede linjer i diagrammet. Et innkapslet omega-3-produkt hadde PV og AV over grenseverdier i farmakopø. To flytende omega-3-produkter hadde PV over grenseverdien for PV i farmakopø. Fire innkapslede omega-3-produkter hadde PV og AV innenfor grenseverdiene gitt av GOED.

3.3.7 Stressing av oljer gjennom kapsulering og lagring

Fiskeoljer ble sendt til England for kapsulering i bovint gelatin. Før forsendelse ble oljen målt, samt at en prøve ble frosset ned ved minus 80 grader for analyse parallelt med måling i oljen etter kapsulering. Oljen hadde ved forsendelse en PV på 0.5 og AV på 1.8. Etter forsendelse, kapsulering og forsendelse tilbake til Norge (3 uker) hadde oljen en PV på 3.8 og en AV på 2. En kunne se en viss økning i peroksidverdien som følge av kapsulering. Ytterligere lagring av kapslene i boks, mørkt, ved romtemperatur i 6 måneder førte til en økning av PV til 4 og en økning av AV til 4. Det var ingen signifikante forskjeller i fettsyresammensetningen gjennom forsøket.

3.3.8 Innhold av EPA og DHA i anbefalte dagsdoser

Anbefalingen på daglig inntak av omega-3-helsekostprodukter kan variere fra produkt til produkt. Det ble derfor undersøkt hvordan anbefalingene på de ulike produktene varierte.

Innholdet av EPA og DHA i de anbefalte dagsdosene for voksne ble beregnet ved bruk av GC-analyser, varedeklarasjoner og beregnet oljeinnhold. Åtte av produktene var kun beregnet til barn og hadde derfor ingen anbefaling for voksne, fire var uten forpakning, og for ytterligere fire var det ikke mulig å ut fra deklarasjon eller veiing å kalkulere oljeinnholdet. I dette utvalget (n = 97) var median innhold per anbefalte dagsdose til voksen 330 (19-1373), 248 (9-1075) og 575 (28-2209) mg for henholdsvis EPA, DHA og sum EPA og DHA.

Norske myndigheters anbefaling av fem ml tran per dag tilsvarer, avhengig av sesong og batch, om lag ett gram EPA og DHA sammenlagt. Vi ønsket å undersøke om dagsdoseanbefalingene på hvert enkelt produkt i dette utvalget gav en mengde av disse fettsyrene som dekket denne anbefalingen. Av totalt 97 produkter inneholdt 78 % (n = 76) mindre enn ett gram EPA og DHA. For opprettholdelse av god hjerte- og karhelse anbefaler ISSFAL (The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 2004) et inntak av sum EPA og DHA på minimum 500 mg daglig. I dette utvalget inneholdt 41 % (n = 40) mindre enn 500 mg av fettsyrene EPA og DHA sammenlagt.

3.3.9 Pris per dagsdose og innhold av EPA og DHA

Pris er oppgitt for 105 av omega-3-produktene. I tillegg var som nevnt åtte produkter beregnet kun til barn. Median pris per anbefalte dagsdose til voksne i dette utvalget (n = 97) var kroner 4.40 (0.70-17.20). Det ble undersøkt om innhold av sum EPA og DHA per dagsdose til voksen korrelerte med pris per dagsdose. Det var ingen sammenheng mellom pris og innhold av EPA og DHA per dagsdose til voksne ($r = -0.109$, $p = 0.297$) (n = 93).

Det er stor variasjon i pris per dagsdose for omega-3-produktene i dette utvalget. Det var derfor av interesse å undersøke om pris per dagsdose til voksne, og oksidasjonsverdi korrelerte i dette utvalget av omega-3-produkter (n = 49). Tre av omega-3-produktene i det reduserte utvalget var produkter rettet mot barn, og hadde derfor ingen anbefaling for voksne, i tillegg manglet pris for tre produkter. Disse omega-3-produktene er derfor ikke med i analysen. Det var ingen statistisk signifikant korrelasjon mellom pris per dagsdose for voksne og PV ($r = -0.201$, $p = 0.167$), eller AV ($r = -0.239$, $p = 0.099$). Derimot var det en svak negativ korrelasjon mellom pris per dagsdose og TOTOX-verdi ($r = -0.304$, $p = 0.034$).

3.4 Diskusjon, delprosjekt 1

3.4.1 Utvalg

Utvalget i denne studien er basert på kosttilskudd som inneholder marint omega-3 i salg i forretninger i Oslo og Akershus i perioden august til november 2009. Innkjøp av omega-3-produkter var en stor utfordring. Ingen instans fører tilsyn med tilgjengelige omega-3-produkter på markedet, verken når det gjelder antall eller mest solgte, og samtidig foregår det en kontinuerlig utskiftning av produkter. Produktene i denne studien er handlet inn i et begrenset geografisk område, og det kan derfor være en mulighet for at andre produkter var i salg i andre deler av landet i samme periode.

En annen begrensning ved utvalget i denne studien er at antall produkter ble kraftig redusert som følge av analytiske utfordringer knyttet til de begrensinger PV- og AV-metoden har når det gjelder tilsetninger i omega-3-produkter. Vi kan ikke utelukke at enkelte analyser av innhold av oksidasjonsprodukter for ekskluderte omega-3-produkter likevel kan være korrekte, men hvilke dette eventuelt kan være er uvisst. I teorien kan de ekskluderte omega-3-produktene ha et høyere nivå av oksidasjonsprodukter fordi flere av disse produktene inneholder prooksidanter som spormetallioner, mineraler og kromoforer. En rekke produkter inneholder aroma som kan kamuflere en eventuell harsk smak. På den annen side inneholder flere av de ekskluderte omega-3-produktene andre komponenter som kan fungere som antioksidanter, slik som bær- og urteekstrakter. Dette kan ved riktig bruk hemme oksidasjonsprosessen i produktene, men også akselerere den ved feil bruk (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Innkjøp ble gjort parallelt med oppstart av analyser for at vi i størst mulig grad skulle kunne innhente så mange omega-3-produkter som mulig. Sett i sammenheng med oversikten vi utarbeidet over tilgjengelige omega-3-produkter på markedet kan man anta at en stor andel av de marine omega-3-produktene som var på markedet i den gjeldende perioden er inkludert i studien. I studien er kun et lite utvalg av omega-3-produkter som selges via internett inkludert (n = 16). I 2006 ble sju prosent av kosttilskuddene som brukes i Norge kjøpt via internett og postordre (Bransjerådet for Naturmidler, 2010). Internettkjøpte produkter ble på bakgrunn av dette inkludert i studien som en del av markedet i Norge. Vi inkluderte produkter som betaler for plassering i søkeverktøyet *Google*. Det kan tenkes at kjøp av omega-3-produkter på internett i stor grad også gjøres via ulike temasider som *sport og trening* eller *helse*, slik at produktene handlet via internett ikke er representative for dette segmentet. Analyser viste at de internettkjøpte omega-3-produktene ikke skiller seg fra de butikkjøpte omega-3-produktene (resultater ikke vist).

Det er vanskelig å skulle konkludere med at utvalget av omega-3-produkter som viser nivå av oksidasjonsprodukter er representativt for alle omega-3-produkter som er tilgjengelig for forbruker. Flere studier vil derfor være nødvendig for å kunne generalisere til alle omega-3-produkter tilgjengelig for forbrukere i Norge.

3.4.2 Resultater av nivå av oksidasjonsprodukter

Denne studien viser at det er stor variasjon i målt PV og AV og beregnet TOTOX-verdi i omega-3-produkter. Halvparten av omega-3-produktene var over europeisk farmakopømonografiers grenseverdi, og nesten alle var over GOEDs monografi for PV, med unntak av fire produkter. De fleste omega-3-produktene var innenfor maksimumsverdiene for AV, både når vi sammenlignet med den europeiske farmakopø og monografi angitt av GOED. Det er derfor PV som bidrar mest til at over halvparten av produktene hadde TOTOX-verdi over GOEDs grenseverdi i dette materialet.

Det faktisk høye innhold av Peroksider som gjør at oljene ikke tilfredsstillende GOEDs grenseverdi kan skyldes at det foregår en oksidasjon i kapslene. Det at en ikke greier å stabilisere økningen i peroksid kan blant annet skyldes at oljene ikke er tilstrekkelig stabilisert med antioksidanter.

Under raffineringen reduseres eller fjernes innholdet av hydroperoksider, men derimot ikke det totale innholdet av ikke-flyktige sekundære oksidasjonsprodukter som core-aldehyder (Allen & Hamilton, 1994). Innholdet av sekundære oksidasjonsprodukter, målt ved AV, for de fleste omega-3-produktene i dette utvalget var innenfor grenseverdiene til farmakopøene. Påbegynt oksidasjonsprosess har med andre ord ikke nådd så langt at nivået av sekundære oksidasjonsprodukter har begynt å øke betraktelig. Det ser i tillegg heller ikke ut til at fettsyresammensetningen i en olje påvirkes av oksidasjonsnivåer i normalområdet for PV (Fritshe & Johnston, 1988) da oljene generelt holdt den mengde omega-3 som stod deklart.

Det foreligger begrenset dokumentasjon på nivå av oksidasjonsprodukter i ulike omega-3-produkter. I en dansk undersøkelse av 14 omega-3-produkter utført i 1988 varierte PV fra null til 7.5, og ingen produkter hadde PV over 10, slik som i farmakopømonografiene, men fem produkter hadde PV over 5 (jmfør GOED) (Vinter, 1995). Dette er lavere nivå enn i vår studie, hvor 75 % av produktene hadde PV over 7.3. I den danske undersøkelsen varierte derimot AV mellom 3.6 og 51.8. Tre produkter hadde AV over 30, slik som i farmakopømonografiene, og ytterligere ett hadde AV over GOEDs grenseverdi. Når TOTOX-verdi ble beregnet hadde to produkter verdi over 50, og ytterligere tre hadde verdi over 26, tilsvarende kravet i GOEDs monografi. Variasjon i TOTOX-verdi i den danske undersøkelsen var mellom 9.8 og 61 (Vinter, 1995). Sammenlignet med vår studie viser den danske undersøkelsen lavere PV og generelt noe høyere AV på enkelte produkter.

I en belgisk studie publisert i 2007 hadde fire av 16 fiskeoljeprodukter PV over farmakopøens maksimumsgrense på 10, og ytterligere ett produkt hadde PV over GOEDs grense på 5. Ingen produkter hadde AV over 30, slik som grenseverdien i farmakopømonografiene, men to produkter hadde AV over 20, som er kravet satt av GOED. Spredningen i oksidasjonsverdier var for PV mellom null (n = 3) og 17.2 og for AV mellom 2 og 27. PV i den belgiske studien er lavere enn i vår studie, mens AV derimot var i samsvar med funnene presentert i denne studien. Undersøkelsen er gjort på et lite utvalg, og inkluderer verdier for fem produkter tilsatt komponenter som kan påvirke analysene. Metodene i denne undersøkelsen er de samme som benyttet i vår studie for AV, men ikke direkte for PV (Fierens & Corthout, 2007). Sammenlignet med de to nevnte undersøkelsene, som ble gjort på små utvalg, viste disse studiene lavere PV, og tilsvarende eller noe høyere AV enn vår studie. I denne studien hadde to produkter PV under 1 og et annet produkt hadde AV 2.1, som omtrent tilsvarer nivå av oksidasjonsprodukter i oljer som tilsettes til matvarer. Ingen produkter hadde TOTOX-verdi tilsvarende den man finner i "functional food"-oljer. Denne studien viser at omega-3-produkter som selges som kosttilskudd har et oksidasjonsnivå som generelt er høyere enn oksidasjonsnivået i omega-3-oljer som benyttes til functional food.

3.4.3 Bruk av monografier

Kravene i de europeiske farmakopømonografiene gjelder ikke omega-3-produkter, men for ferdigraffinerte oljer. Dette er eneste eksisterende kvalitetskrav for oksidasjon. GOEDs monografi er frivillig å etterfølge, men kun samtidig en monografi som fiskeoljeprodusenter selv har vært med på å utarbeide. Denne er også ment å gjelde for omega-3-produkter i kommersielt salg. Farmakopømonografiene og grenseverdier i GOEDs monografi, gjengitt i denne studien, gjelder for fiskeoljer. Vi har likevel valgt å inkludere produkter basert på

selolje sammen med fiskeoljer, fordi det ikke eksisterer en egen monografi for disse oljene, og fordi enkelte nasjoner anbefaler produsenter av seloljer å benytte GOEDs monografi (Health Canada, 2009). Vi har også valgt å sammenligne torskeleroljer med GOEDs monografi fordi det ikke gis noen tydelig begrunnelse for hvorfor den ikke gjelder disse oljene. Produktene som inneholder muslingolje og haileverolje er også sammenlignet med monografiene for fiskeoljer da det heller ikke eksisterer egne monografier for disse oljene.

Vi kan anta at grenseverdiene hentet fra den europeiske farmakopø vil gjelde for mange av fiskeoljene som er benyttet i produktene i vårt utvalg fordi flere produkter antas å være basert på 18/12-oljer eller torskeleroljer. I oppkonsentrerte produkter kan fettsyreformen være ulik. Det er ikke undersøkt hvorvidt fettsyrene i de oppkonsentrerte produktene i denne studien er i form av frie fettsyrer, triglyserider eller etylestere. GOEDs monografi er ikke ment å gjelde for oppkonsentrerte fiskeoljer i form av frie fettsyrer, men fordi ingen av de oppkonsentrerte produktene oppgir at fettsyrene er i denne formen, kunne vi ikke kontrollere for dette. Det kan være at enkelte av de oppkonsentrerte fiskeoljene ikke skulle vært sammenlignet med de benyttede monografiene. Fettsyrene i enkelte av de oppkonsentrerte produktene i denne studien kan være i etylesterform, som har egen farmakopømonografi, hvor grenseverdien for AV er 20 (tilsvarende GOEDs krav). Grenseverdien for PV er derimot tilsvarende verdien gjengitt fra farmakopømonografiene i denne studien. Vår studie viste likevel at samtlige av de oppkonsentrerte fiskeoljene ligger innenfor GOEDs grenseverdi for AV. Det er også mulig at enkelte av produktene, hvor type fiskeolje ikke er identifisert, også skulle vært sammenlignet med en annen monografi. Likevel er torskeleroljer, 18/12-oljer og oppkonsentrerte fiskeoljer de mest brukte fiskeoljene i omega-3-produkter. Det foreligger ingen krav for tillatt maksimumsinnhold av oksidasjonsprodukter i omega-3-produkter i kommersielt salg, og man vet lite om helseeffekter av oksiderte fettsyrer og oksidasjonsprodukter av disse.

3.4.4 Oksidasjonsnivå og oljetyper

En ferdig raffinert olje tilsettes antioksidanter for å beskyttes mot oksidasjon. Eventuelle forskjeller mellom ulike typer marine oljer når det gjelder oksidasjon vil derfor ofte, direkte eller indirekte, kunne forklares med oljens forhistorie, ikke optimal antioksidanttilsetning, samt dens konsentrasjon av de flerumettede fettsyrene EPA og DHA.

I denne studien har kun ett produkt basert på 18/12-olje både PV og AV innenfor grenseverdier i den europeiske farmakopø. Ingen produkter basert på 18/12-olje tilfredsstiller kravene fra GOED når det gjelder PV, og er eneste gruppe hvor ingen produkter er innenfor GOEDs grenseverdi for TOTOX. Produktene basert på 18/12-oljer har generelt høyere oksidasjonsverdier enn produktene basert på oljer av annen marin opprinnelse. I tillegg er laveste nivå av oksidasjonsprodukter for 18/12-oljer høyere enn for de øvrige gruppene. Produktet som hadde AV over grenseverdiene i både farmakopømonografiene og GOEDs monografi tilhørte også denne gruppen. En mulig forklaring på det høye nivået av oksidasjonsprodukter i 18/12-oljene kan være at råoljene har/kan ha lengre transportvei til raffineri, fordi få, om ingen, fiskeoljeraffinerier er lokalisert i Sør-Amerika eller Nord-Afrika (Hjaltason & Haraldsson, 2007). Råoljer er som nevnt meget utsatt for oksidasjon på grunn av potensielt lavt nivå av naturlige antioksidanter, manglende tilsatte antioksidanter og flere prooksidant-komponenter (Allen, 1995). I tillegg kan tiden fra fangst til prosessering av olje

og mel spille en rolle når det gjelder kvaliteten på sluttproduktet. EU's hygieneforordning sier at fisk som skal gå til produksjon av mat ikke skal ha lengre oppholdstid enn 36 timer uten nødvendig kjøling, før prosessering. Hva denne oppholdstiden har å si kan være noe usikkert, men enzymaktivitet i fisken før prosessering vil gi antas å gi økt innhold av frie fettsyrer med påfølgende initiering av oksidasjon

Samtlige omega-3-produkter basert på haileveroljer og alle nordeuropeiske fiskeoljer med unntak av ett, er innenfor grenseverdiene i farmakopøen for PV og AV. Seloljer har gjennomgående lav AV, men med spredning av PV både over og under farmakopøens grenseverdi. PV for seloljer er likevel generelt lavere enn for 18/12-oljer. Variasjonen i PV hos seloljene kan skyldes ulik behandling av det opprinnelige råstoffet, ulik ferskhetsgrad og behandling av den raffinerte oljen eller ulik antioksidantbruk. Variasjonen kan også forklares med et høyere antall produkter i denne gruppen enn i gruppene for nordeuropeiske fiskeoljer, 18/12-oljer og haileveroljer.

I utgangspunktet ville en anta at tran som produseres av fersk lever skulle ha meget gode oksidasjonsverdier. Torskelever, som utgjorde råstoffet i fire av fem produkter i gruppen basert på nordeuropeiske fiskeoljer er, i motsetning til 18/12-oljer, ikke et biprodukt av annen produksjon. På bakgrunn av dette ville man tro at disse oljene bedre ville ivareta kvaliteten under prosessering og frem til forbruker, fordi oljen er det primære utvinningsproduktet, i motsetning til 18/12-oljer (Nichols, 2007; Bimbo, 2007). Det var derfor overraskende at oljer utvunnet fra torskelever ikke kom bedre ut i studiet med hensyn på oksidasjon. Erfaringsmessig fra produksjon av functional food oljer vet man at råvarekvaliteten på torskelever har mye å si for sluttkvaliteten med hensyn på oksidasjon og påfølgende usmak på oljen. Rålever til disse produktene er ofte derfor av høyere kvalitet og er ferskere enn det man ellers benytter til standard tran. Innhold av mulige prooksidanter og lang lagring før prosessering kan derfor være mulig årsak til kvaliteten.

PV i oppkonsentrerte fiskeoljer har i denne studien stor spredning. De fleste oppkonsentrerte fiskeoljene har PV tilsvarende de nordeuropeiske fiskeoljene og seloljene, mens de resterende oppkonsentrerte fiskeoljene har noe høyere PV. Med unntak av uteliggeren for AV i gruppen av 18/12-oljer, har oppkonsentrerte fiskeoljer størst spredning i AV. Større spredning i oksidasjonsnivå kan skyldes at antallet produkter i gruppen av oppkonsentrerte fiskeoljer er høyere enn antallet i de øvrige gruppene i inndelingen av oljetyper. I tillegg vil ulik ferskhetsgrad og behandling av råoljen og den raffinerte oljen, samt ulik antioksidantbruk kunne forklare variasjon i oksidasjonsnivå i denne gruppen av produkter. Rense- og oppkonsentreringsprosessen kan mest sannsynlig forklare at flere av de oppkonsentrerte oljene har lavere nivå av oksidasjonsprodukter enn 18/12-oljer, til tross for høyere konsentrasjon av EPA og DHA. Under oppkonsentrering kan prooksidanter bli redusert i større grad enn under raffinering, og core-aldehyder kan fjernes. En mulig forklaring på den store spredningen i observert oksidasjonsnivå i gruppen av oppkonsentrerte fiskeoljer i denne studien kan derfor også skyldes variasjon i oppkonsentreringsteknikk (Breivik, 2007).

3.4.5 Oksidasjonsnivå og konsentrasjon av EPA og DHA

I kjøp og salg av marine omega-3-oljer oppgis blant annet konsentrasjonen av EPA og DHA. Disse verdiene settes normalt lavere enn faktisk innhold. Konsentrasjonen av omega-3, som

videre deklarerer på produktet, vil være basert på disse tallene. En olje vil dermed, mest sannsynlig, ha høyere konsentrasjon av EPA og DHA enn det som er deklart. Det er derfor som forventet at våre analyser viser høyere konsentrasjon av EPA og DHA enn det som står deklart på produktene.

Vi finner en svak korrelasjon mellom konsentrasjonen av EPA og DHA i omega-3-produktene i dette utvalget og PV, og en middels sterk korrelasjon mellom fettsyrene og AV og TOTOX. Korrelasjonen mellom konsentrasjonen av EPA og DHA og PV vil aldri kunne bli veldig sterk, fordi hydroperoksidene etter hvert brytes ned og omdannes til sekundære oksidasjonsprodukter (Allen & Hamilton, 1994; Min, 1998). En nyraffinert olje vil på den annen side kunne ha lav PV, uavhengig av marin opprinnelse og oljens forhistorie. Dette kan trolig, til dels også være en del av forklaringen for at korrelasjonen mellom PV og konsentrasjon av EPA og DHA er svak, spesielt fordi produktene i denne studien hadde relativt lave verdier for AV. AV vil i større grad fortsette å øke under oksidasjonsprosessen, som igjen fører til økt TOTOX-verdi. Sterkere korrelasjon med AV kan i tillegg indikere at oljer med høy konsentrasjon av EPA og DHA er basert på noe mer oksidert råstoff og/eller råolje.

Produktene med haileverolje, selolje og nordeuropeisk fiskeolje har relativt like oksidasjonsverdier. Dette kan trolig forklares med at nordeuropeiske fiskeoljer, seloljer og haileveroljer har lavere konsentrasjoner av EPA og DHA enn 18/12-oljer og oppkonsentrerte fiskeoljer. Haileveroljene har lav PV og AV, og alle produktene er innenfor kravene i den europeiske farmakopø. Samtidig har haileveroljene i denne studien laveste målte konsentrasjoner av EPA og DHA. Produktene basert på haileveroljer utgjøres riktignok av kun tre produkter, slik at våre funn av oksidasjonsnivå i denne gruppen må tolkes med varsomhet.

3.4.6 Oksidasjonsnivå i innkapslede versus flytende oljer

Det kan spekuleres i om det under produksjon av omega-3-produkter kan benyttes en olje som er mindre oksidert i flytende omega-3-produkter sammenlignet med innkapslede, fordi harsk smak lettere vil oppdages ved inntak av flytende olje. Samtidig vil innkapslede produkter kunne kamuflere en eventuell uønsket smak på en oksidert olje. Det er ikke kjent om innkapslingsmaterialet i kapsler kan påvirke oksidasjonsprosessen i oljer, men det har blitt spekulert i om gelatin kan reagere med oljen og føre til økte oksidasjonsverdier (Breivik, 2007). Denne studien kan ikke bekrefte dette. To av seks flytende oljer var over grenseverdien angitt i den europeiske farmakopø for PV. Medianverdi for PV er omtrent tilsvarende grenseverdien i farmakopøen for både innkapslede og flytende produkter. Samtlige produkter, med unntak av en innkapslet olje var innenfor farmakopøens grenseverdi for AV.

Vi fant ingen statistisk signifikant forskjell mellom innkapslede og flytende produkter for oksidasjon. I de fleste flytende oljene i denne studien var det tilsatt aroma. Dette medførte at få produkter av denne typen kunne inkluderes. En begrensning i denne analysen er at det er få produkter i gruppen av flytende oljer (n = 6). Resultatene er derfor beheftet med høy grad av usikkerhet. Man må derfor være varsom med å trekke konklusjoner av disse funnene.

3.4.7 Stressing av oljer gjennom kapsulering og lagring

Forsøket i punkt 2.3.7 gjeldende stressing av oljer gjennom kapsulering viste at det skjer en viss oksidasjon av oljen gjennom logistikk og kapsulering. Vi observerte en økning av peroksidtall gjennom kapsuleringen mens anisidintallet hadde en marginal økning. Kapslene holdt seg også godt med hensyn på oksidasjon gjennom seks måneders lagring. I dette forsøket ble det brukt en olje som kvalifiserte som "functional food"-olje. Hvordan resultatet for en olje med et høyere peroksidtall ville blitt vites ikke, men en kan gå ut fra at en olje som i utgangspunktet er oksidert vil få en ytterligere akselerasjon gjennom en kapsulering. Man vet lite om hva som skjer i perioden fra oljen selges fra raffineriet til den når frem til konsumenten. Det er raskt gjort å ødelegge en olje som i utgangspunktet har ypperste kvalitet, med uriktig behandling. Det er en potensiell fare for at ukyndige salgskanaler kan behandle oljen feil, med påfølgende dårlig kvalitet på sluttproduktet. På grunn av uvitenhet er det da enkelt å skylde på at det har vært noe feil på råvarene levert fra raffineriet.

3.4.8 Metodediskusjon

Måling av PV ved titrering (AOCS, 1990b) og AV ved spektrofotometri (AOCS, 1990a) er veletablerte metoder for bestemmelse av oksidasjon i oljer. Det er disse metodene som benyttes som produksjonskrav og til å sertifisere marine omega-3-oljer (European Pharmacopoeia, 2009; RUBIN, 2009a). Til tross for at PV er en mye anvendt metode når det gjelder bestemmelse av innhold av primære oksidasjonsprodukter i omega-3-oljer kan man i litteraturen finne at PV i mindre grad bør benyttes i vurdering av kvaliteten til oljer med høy grad av umettethet, slik som fiskeoljer. Dette er sannsynligvis fordi hydroperoksidene som dannes i seg selv er umettede og derfor ustabile, noe som fører til at de både dannes og nedbrytes raskt til sekundære oksidasjonsprodukter. Mengden hydroperoksider vil derfor være lavt sammenlignet med vegetabiliske oljer og animalsk fett, selv etter utstrakt oksidasjon (Allen & Hamilton, 1994). Allikevel er denne metoden godt etablert i produksjon og handel av fiskeoljer, og ble derfor også benyttet i denne studien.

Denne studien viser at PV- og AV-analyser basert på AOCS' metoder har store svakheter, spesielt når det gjelder å analysere omega-3-oljer tilsatt ulike komponenter. Dette gjelder også *PeroxySafe™ STD Kit* for måling av PV. Det er likevel ikke funnet publiserte vitenskapelige artikler vedrørende interferenser av komponenter i omega-3-oljer for måling av PV og AV. Det ser ikke ut til at metodene er pålitelige når produktet inneholder krillolje. Det kan være at astaxanthin, eller andre forbindelser i krilloljen innvirker på analysemetodene. Vann, eller eventuelle andre komponenter i produktene i emulsjonsform interfererer trolig med analysen. Ekstraksjon av fett fra produkter som var i emulsjonsform kunne blitt utført, men usikkerhet knyttet til oksidasjon under ekstrahering gjorde at vi anså feilkildene for dette som for store (Olsen, 2005). Tilsatt aroma, fargestoff og Q10, eller dersom omega-3-produktet er i tablettform ser også ut til å påvirke analysemetodene. Prøveløsninger til de spektrofotometriske analysene av PV og AV gav for enkelte av de ekskluderte omega-3-produktene heterogene løsninger med bunnfall.

Analysering av PV ble utført med to ulike metoder. Måling av PV ved titrering er som nevnt standard referansemetode gitt av AOCS (AOCS, 1990b). *PeroxySafe™ STD Kit* ble validert mot AOCS referansemetode *Cd 8-53*. Enhver variasjon i fremgangsmåten i måling av PV vil kunne påvirke resultatene av den offisielle metoden gitt av AOCS. Resultater av måling av

PV kan også påvirkes av strukturen og reaktiviteten av peroksidene, samt reaksjonstemperatur og tid benyttet til å gjennomføre metoden (Allen & Hamilton, 1994; Frankel, 2005; Shahidi & Wanasundara, 1998). Fordi det kan være vanskelig å bestemme når endepunktet for titreringen er, vil måling i oljer med lave verdier kunne gi feilaktige resultater (Allen & Hamilton, 1994; Shahidi & Wanasundara, 1998b). På hvilket tidspunkt endepunktet av titreringen angis å være, vil også kunne være en systematisk feil ved bruk av metoden fordi dette endepunktet til dels er en subjektiv vurdering. Det ble derfor valgt å primært benytte *PeroxySafe™ STD Kit*. Likevel er det vanskelig å anslå potensielle feilkilder for metoden, da vi ikke kjenner det fullstendige innholdet i kjemikaliene som inngår i kittet. Kittet er ikke godkjent av AOCS, men det har tidligere blitt vist god korrelasjon mellom AOCS *Official Method Cd 8-53* og *PeroxySafe™ STD Kit* målt i vegetabiliske oljer med ulik PV (Yildiz, Wheling & Cuppett, 2003). For å kontrollere for om våre resultater av PV utført ved titreringsmetoden og AV målt spektrofotometrisk ga valide verdier ble to oljer med kjent oksidasjonsgrad analysert som referanser. Vi validerte i tillegg *PeroxySafe™ STD Kit*, som beskrevet tidligere, og fant en god korrelasjon, etter å ha korrigert for det systematiske avviket fra den offisielle metoden. Vi fant at *PeroxySafe™ STD Kit* har samme begrensninger som AOCS *Official Method Cd 8-53* når det gjelder tilsetninger i omega-3-produktene.

Det er hevdet at AV primært måler aldehyder, spesielt 2,4-dienaler og 2-alkenaler (AOCS, 1990a; Allen & Hamilton, 1994). Etersom maksimumet for absorbans går mot en lengre bølgelengde med økende umettethet, og fordi fargeintensiteten er høyere for 2,4 dienaler enn for 2-alkenaler, vil absorbansemaksimumet og absorbanseintensiteten kunne variere mellom ulike oljer. Det kan derfor være at vår sammenligning av oljer av ulik marin opprinnelse kan være beheftet med potensielle feil. Imidlertid utvider Frankel (Frankel, 2005) begrepet til å gjelde karbonyler, fordi det ikke vitenskapelig har blitt bevist hvilke forbindelser AV spesifikt måler. I en lagringsstudie av torskeleveroljer som benyttet ulike målemetoder for å detektere oksidasjon, forble AV uendret gjennom hele forsøket. Det ble derfor hevdet at den AV man fant primært ble utgjort av core-aldehyder (Olsen, Vogt, Saarem, Greibrokk & Nilsson, 2005).

3.5 Konklusjon, delprosjekt 1

De benyttede analysemetodene for måling av anisidintall og peroksidtall har begrensninger når det gjelder tilsetningsstoffer i omega-3-produktene, og 57 omega-3-produkter måtte ekskluderes fra analysene av PV og AV på grunn av dette. Resultatene viser at cirka halvparten av omega-3-produktene hadde verdier over grenseverdien for PV i den europeiske farmkopø og at 52 av 56 omega-3-produkter hadde PV over GOEDs grenseverdi. Ett produkt hadde AV over farmakopøgrenseverdien og to produkter hadde AV over GOEDs monografi. Sju av åtte søramerikanske/nordafrikanske fiskeoljer, halvparten av seloljene og de oppkonsentrerte fiskeoljene hadde PV over farmakopøens grenseverdi, mens cirka halvparten av de oppkonsentrerte fiskeoljene og seloljene, samtlig haileveroljer og fire av fem nordeuropeiske fiskeoljer var innenfor farmakopøens grenseverdi. Oksidasjonsnivå korrelerte med konsentrasjon av EPA og DHA. Det var ingen forskjell i oksidasjonsnivå mellom innkapslede og flytende omega-3-produkter. Forskjeller mellom ulike marine oljer i oksidasjonsnivå kan hovedsaklig, direkte eller indirekte, kunne forklares med

oljens forhistorie, ikke optimal antioksidanttilsetning, samt dens konsentrasjon av de flerumettede fettsyrene EPA og DHA.

3.6 Referanser, delprosjekt 1

Alasalvar, C. (Red.) & Taylor, T. (Red.) (2002). *Seafoods – Quality, Technology and Nutraceutical Applications*. Berlin: Springer.

Allen, D.A. (1995). Fish oil compositions. I: Hamilton, R.J. (Red.) & Rice, R.D. (Red.), *FISH OIL. Technology, Nutrition and Marketing* (s. 95-108). Hull: Society of Chemical Industry. Oils & Fats Group.

Allen, J.C. & Hamilton, R.J. (1994). *Rancidity in Foods* (3. utg). London: Chapman & Hall.

American Oil Chemists' Society [AOCS]. (1990a). *Official Methods and Recommended Practises of the American Oil Chemists' Society. SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS & OILS*. AOCS Official Method Cd 18-90. Champaign, IL: AOCS Press.

AOCS. (1990b). *Official Methods and Recommended Practises of the American Oil Chemists' Society. SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS & OILS*. AOCS Official Method Cd 8-53. Champaign, IL: AOCS Press.

Bimbo, A.P. (2007). Processing of marine oils. I: Breivik, H. (Red.), *Long-Chain Omega-3 Speciality Oils* (s. 77-110). Bridgewater: The Oily Press.

Bransjerådet for Naturmidler (2010). *Markedsdata*. Oslo: Bransjerådet for Naturmidler. Lest 17.februar 2010, http://www.brn.no/wsp/brn/webon.cgi?session=Lyht_v7JjZEPalQhAa7_Xc_hVE_SU5jZY&func=index

Breivik, H. (2007). Concentrates. I: Breivik, H. (Red.), *Long-Chain Omega-3 Speciality Oils* (s. 111-140). Bridgewater: The Oily Press.

Bunea, R., Farrah, K.E. & Deutsch, L. (2004). Evaluation of the Effects of Neptune Krill Oil on the Clinical Course of Hyperlipidemia. *Alternative Medicine Review*, 9 (4), 420- 428.

Burr, M.L., Gilbert, J.F., Holliday, R.M., Elwood, P.C., Fehily, A.M., Rogers, S. et al. (1989). Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarctions: Diet and Reinfarction Trial (DART). *The Lancet*, 334(8666), 757-761.

Chan, K.Y., Gao, Q.F., Yip, W.H., Wong, W.H., Shin, P.K.S. & Cheung, S.G. (2007). Lipid content and fatty acid composition in the green-lipped mussel *Perna Viridis* (L.). *Journal of Food Lipids*, 11(2), 123-130.

Commision Regulation (EC) No 1020/2008. (2008). *amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin and Regulation (EC) No*

2076/2005 as regards identification marking, raw milk and dairy products, eggs and egg products and certain fishery products

Council for Responsible Nutrition. (2002). *CRN PROPOSED MONOGRAPH ON OMEGA-3 EPA AND DHA: EXPLANATORY NOTES FROM SAM ZELLER, CHAIRMAN OF THE TECHNICAL COMMITTEE*. March 2002. Washington D.C.: Council for Responsible Nutrition.

Council for Responsible Nutrition (2006). *VOLUNTARY MONOGRAPH. Omega-3 DHA Omega-3 EPA Omega-3 DHA & EPA*. Washington D.C.: Council for Responsible Nutrition.

Council of Europe. (2008). *European Pharmacopoeia 6th Edition. Supplement 6.3*. Strasbourg: Council of Europe.

Daviglus, M.L., Stamler, J., Orencia, A.J., Dyer, A.R., Liu, K., Greenland, P. et al. (1997). Fish Consumption and the 30-year Risk of Fatal Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine*, 336(15), 1046-1053.

Fierens, C. & Corhout, J. (2007). Omega-3 fatty acid preparations – a comparative study. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 62(4), 115-119.

Forskrift om fiskemel, fiskeolje m.v. (1999). FOR-1999-03-26-416. Fiskeri- og kystdepartementet.

Frankel, E.N. (2005). *Lipid Oxidation*. 2nd edition. Bridgewater; The Oily Press

Fritsche, K.L. & Johnston, V. (1988). Rapid Autoxidation of Fish Oil in Diets without Added Antioxidants. *The Journal of Nutrition*, 118, 425-426.

Global Organization for EPA and DHA omega-3s. (2006). *GOED Voluntary Monograph (v. 3)*. Sted ikke oppgitt: Global Organization for EPA and DHA omega-3s. Lest 21. april 2010, <http://www.goedomega3.com/portals/0/public/GOEDMonograph.pdf>

Global Organization for EPA and DHA omega-3s. (2007). *About us*. Sted ikke oppgitt: Global Organization for EPA and DHA omega-3s. Lest 21. april 2010, <http://www.goedomega3.com/AboutUs/tabid/59/Default.aspx>

Health Canada. (2009). *SEAL OIL*. Ottawa: Health Canada

Hjaltason, B. & Haraldsson, G.G. (2007). Markets for fish oils and fish oil concentrates. I: Breivik, H. (Red.), *Long-Chain Omega-3 Speciality Oils* (s. 263-289). Bridgewater: The Oily Press.

International Fishmeal and Fish Oil Organisation. (2006). *Industry Overview*. Hertfordshire: International Fishmeal and Fish Oil Organisation. Lest 12. mai 2010, <http://www.iffonet.org/default.asp?fname=1&sWebldiomas=1&url=253>

- Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L-Å. (1996). The Chemistry and Antioxidant Properties, Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701.
- Kromhout, D., Bosschieter, E.B. & de Lezenne Coulander, C. (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 312(19), 1205-1209.
- Landmark, K., Aursnes, I., Reikvam, Å. & Alm, C.S. (2007). N-3-fettsyrer er fortsatt gunstig ved hjertesykdom. *Tidsskrift for Den norske legeförening*, 127(2), 202-203.
- Logan, A.C. (2003). Neurobehavioral Aspects of Omega-3 Fatty Acids: Possible Mechanisms and Therapeutic Value in Major Depression. *Alternative Medicine Review*, 8(4), 410-425.
- Mattilsynet (2010). *Om Mattilsynet*. Oslo: Mattilsynet. Lest 20. april 2010, http://www.mattilsynet.no/om_mattilsynet
- Min, D.B. (1998). Lipid Oxidation of Edible Oil. I: Akoh, C.C. (Red.) & Min, D.B. (Red). *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (s. 283-296). New York: Marcel Dekker Inc.
- MP Biomedicals. (1994). MicroChem™ II Analyzer. Operator's Manual.
- MP Biomedicals. (årstall ikke oppgitt). SafTest®, Inc. Instruction Manual.
- Murphy, M.G., Wright, V., Scott, J., Timmins, A. & Ackman, R.G. (1999). Dietary Menhaden, Seal, and Corn Oils Differentially Affect Lipid and *Ex vivo* Eicosanoid and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Generation in the Guinea Pig. *Lipids* 34, 115–124.
- Nichols, P.D. (2007). Fish oil sources. I: Breivik, H. (Red.), *Long-Chain Omega-3 Speciality Oils* (s. 23-42). Bridgewater: The Oily Press.
- Nordic Council of Ministers. (2004). *Nordic Nutrition Recommendations 2004. 4th edition. Integrating nutrition and physical activity*. København: Nordic Council of Ministers.
- Olsen, E. (2005). *Analysis of early lipid oxidation in foods with n-3 fatty acids. Doctor Scient Thesis*. Ås: Universitetet for miljø og biovitenskap.
- Olsen, E., Vogt, G., Saarem, K. & Nilsson, A. (2005). Autooxidation of Cod Liver Oil with Tocopherol and Ascorbyl Palmitate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(2), 97-103.
- Regulation ON TRADE IN SEAL PRODUCTS. (2009). REGULATION (EC) No 1007/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 16 SEPTEMBER 2009 ON TRADE IN SEAL PRODUCTS (TEXT WITH EEA RELEVANCE).

- RUBIN (2007). *Rapport nr 144. Råvarekilder for n-3 oljer. Potensialer, ernæring/helse, bærekraftighet og miljøstatus. Sammenligning norske og utenlandske kilder.* Trondheim: Stiftelsen RUBIN.
- RUBIN (2009). *Rapport nr. 173. N-3 oljer fra ferskt marint råstoff. En mulig konkurransestrategi for den norske n-3 industrien.* Trondheim: Stiftelsen RUBIN.
- Shahidi, F. & Wanasundara, U.N. (1998). Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. I: Akoh, C.C. (Red.) & Min, D.B. (Red). *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (s. 377-396). New York: Marcel Dekker Inc.
- Sosial- og helsedirektoratet (2005). *Norske anbefalinger for ernæring og fysisk aktivitet* (IS-1219). Oslo: Sosial- og helsedirektoratet.
- Statens råd for ernæring og fysisk aktivitet. (2002). *Anbefalinger for spedbarnsernæring.* [IS-1019]. Oslo: Statens råd for ernæring og fysisk aktivitet.
- Taylor, A.G. & Savage, C. (2006). Fatty acid composition of New Zealand green-lipped mussels, *Perna canaliculus*: Implications for harvesting for n-3 extracts. *Aquaculture*, 261(1), 430-439.
- The European Union (2010). COMMISSION REGULATION (EU) No 116/2010 of 9 February 2010. amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims *Official Journal of the European Union, Legislation*, 53(L37) 16-18.
- The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids [ISSFAL]. (2004). *Report of the Sub-Committee on RECOMMENDATIONS FOR THE INTAKE OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN HEALTHY ADULTS.* Brighton: ISSFAL.
- Turner, R., McLean, C.H. & Silvers, K.M. (2006). Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation? *Nutrition Research Reviews*, 19, 53-62.
- Vinter, H. (1995). Production of high quality fish oils. I: Hamilton, R.J. (Red.) & Rice, R.D. (Red.), *FISH OIL. Technology, Nutrition and Marketing* (s. 27-33). Hull: Society of Chemical Industry. Oils & Fats Group.
- Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B. et al. (2006). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not a-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 5-17
- Yildiz, G, Whelings, R.L. & Cuppett, S.L. (2003). Comparison of four analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized soybean oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(2), 103-107.

4 Delprosjekt II: Kartlegge hvilke biologiske markører som er egnet for helseeffektsstudier av oksidasjonsgrad i cellemodeller

Utvalgte oljer testet ut i delprosjekt II bygger på funn og resultater om oljekvalitet fra delprosjekt I.

4.1 Bakgrunn, delprosjekt 2: Fiskeoljekvalitet og helse

Det har i de siste årene vært knyttet stor interesse til bruk av fiskeoljer for å motvirke en rekke sykdommer, og det er udiskutabelt at oljene har en rekke positive helseeffekter. Imidlertid vet vi ikke om eventuell effekt av oksidert olje kan føre til at den positive effekten ved inntak av fiskeolje blir maskert eller til en viss grad blir redusert. Vil det for eksempel være "sunnere å ta 100 mg DHA fra en ikke-oksidert olje i forhold til å ta 150 mg DHA fra en svakt oksidert olje?

Det har blitt rettet fokus på eventuell sammenheng mellom oksidativ skade og utvikling av sykdom, noe som gjenspeiles i en rekke publikasjoner (Blomhoff *et al.*, 2004, Estebauer *et al.* 1992, Novotny *et al.* 1994, Chaudhary *et al.* 1994, Yoritaka *et al.* 1996, Staff og Havorsen 2003, Turner *et al.* 2006). Kun få og små humanforsøk har vært utført og ofte har oksidasjonsgrad av eksperimentelle oljer vært dårlig beskrevet. Noe som gjør det vanskelig å trekke bastante konklusjoner. Imidlertid er det indikasjoner på at inntak av oksiderte fettsyrer kan ha effekt på forskjellige biomarkører, inkludert lipidmetabolisme, oksidativt stress og vaskulære funksjoner.

4.1.1 Hvordan verifisere gunstig helseeffekt av oljer fra ferskt norsk råstoff?

For å kunne benytte ferskhets eller grad av oksidering til å differensiere mellom ulike kvaliteter av kommersielle oljer, er man avhengig av at det finnes en godt dokumentert og verifiserbar sammenheng mellom positive helseeffekter og lav oksidasjonsgrad. Man er avhengig av å gjennomføre komparative studier med ulike oljekvaliteter i celler, forsøksdyr og mennesker. Til dette behøves en god kartlegging/karakterisering av selve oljen som benyttes i forsøk og tilgang på gode og egnede helsemarkører.

4.1.2 Kartlegging av effekter på mennesker – human studier

Et viktig endelig mål vil være å kartlegge eventuelle positive helseeffekter i menneske ved inntak av oljer produsert fra ferske norske råvarer relativt til andre oljer på markedet. Det er imidlertid tidkrevende og kostbart å kartlegge helseeffekter i menneske, og det er strenge etiske retningslinjer for hva det er lov å foreta av kliniske studier. Stort sett vil man være avhengig av å basere seg kun på helsemarkører som kan påvises i blodprøver og urin. Enkelte effekter kan lett påvises ved hjelp av blodprøver, men effektene av eventuelle oksidasjonsskader kan være størst i andre vev og organer. Forsøk med menneske er dessuten krevende i forhold til å kartlegge effekter av mange ulike oljer og oljekvaliteter. I dette prosjektet har vi av den grunn ansett det som mest fordelaktig å benytte alternative modellsystemer.

4.1.3 Kartlegging av effekter - alternative modellsystemer

Det finnes en rekke alternative modellsystemer som kan være godt egnet til å screene mange oljer med ulik profil og oksidasjonsgrad for helseeffekter i tidlige faser av prosjektet. Det kan nevnes dyremodeller (mus, rotte, kylling, gris) som bl.a. benyttes i ulike medisinske miljø, og som alle har sine styrker og svakheter avhengig av hvilke effekter man er ute etter. Fisk kan i utgangspunktet være et alternativ modelldyr fordi cellemembranene er rikere på omega-3-fettsyrer enn membraner i andre alternative forsøksdyr. Utfordringen med å gjennomføre studier på levende dyr er at man har begrenset mulighet til å observere hva som egentlig skjer på cellenivå og det har også vært viktig å begrense bruken av forsøksdyr i de første kartleggingsforsøkene. Vi valgte derfor å benytte ulike cellemodeller i første fase av prosjektet. Dette har gitt oss mulighet til å studere effekt av oksidasjon på helsemarkører utenfor den levende organismen (*in vitro*).

4.1.4 Cellemodell systemer (in vitro)

Primærceller isolert fra "levende" vev og organer har tilnærmet de samme funksjoner/egenskaper som celler i levende organismer, noe som innebærer at disse cellene er et meget egnet modellsystem for å screene for eventuelle helseeffekter av mange ulike oljekvaliteter. Ved å dyrke primære leverceller fra fisk i dyrkningsmedium tilsatt ulike oljekvaliteter kan man få indikasjoner på hvorvidt de ulike oljekvalitetene påvirker cellens spesifikke funksjoner.

En rekke etablerte cellelinjer fra menneske er tilgjengelig, og kan benyttes som modellsystem for å teste for eventuelle effekter av oksiderte oljer. Tarmen er det vevet som utsettes for de høyeste konsentrasjonene av harske oljer. Tarmceller i kultur (humane Caco-2 celler) er derfor valgt som modellsystem for studier av oksidativt stress relaterte helseskader i tarm og effekt på celledeling. En human monocytt cellelinje er valgt for studier av hvordan oljekvalitet påvirker inflammasjonsrespons.

4.2 Metode, delprosjekt 2: Cellemodellsystemer

4.2.1 Isolasjon og dyrking av hepatocytter

Hepatocytter ble isolert fra Atlantisk laks i henhold til metode beskrevet av Dannevig og Berg (1985). Etter isolering ble cellene filtrert gjennom et 100 µM nylon filter. Hepatocytter ble vasket tre ganger i L-15 medium og sentrifugert i 2 min på 50xg mellom hver vask. Etter siste vask ble cellene reløst i L-15 dyrkningsmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum (FBS), 1 % bikarbonat, 1 % L-glutamin, 5mm Hepes og 1 % PenStrep. Omtrent 1 x 10⁷ hepatocytter ble deretter sådd ut på 25 cm² celle flasker belagt med laminin. Cellene festet seg til bunnen av celleflasken over natten ved 13°C. Neste dag ble cellene behandlet med de forskjellige oljekvalitetene.

4.2.2 Humane cellelinjer

Forsøksoppsett med Caco-2 (tarmceller):

Caco-2 cellelinjen er en mye brukt *in vitro* modell for humane tarmepitelceller på grunn av dens evne til å differensiere og danne et tett polarisert celleglag tilsvarende det som finnes i tarmveggen. Caco-2 cellene (både differensierte og udifferensierte) inkuberes med de ulike oljekvalitetene i 4 og 24 timer ved 37 grader. Cellene observeres for evt. morfologiske endringer vha lysmikroskopi.

Det utføres dose respons studier for de utvalgte oljene.

Forsøksoppsett med monocyttecellelinjen U937 3x κ -B LUC:

For å studere effekten av oksiderte oljer på inflammasjonsresponsen benyttes en human monocyttecellelinje som er stabilt transfektert med en NF- κ B-luciferase reporterkonstrukt (U937 3x κ -B LUC). Forandringer i aktiviteten til transkripsjonsfaktoren NF- κ B spiller en viktig rolle i cellulære stress-, immun- og inflammasjonsrespons. U937 3x κ -B LUC cellelinjen inkuberes med de ulike oljekvalitetene i 6 timer. Den resulterende aktiviteten til NF- κ B bestemmes ved å måle luciferase aktiviteten i cellene etter tilsatts av luciferin (Berridge and Tan 1993).

4.2.3 Oljer som substrat for humane cellelinjer (tarmceller og monocytter)

Fiskeoljene fordøyes med en løsning bestående av pancreatin og galleekstrakt, før de hydrolyserte fettsyrene isoleres, løses i etanol og tilsettes cellene. Dette utføres for å simulere tilsvarende frigjøring av fettsyrer som skjer i begynnelsen av tynntarmen (se beskrivelse under, metode 2).

4.2.4 MTT assay

MTT er en metode som utnytter at spaltningen av tetrazolium-saltet-MTT gir purpurfargede krystaller i metabolsk aktive celler. Analysen utføres i henhold til metodebeskrivelsen (Berridge and Tan 1993).

4.2.5 Tre metoder for tillaging av oljesubstrater for leverceller fra Atlantisk laks

Metode 1: Det lages en meget finfordelt olje/protein emulsjon ved å benytte en kombinasjon av kun olje, dimethyl sulfoxide (DMSO), protein og dyrkningsmedium. Denne metoden er meget skånsom for oljene. Det innføres ingen endringer i sammensetningen av lipid (som ved bruk av emulgator i metode 3), ei heller blir substratet pre-fordøyd som i metode 2. Dette medfører at tillaging av substratet på denne formen er så skånsom at det ikke medfører noen endringer i oksidasjonsstatus av opprinnelsesoljen. Ved å studere oljeemulsjonen i fasekontrastmikroskop, kunne vi observer små finfordelte miceller. Det ble foretatt en del initielle forsøk som viste at cellene var i stand til å ta opp dette substratet. Dette substratet benyttes kun til leverceller.

Metode 2 (pre-fordøying av oljen): 0.6 g galle ekstrakt løses i 4 ml 150 mM NaHCO₃. 75 mg pancreatin løses i 4 ml 150 mM NaHCO₃. Begge løsninger tilsettes 32 ml fosfat buffer

(PBS) til et totalvolum på 40 ml. 1 ml olje tilsettes 5 ml av gallesyre-pancreatin løsningen (som beskrevet over) og løsningen inkuberes i 3 timer i ristevannbad ved 37°C. Olje og vannfraksjonen separeres ved sentrifugering. Oljefraksjonen fortynnes 1:10 i etanol, og utgjør stamløsningen av substratet som benyttes i ulike konsentrasjoner i inkubasjon med henholdsvis hepatocytter og de humane cellelinjene Caco-2 celler og en monocytt cellelinje.

Ved denne metoden blir oljene/lipidene "fordøyd", dvs de blir inkubert med galle og pankreatin (som bl.a. inneholder lipaser) i 3 timer ved 37°C. Oljen blir da brutt ned til fettsyrer og danner miceller \Rightarrow gjør det mulig å bli absorbert av tarmcellene. Dette tilsvarer det som skjer i magen under en vanlig fordøyelse. Metoden er basert på publiserte metoder for *in vitro* fordøyelse (Aura et al., 1999). Dette er en meget relevant metode å benytte for Caco-2 celler. Tilsvarende metode ble brukt på oljer tilsatt monocytter + hepatocytter. Dette er ikke like relevant for disse celletypene, da de ikke naturlig vil bli utsatt for denne type fordøyde oljer. For hepatocytter har vi av den grunn også prøvd ut metoder hvor lipidene tilsettes celler i form av triglyserid bundet til protein (metode 1), eller løst vha emulgator (metode 3).

Metode 3 (olje + emulgator): Marin olje og Danisco-emulgator ble blandet i forholdet marin olje: emulgator, 2:1. Substratet ble sjekket med fasekontrastmikroskop og vi kunne observere en finfordelt oljeemulsjon.

Ved bruk av metode 1 og 3 testet vi ut tilsetning av lipase til celler sammen med oljeemulsjonen. Dette for å lette frigivelsen av fettsyre fra triglyserider, slik at fettsyrer lettere kunne tas opp i celler. Våre resultater viste imidlertid at selv meget lave konsentrasjoner av lipase førte til tap av membranlipider (reduisert nivå av fosfolipid). Vi har av den grunn ikke benyttet lipasetilsetning i våre studier presentert i denne rapporten.

4.2.6 Fettsyresammensetning

Total lipid ble ekstrahert ved hjelp av en metode beskrevet av Folch et al. (1957). Kloroformfasen dampes inn til tørrhet under nitrogengass og lipidet reløses i kloroform. Methyl estere av fettsyrene dannes etter en metode beskrevet av Mason og Waller (1964) og av Hoshi et al. (1973). De ulike fettsyrene separeres i en GC (Hewlett Packard 6890) med en splitt injektor, SGE BPX70 kapillær kolonne (lengde 60 m, indre diameter 0,25 mm og en tykkelse på film på 0.25 μ m), flammeionisasjonsdetektor og HP ChemStation programvare. Helium ble brukt som bæregass, og injektor- og detektortemperatur var begge 280°C. Temperaturen ble hevet fra 50 til 180°C med en hastighet på 10°C min⁻¹, og deretter hevet til 240°C med en hastighet på 0,7°C min⁻¹. Den relative mengden av hver FA ble bestemt ut i fra arealet under toppen.

4.2.7 Lipidklassesammensetning

Lipidklasse sammensetning i hepatocytter ble bestemt ved hjelp av høytrykks tynnsjikt-kromatografi (HP-TLC) som beskrevet i Todorčević et al. (2010).

4.2.8 Superoxide dismutase

Superoxide Dismutase (SOD) katalyserer reduksjon av superoxide til oksygen og hydrogen peroxide. Et kommersielt tilgjengelig "kit" ble benyttet til analysen av denne enzymaktiviteten

(Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Analysen ble avlest ved 405 nm i en Victor mikroplateleser fra PerkinElmer (Wellesley, MA, USA).

4.2.9 Glutathione peroksidase

Glutathione peroxidase (Gpx) bestemmes i henhold til en metode beskrevet av Paglia and Valentine (1967), hvor Gpx katalyserer oksidasjonen av glutathione og det oksiderte glutathione reduseres tilbake samtidig som NADPH oksideres til NADP som gir en reduksjon i absorbansen ved 340 nm.

4.2.10 Bestemmelse av thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) bestemmes ved å benytte et kommersielt colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Absorbansen måles spektrofotometrisk i en Victor 3 mikroplateleser fra PerkinElmer (Wellesley, MA, USA) ved 530 nm.

4.2.11 Lipidperoksidering (DPPP)

Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) inkorporeres raskt i cellemembraner, og brukes som en følsom fluoriserende sensor for lipidperoksidering i membranene.

4.2.12 Kvantitativ real-time PCR

Total RNA ekstraheres ved å benytte RNeasy® Mini Kit i henhold til produsentens protokoll. RNA behandles med RNase-free DNase I for å fjerne kontaminerende DNA. Alle RNA prøver benyttet i våre forsøk hadde A260/280 ratioser mellom 1.80 og 2.30. Total RNA konsentrasjon ble bestemt ved 260 nm ved å benytte spektrofotometer. Ca 200 ng av total RNA ble revers-transkribert til cDNA ved å benytte et TaqMan® Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i et reaksjonssystem med volum 50 µl. Alle prosedyrer ble utført i henhold til protokoll beskrevet i Todorčević et al. (2010).

4.3 Resultat og diskusjon, delprosjekt 2: Cellemodeller

4.3.1 Eksperiment 1. Uttesting av ulike metoder for å gjøre fiskeoljesubstratet tilgjengelig for celler i kultur og videre studere biologiske effekter av de ulike substratene i celler

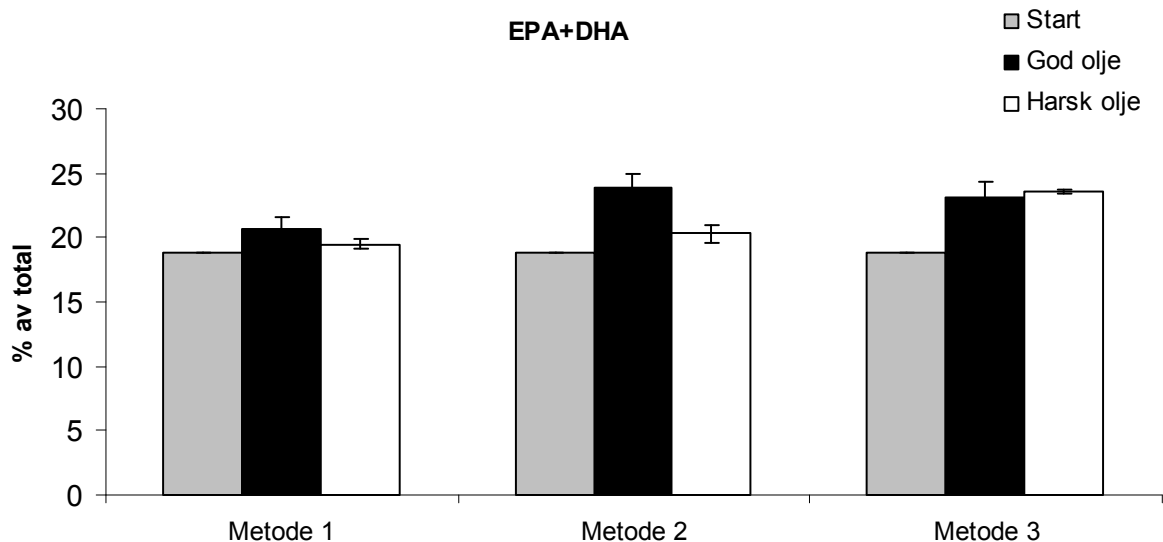
I første innledende forsøk med primære leverceller (hepatocytter) fra laks i kultur, ønsket vi å teste ut ulike metoder for å gjøre fiskeoljesubstratene tilgjengelig for cellene, og dernest studere hvorvidt de ulike substratene påvirket cellulære prosesser. Tre metoder ble testet ut i første omgang, en metode hvor det ble direkte laget en olje/protein emulsjon av oljen (metode 1), en metode hvor oljen ble delvis fordøyd forut for tilsetning til celler (metode 2, vil her ha en blanding av frie fettsyrer og forestrede lipider) og en metode 3 hvor det ble benyttet en emulgator/stabilisator for å lage en oljeemulsjon. Vi ønsket i tillegg å sammenligne effektene av en god olje og en harsk olje (se tabell 4 for informasjon om oksidasjonsgrad av oljene).

Tabell 4 PV og AV verdier av eksperimentelle oljer.

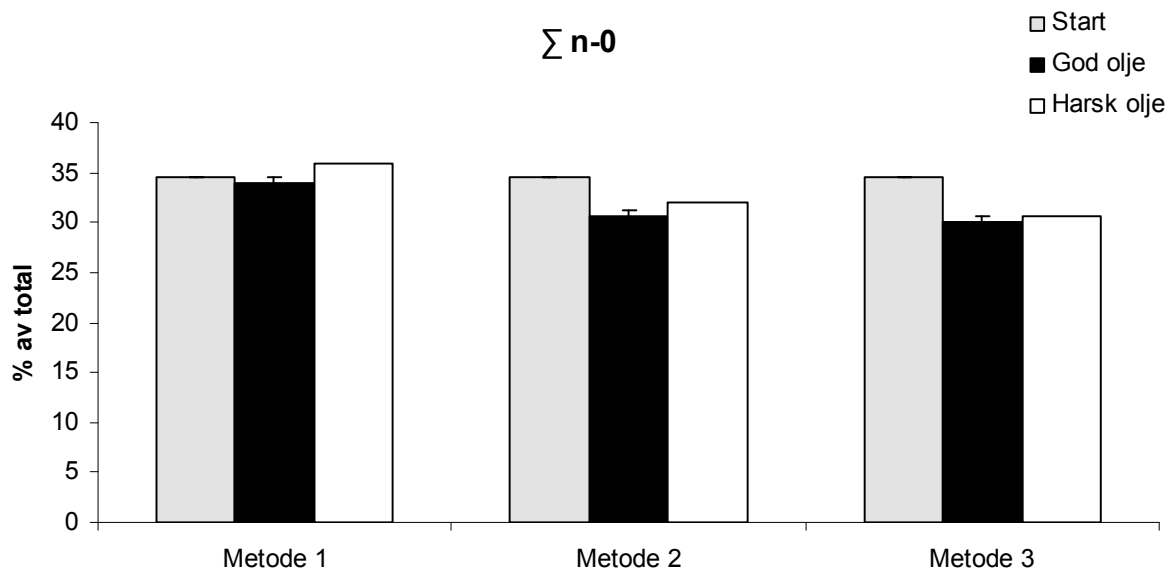
	Peroksidtall (PV)	Anisidintall (AV)
God olje	0,5	1,8
Harsk olje	45	42

Fiskeoljene som benyttes i eksperiment I (harsk olje og god olje) ble valgt ut på grunnlag av at de har identisk fettsyresammensetning. Det ble med hensikt valgt ut en olje med lav oksidasjonsgrad og en med meget høy oksidasjonsgrad i første forsøk for å kartlegge potensiell forskjell i effekter på helsemarkører mellom ekstremgrupper.

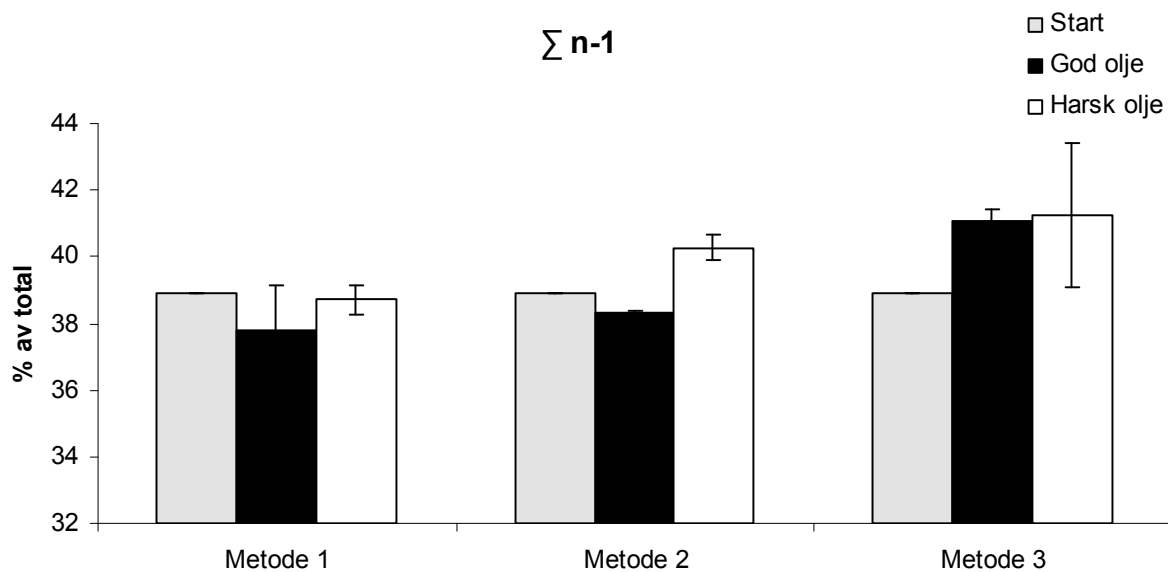
Testoljene er rike på omega-3-fettsyrene eicosapentaensyre (EPA) og docosaheksaensyre (DHA). En økning i andelen EPA og DHA i levercellene i kultur etter inkubasjon med disse oljene, vil dermed være en god indikasjon på om cellene har tatt opp disse fettsyrene fra oljesubstratene tilsatt. Figur 4a viser at celler inkubert i dyrkningsmedium tilsatt fiskeoljer etter metode 1,2 og 3, alle gav en prosentvis økning i EPA og DHA nivået i cellene, spesielt i celler dyrket i medium tilsatt olje av god kvalitet. Celler dyrket i medium tilsatt olje med høyere peroksidtall (harsk olje), viste litt lavere prosent av EPA og DHA enn celler tilsatt god olje. Siden fettsyresammensetningen er den samme i begge testoljene, kan resultatet tyde på høyere grad av lipidperoksidering i gruppen gitt harsk olje, og at dette igjen har ført til noe tap av EPA og DHA. Dette kunne for øvrig ikke observeres ved bruk av metode 3, hvor oljen var tilsatt emulgator/stabilisator. Stabilisatoren emulgatoren inneholder bl.a. diglyserider (DG), og stabilisatoren vil antagelig påvirke/ beskytte oljene/cellene mot videre lipidperoksidering. Bruk at emulgatoren ser ut til å påvirke analyseresultatet, og det kan dermed stilles spørsmålsteget ved bruk av denne metoden.



Figur 4a Prosent EPA og DHA i hepatocytter dyrket (48 timer) i medium tilsatt henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml). Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder. Start viser utgangsverdien av EPA og DHA i celler før tilsetning av de ulike fiskeoljesubstratene.

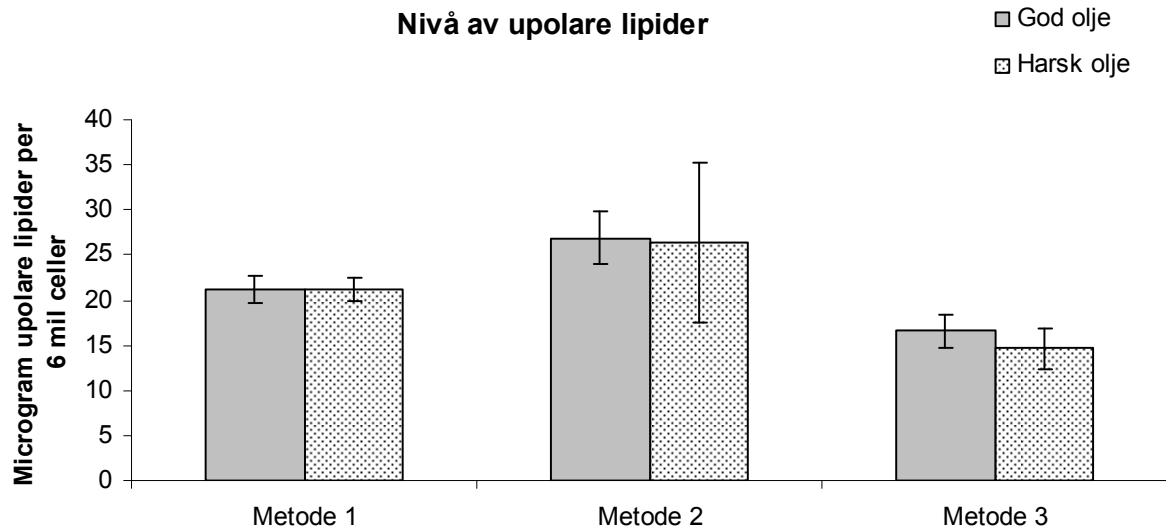


Figur 4b Sum mettede fettsyrer i hepatocytter dyrket (48 timer) i medium tilsatt henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml). Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder. Start viser utgangsverdien av mettede fettsyrer i celler før tilsetning av de ulike fiskeoljesubstratene.

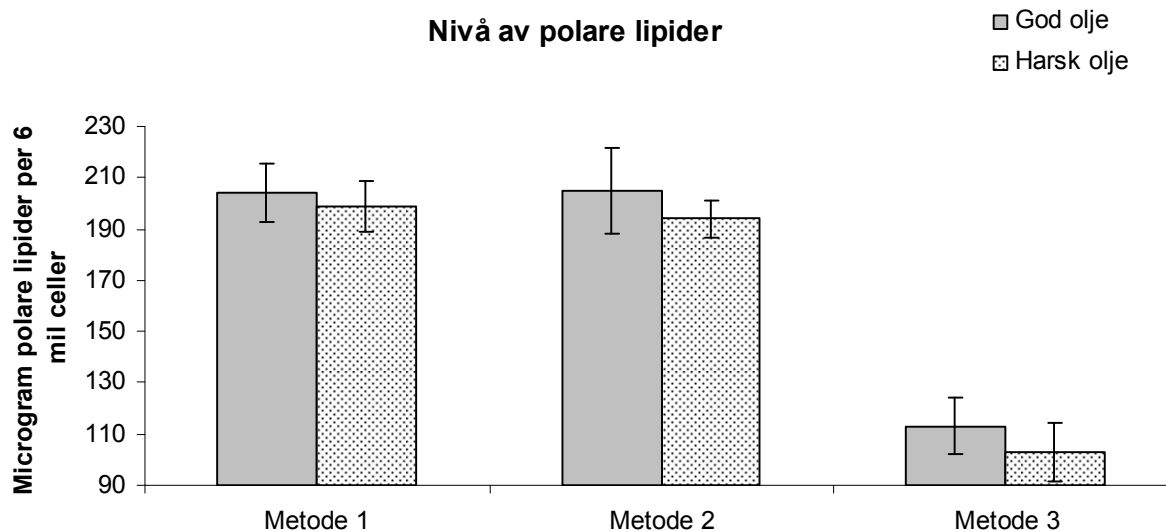


Figur 4c Sum monomettede fettsyrer (MUFA) i hepatocytter dyrket (48 timer) i medium tilsatt henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml). Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder. Start viser utgangsverdien av MUFA i celler før tilsetning av de ulike fiskeoljesubstratene

Figurene 4b og 4c viser at prosent mettede (n-0) og monoumettede (n-1) fettsyrer er lavere i celler dyrket i medium tilsatt god olje tillaget ved bruk av metode 1 og 2 enn i celler ved start. Vi ser ikke denne effekten i harsk olje gruppen, noe som kan skyldes at vi ikke fikk tilsvarende økning i prosent EPA og DHA i denne gruppen. Hepatocytter dyrket i olje tillaget med metode 3 (emulgator) viste en økning i monoumettede fettsyrer sammenlignet med startverdien. Dette skyldes antagelig at emulgatoren i seg selv inneholder DG med monoumettede fettsyrer, noe som påvirker analyseresultatet, da det er sannsynlig at cellene har tatt opp fettsyrer fra emulgatoren.

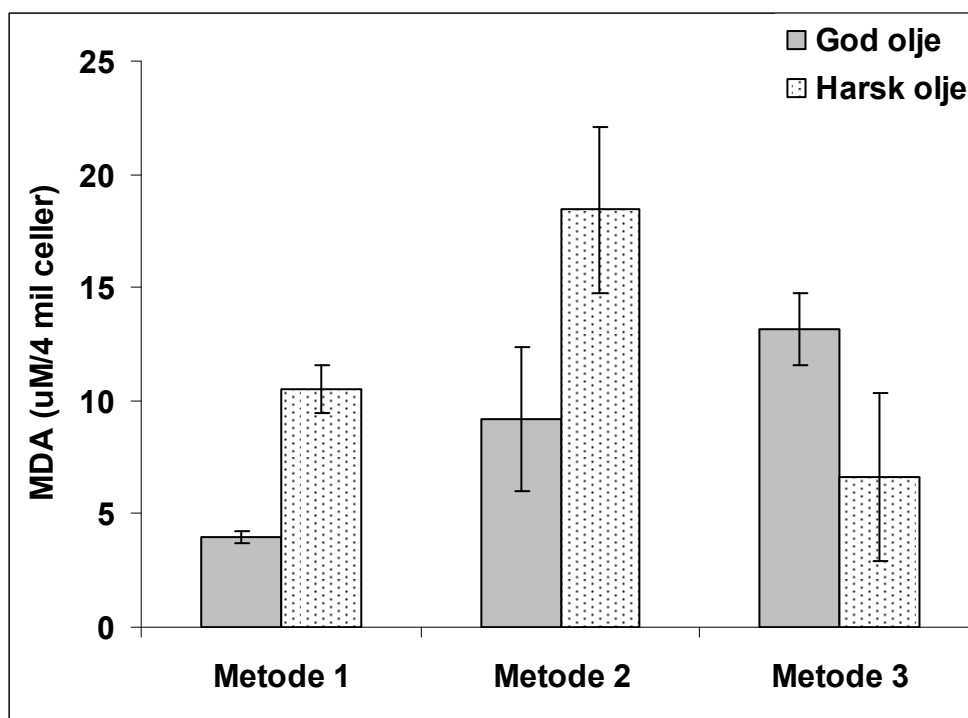


Figur 5 Nivå av upolare lipider (μg / 4 mill celler) i celler dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5mg/ml) i 48 timer. Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder.



Figur 6 Nivå av polare lipider (μg / 4 mill celler) i celler dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5mg/ml) i 48 timer. Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder.

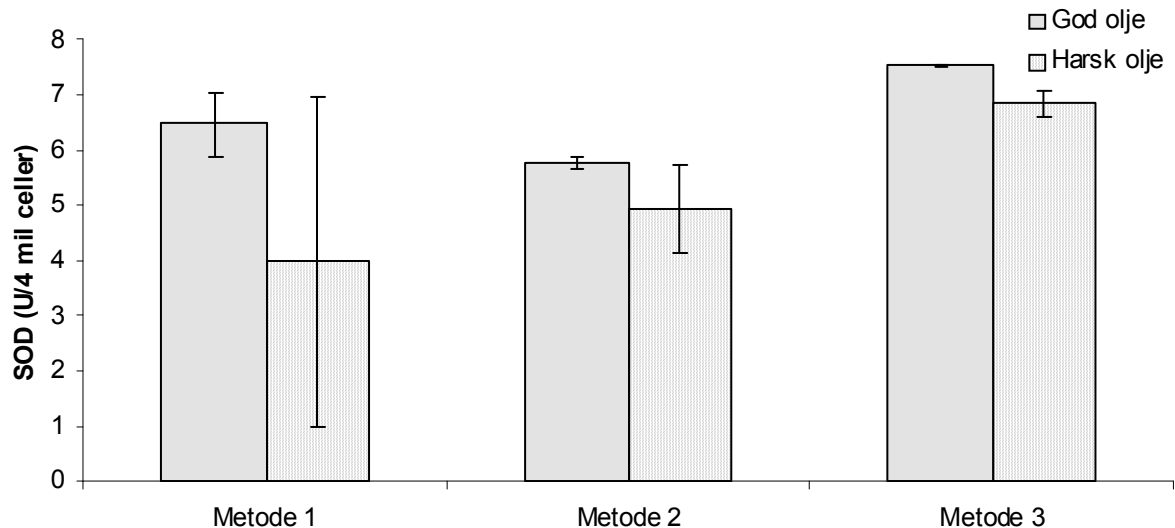
Figur 5 og 6 viser total nivå av upolare og polare lipider i celler dyrket i henholdsvis god og harsk olje. Figur 5 viser ingen tydelig forskjell i nivået av upolare lipider (sum av TAG, MAG, DAG og FFA) mellom celler gitt god og harsk olje ved metode 1 og 2. Figur 6 viser at det er en trend til reduksjon i fosfolipidnivået i celler gitt den harske oljen sammenlignet med den gode oljen. Dette resultatet er i overensstemmelse med den observerte nedgangen i EPA+DHA i de samme gruppene, og kan tyde på økt grad av lipidperoksidering i membranlipidene til celler gitt den harske oljen, noe som fører til tap av membranfosfolipider (i overensstemmelse med tidligere observasjoner Kjær et al., 2008, Østbye et al., 2009. Metode 3 gav lavere nivå av både upolare og polare lipider i cellene. Dette resultatet er antagelig ikke reelt. Analysemetoden som er benyttet er Camag HPTLC, og hvor kvantifisering av lipidklassene baserer seg på antall dobbeltbindinger i fettsyrene i prøven relatert til standard. I metode 3 ble oljesubstratet tilsatt Danisco emulgator, denne emulgatoren inneholder mettede og monoumettede fettsyrer spesielt i DAG, noe som vil føre til underestimering av fosfolipidnivået i cellene. Fosfolipidene i cellemembranen i denne gruppen inneholder antagelig et høyere nivå av monoumettede fettsyrer i cellemembranen pga opptak av denne fettsyren fra emulgatoren (noe som også prosent av MUFA viste).



Figur 7 TBARS (MDA, sekundære oksidasjonsprodukter) i celler dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5mg/ml) i 48 timer. Oljesubstratene var tillaget ved 3 ulike metoder.

Figur 7 viser at nivået av sekundære oksidasjonsprodukter (MDA) øker i celler inkubert med harsk olje sammenlignet med god olje ved metode 1 og metode 2. Ved bruk av emulgator i metode 3, ser man derimot det motsatte resultat. Det er trolig at stabilisatoregenskapene til emulgatoren i stor grad påvirker resultatet. Nivåene av MDA er høyere ved bruk av metode 2 enn 1. Dette er et forventet resultat, da pre-fordøyning av substratet ved 37°C under risting vil

kunne påvirke resultatet ved at prosedyren i seg selv kan føre til økt lipidperoksidering av oljesubstratet. Metode 2 må optimaliseres med hensyn på stabilisering av oljen under fordøyelsesprosessen dersom denne skal benyttes i videre analyser av effekter i celler.



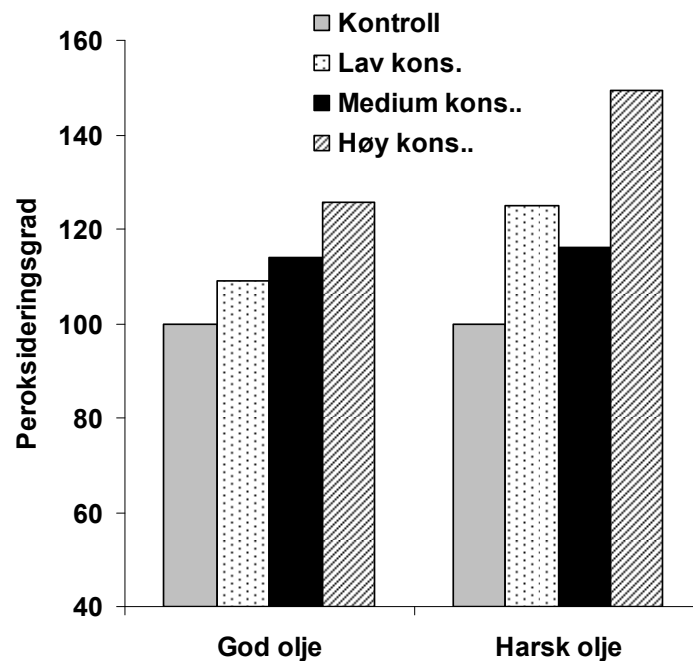
Figur 8 SOD i hepatocytter dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5mg/ml) i 48 timer. Oljesubstratene var tillaget vha 3 ulike metoder.

Figur 8 viser at aktiviteten av den intracellulære antioksidanten superoksid dismutase (SOD) synker når celler inkuberes med harsk olje sammenlignet med god olje.

4.3.2 Eksperiment 2 - primære hepatocytter fra laks – en dose-respons studie og tidsstudie

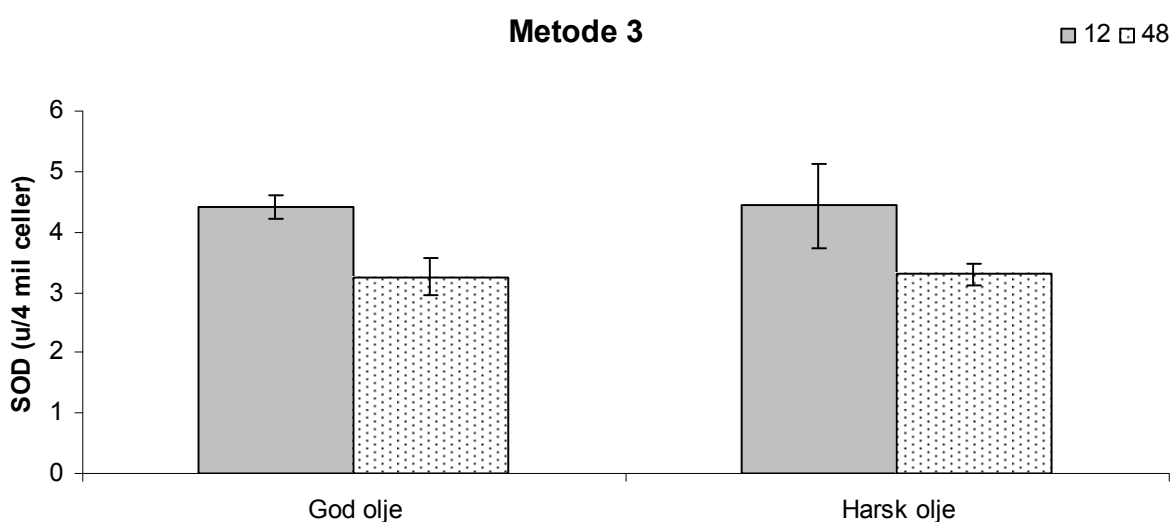
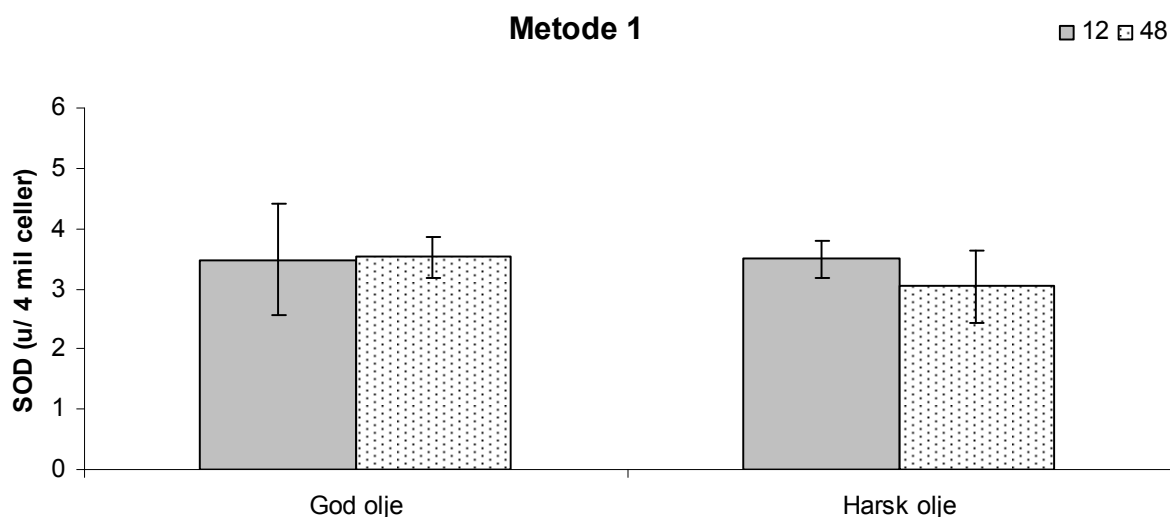
I videre forsøk med primære hepatocytter har vi valgt å videre teste ut metode 1 og metode 3 for å gjøre substratet tilgjengelig for celler. Metode 1 er den mest skånsomme metoden som ikke påvirker lipidperoksideringsnivået i oljen og er videre ikke tilsatt emulgator/stabilisator som kan påvirke både lipidsammensetningen og grad av lipidperoksidering i cellene som i metode 3.

I eksperiment 2 ønsket vi å teste ulike oljekonsentrasjoner og hvorvidt inkubasjonstiden påvirker responsgrad i cellene. Figur 9 viser at økende konsentrasjon av olje, tillaget med metode 1, tilsatt dyrkningsmediet fører til økt grad av lipidperoksidering i cellene. Vi ser den samme responsen i god olje og harsk olje gruppene, men responsen er høyere i harsk olje gruppen.



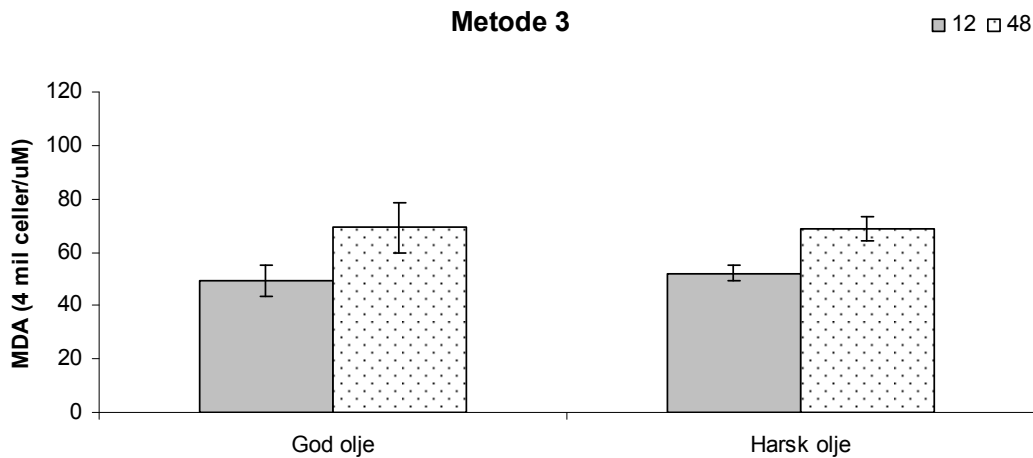
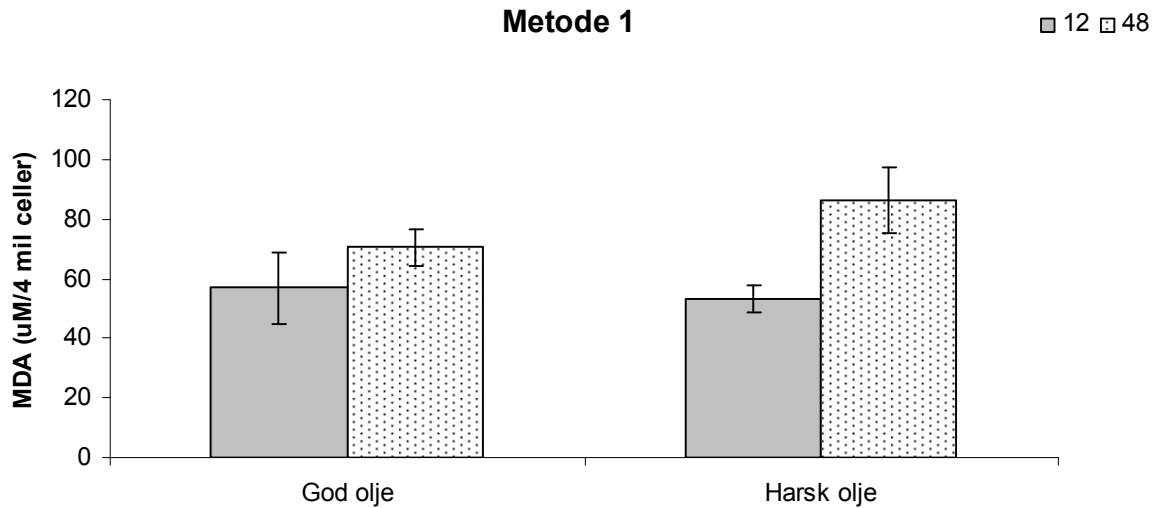
Figur 9 *DPPP oksidering av hepatocytter inkubert i 48 timer med tre ulike konsentrasjoner av oljesubstrat (tillaget med metode 1 : 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml og 0,75 mg/ml). Kontrollverdien er satt til 100 og responsen i celler tilsatt oljesubstrat er beregnet relativt til kontrollverdien.*

Celler ble inkubert ved henholdsvis 12, 48 og 76 timer med de samme gode og harske oljene som i eksperiment 1 og med medium oljekonsentrasjon 0.50 mg/ml). 76 timers inkubering førte til større forekomst av celledød (apoptose), spesielt i gruppen inkubert med den harske oljen. 76 timer var dermed uegnet og resultater fra 76 timer er ikke vist i rapporten da denne gruppen ikke gav reproduserbare og pålitelige resultater. Ved 12 og 48 timer derimot kunne vi ikke observere endringer i forekomst av celledød, og vi anser det trygt å inkubere i 48 timer med de valgte oljekonsentrasjoner både av harsk og god olje.



Figur 10 SOD aktivitet i hepatocytter dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml) ved 12 og 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1 og metode 3.

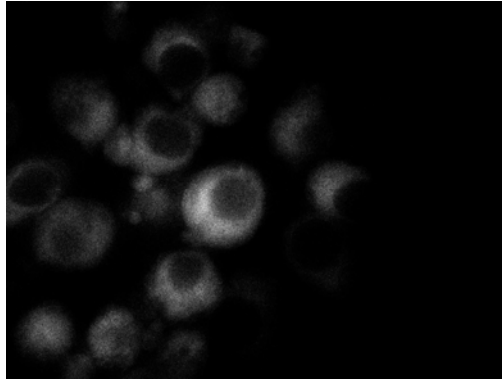
Figur 10 viser ingen endringer i SOD nivået i hepatocytter inkubert med god olje ved 12 og 48 timer ved bruk av metode 1. I celler inkubert med den harske oljen derimot ser vi en nedgang i SOD nivået ved 48 timer sammenlignet med 12 timer, tilsvarende nedgangen observert i eksperiment 1. Ved bruk av olje tillaget etter metode 3, så vi samme respons med nedgang i SOD aktivitet i celler etter 48 timer i både harsk olje og god olje gruppene.



Figur 11 MDA i hepatocytter dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml) ved 12 og 48 timer etter metode 1 og metode 3.

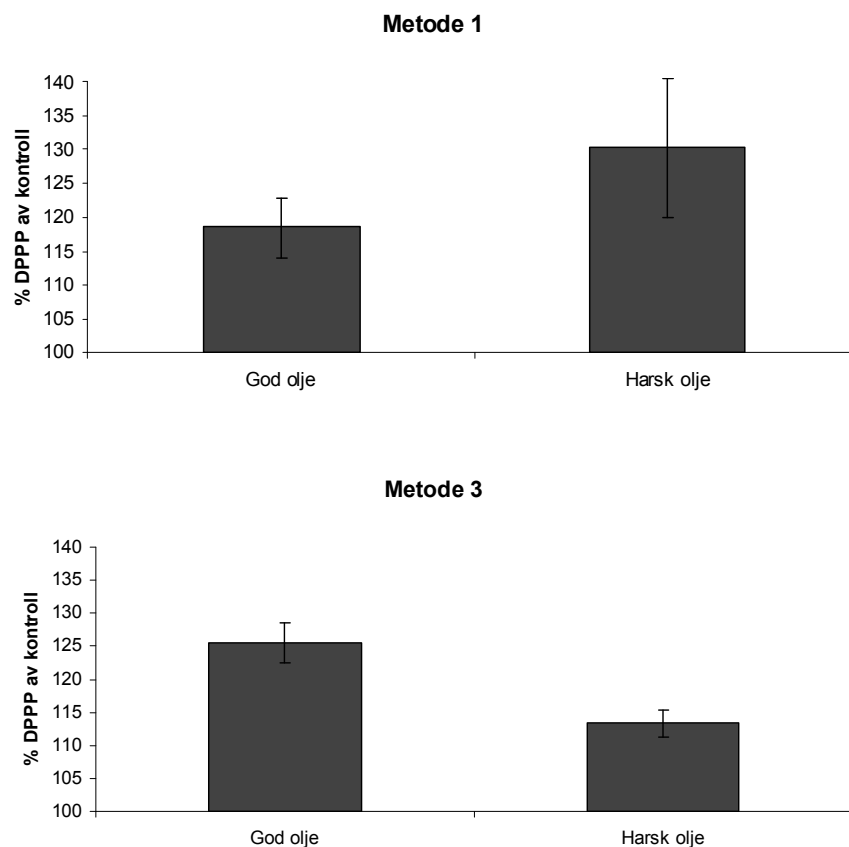
Figur 11 viser at MDA nivået i celler øker fra 12 til 48 timer i begge grupper både etter metode 1 og metode 3. Det var en høyere respons etter 48 timer i harsk olje gruppen tilaget etter metode 1 enn etter metode 3, noe som antyder at emulgatoren tilsatt i metode 3 til en viss grad beskytter oljen mot lipidperoksidering sammenlignet med olje tilaget etter metode 1.

48 timers inkubering med medium konsentrasjon av olje (0,5 mg/ml), tyder på å være det mest egnede dose og tidspunkt for å studere eventuelle effekter på ulike helse markører, ut i fra resultatene beskrevet over. I overensstemmelse med dette undersøkte vi lipidperoksidering i celler vha mikroskopi etter 48 timers inkubering av celler med harsk olje. Celler ble tilsatt fluorocrom DPPP, som når det oksiderer, pga reactive oksygen species, ROS i cellen, sender ut fluorescerende lys (Figur 12).



Figur 12 Fluorescens mikroskopi av hepatocytter inkubert med harsk olje (0,5mg/ml) i 48 timer (20x forstørrelse). Bildet viser kraftig fluorescens, dannet ved oksidasjon av DPPH, i flere av cellene.

Grad av peroksidering i cellene kan måles ved å bestemme grad av DPPH oksidering vha fluorescens spektroskopi. Figur 13 viser en økt oksidering i celler (DPPH) gitt den harske oljen sammenlignet med den gode ved 48 timer ved bruk av metode 1. Olje tillaget etter metode 3 derimot gav det motsatte resultat, det vil si lavere oksidasjongrad i hepatocytter inkubert med olje tillaget med emulgator. Samlet sett så viser resultatene fra både eksperiment 1 og eksperiment 2 at emulgatoren som benyttes i metode 3 i stor grad forstyrrer analyseresultatene, både når det gjelder lipidsammensetning og oksidasjonsgrad.



Figur 13 DPPH i hepatocytter dyrket i henholdsvis god og harsk olje (0,5 mg/ml) ved 48 timer etter metode 1 og metode 3.

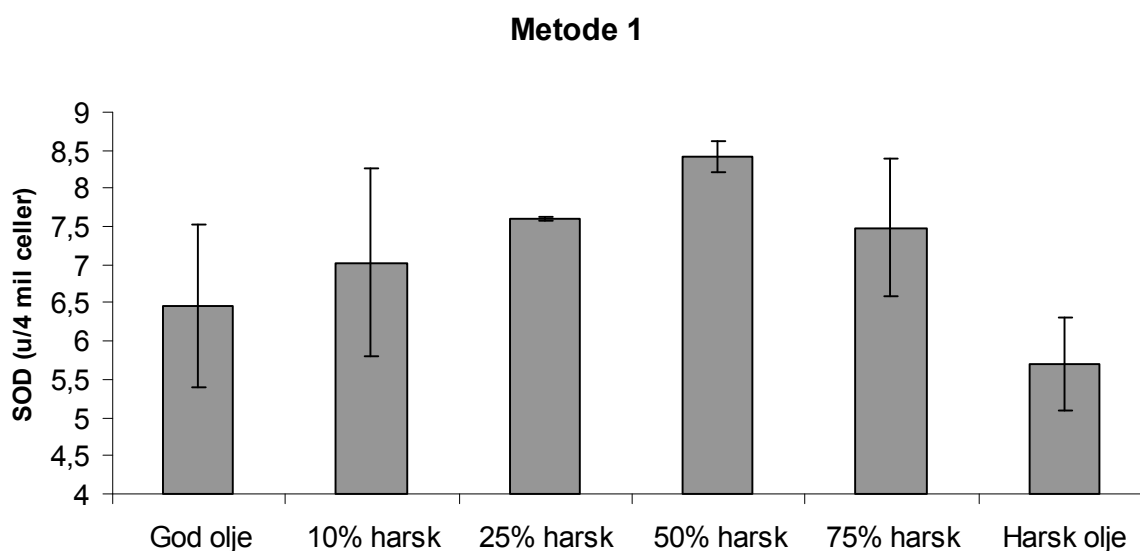
4.3.3 Eksperiment 3 – Dose-respons studie

I eksperiment 3 ble den harske oljen fortynnet med den gode oljen i 6 ulike fortynninger (tabell 5). Både hepatocytter fra laks, en human monocytt cellelinje og humane Caco-2 celler ble dyrket i cellemedium tilsatt denne fortynningsrekken av olje med økende harskningsgrad.

Tabell 5 PV og AV verdier av en eksperimentell fortynningsrekke av olje.

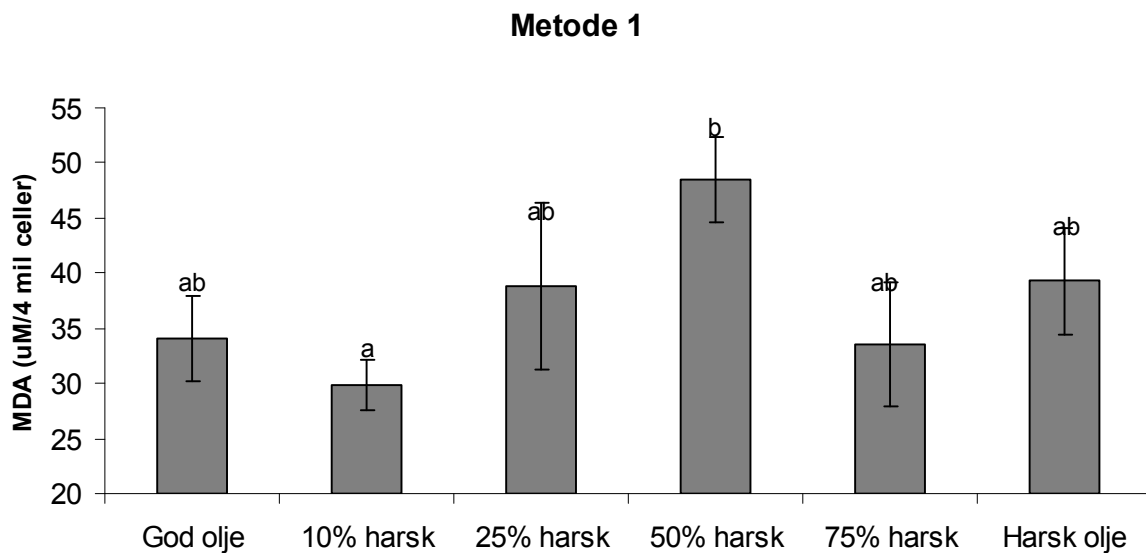
	Peroksidtall (PV)	Anisidintall (AV)
God olje	3,8	2,0
10% harsk	5,3	3,2
25% harsk	8,4	6,3
50% harsk	18,3	11,3
75% harsk	29,2	17,4
Harsk olje	37,5	25,6

Figur 14 viser at SOD aktivitet øker med økende harskningsgrad av oljen opp til 50 % harsk, deretter får vi en reduksjon i SOD aktivitet ved 75 % og en ytterligere reduksjon i ufortynnet harsk olje. SOD aktiviteten er lavere i den ufortynnede harske oljen enn i den gode oljen, i overensstemmelse med resultatene fra eksperiment 1 og eksperiment 2. Dette tyder på at moderat harskninggrad av oljen fører til en økning i SOD aktivitet, mens videre økning i harskningsgrad derimot fører til en reduksjon. Vi kan ikke fastslå med sikkerhet hva som forårsaker nedgangen i SOD aktivitet når cellene inkuberes med 100% harsk olje, muligens kan høyt nivå av ROS forårsake inaktivering av enzymet.

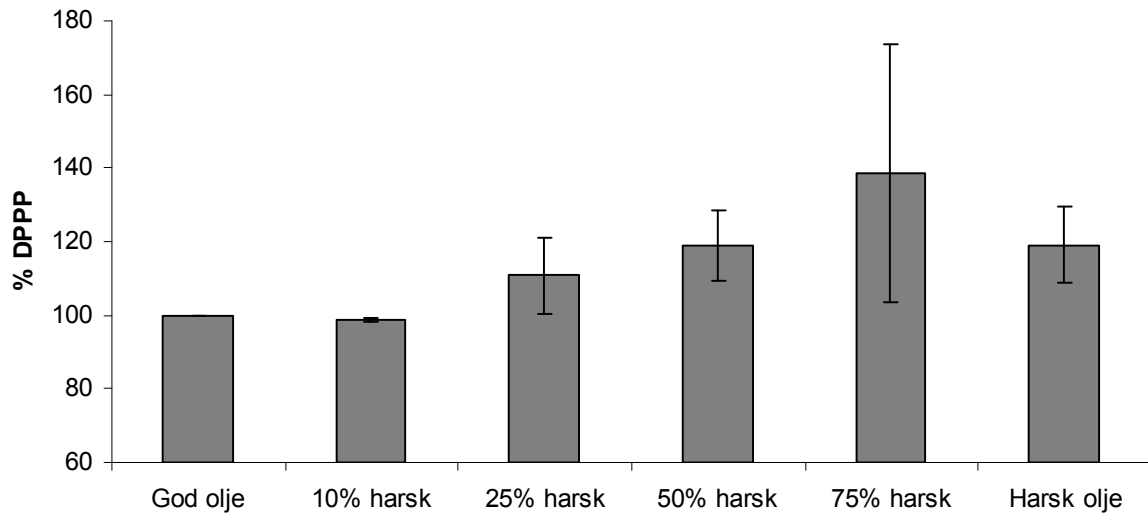


Figur 14 SOD aktivitet i hepatocytter dyrket i olje (0,5 mg/ml) med økende harskningsgrad ved 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.

Figur 15 viser at sekundære oksidasjonsprodukter (MDA) er høyere i 50 % harsk gruppen enn i grupper med lavere harskningsgrad. I motsetning til forventet, så var også MDA verdien lavere i gruppene tilsatt olje med høyest oksidasjonsgrad enn i 50 % gruppen. Årsaken til det lavere nivået i celler med høyest harskningsgrad vites ikke, men det kan være at disse prøvene burde vært fortynnet før analyse og at vi har fått et feilaktig lavt svar. En annen mulig forklaring kan være at de sekundære oksidasjonsproduktene har blitt ytterligere omdannet til andre reaksjonsprodukter som ikke detekteres av denne analysemetoden. Denne studien bør gjentas før det kan trekkes endelig konklusjon. Figur 16 viser oksidasjonsgrad i celler vha DPPP metoden. Også her ser vi økende grad av lipidperoksidering i celler med økende harskninggrad av oljen. Høyest oksidasjonsgrad ser vi i 75 % gruppen, men som vi også observerte for TBARs analysen, så gav DPPP analysen en reduksjon av oksidasjonsgrad i harsk olje gruppen. En mulig forklaring her kan være at de primære oksidasjonsproduktene allerede er omdannet til andre oksidasjonsprodukter.

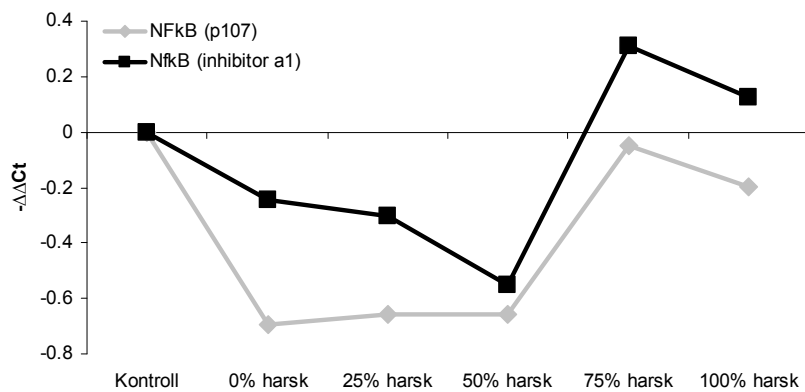
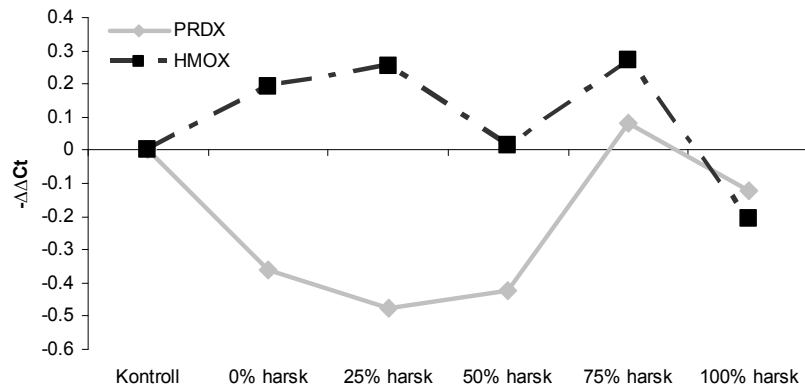
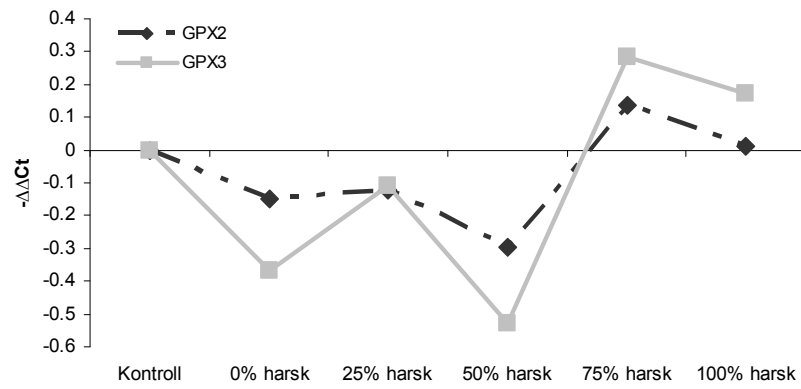
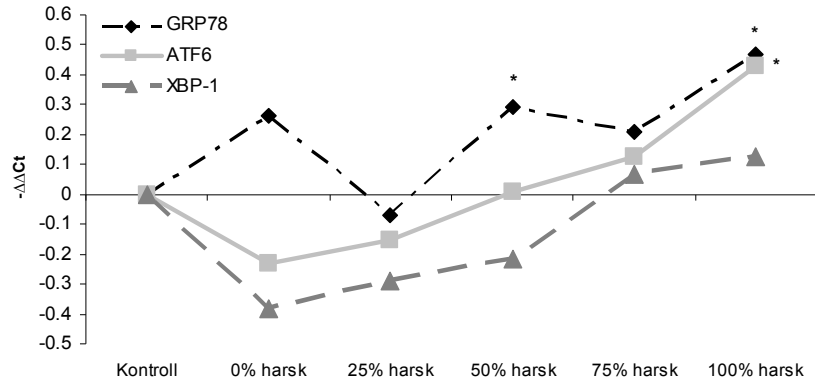


Figur 15 TBARs i hepatocytter dyrket i olje (0,5 mg/ml) med økende harskningsgrad ved 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.



Figur 16 *DPPH oksidasjon i hepatocytter dyrket i olje (0,5 mg/ml) med økende harskningsgrad ved 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.*

Figur 17 viser uttrykk av gener relatert til stress, antioksidanter og inflammasjon i hepatocytter inkubert med en fortynningsrekke av olje med økende harskningsgrad. Figuren viser en økning i uttrykk av stressresponsgenene GRP 78 og ATF 6, en tendens til økning i uttrykk av antioksidantene GPX og den inflammatoriske markøren NF κ B i gruppen tilsatt oljer med høyest harskningsgrad sammenlignet med celler inkubert med oljer med lavere harskningsgrad.



Figur 17 Uttrykk av gener relatert til oksidativt stress og inflammasjon i hepatocytter dyrket i olje (0,5 mg/ml) med økende harskningsgrad ved 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1. GRP78 er en sentral regulator av endoplasmatiske retikulum (ER) homeostase på grunn av at den har flere funksjonelle roller i proteinfolding, ER-kalsiumbinding, og kontrollering av aktiveringen av transmembrane ER-stressensorer. ATF6 er en transmembran transkripsjonsfaktor som aktiverer transkripsjon av ER molekyler. XBP1 er en transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykket av gener som er viktige for riktig funksjon av immunsystemet, og i celle- og ER-stressrespons. GPx2 og GPx3 er glutation peroksidase enzymer som finnes intra- og ekstracellulært. Disse enzymene er antioksidanter som er ansvarlig for det meste av den glutation-avhengige hydrogenperokside-reduserende aktiviteten hos mennesker. Peroxiredoxins (PRDX) er en annen antioksidant med en multifunksjonell thioredoxin-avhengig peroksidase aktivitet. Heme oksygenase (HMOX) er en viktig enzym involvert i heme katabolisme som splitter heme, og danner biliverdin. NF κ B (P107) er en kritisk regulator av tidlig patogen respons. Dette proteinet spiller en viktig rolle i å fremme betennelsesreaksjoner og er viktig i regulering av celle-poliferasjon og celleoverlevelse. NF κ B inhibitor A1 hemmer aktiviteten til NF κ B.

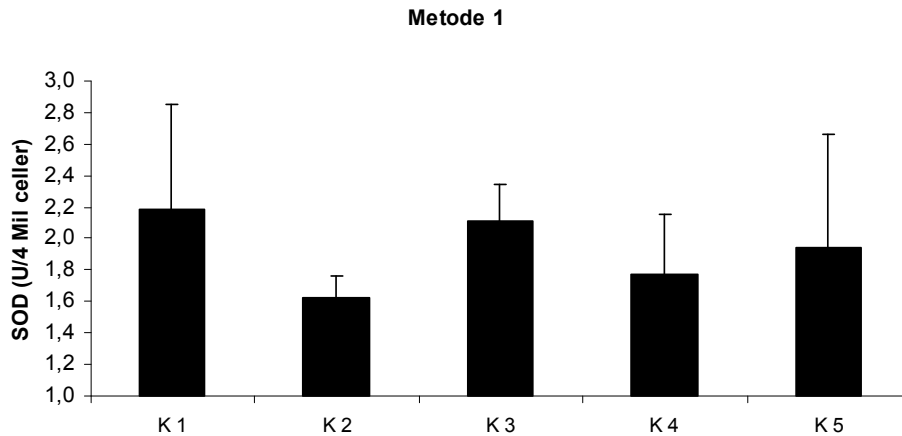
4.3.4 Eksperiment 4 - Kartlegging av respons i celler med ulike oljekilder

Tabell 6 viser PV og AV verdier i 5 ulike olje kvaliteter. Hepatocytter inkuberes med de 5 ulike oljekvalitetene i 48 timer

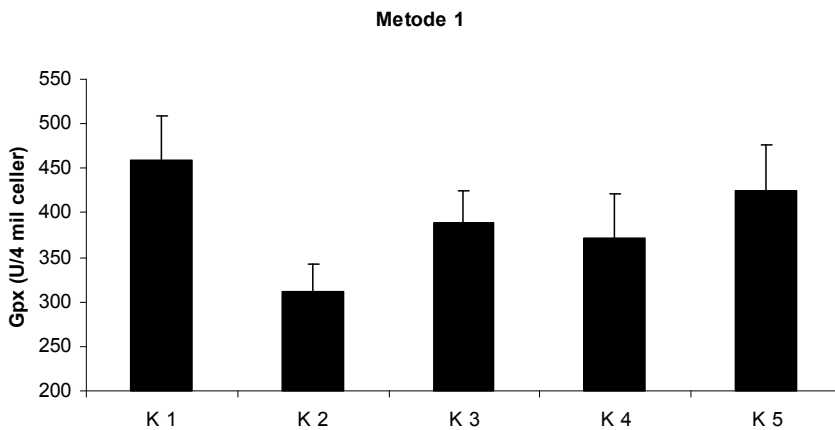
Tabell 6 PV og AV verdier i ulike eksperimentelle oljekilder.

	Peroksidtall (PV)	Anisidintall (AV)
K1	6,4	8,0
K2	9,5	8,0
K3	23,5	11,2
K4	27,9	14,8
K5	37,5	25,6

Figur 18 og figur 19 viser relativt liten variasjon i enzymaktiviteten av de intracellulære antioxidantene SOD og GPX i hepatocytter fra fisk dyrket i medium tilsatt 5 ulike oljekvaliteter. Resultatene viste forøvrig en svak tendens til at hepatocytter inkubert med olje med lav oksidasjonsgrad K1 har høyere enzymaktiviteter av både SOD og GPX enn gruppene K2-K5 som er inkubert med oljer med høyere oksidasjonsgrad. Ulike oljer med ulik oksidasjonsgrad viste for øvrig ikke en like klar sammenheng til enzymaktivitet som en fortynningsrekke av identisk olje med økende oksidasjonsgrad. Dette kan trolig skyldes at ulike oljer inneholder ulike nivå av antioksidanter, vitaminer og mineraler som kan påvirke resultatet.

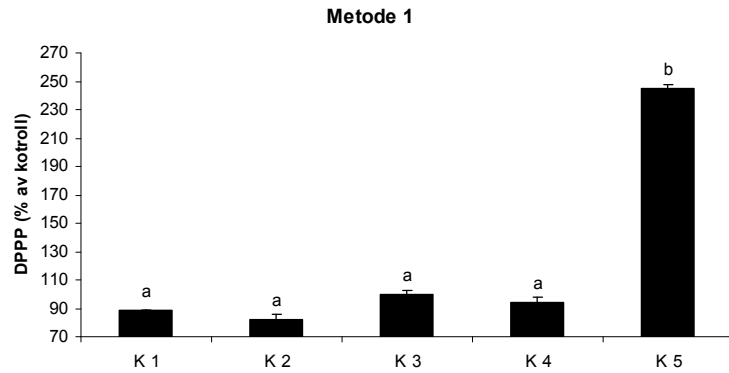


Figur 18 SOD aktivitet i hepatocytter dyrket i 5 ulike oljekvaliteter (0,5 mg/ml) i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.



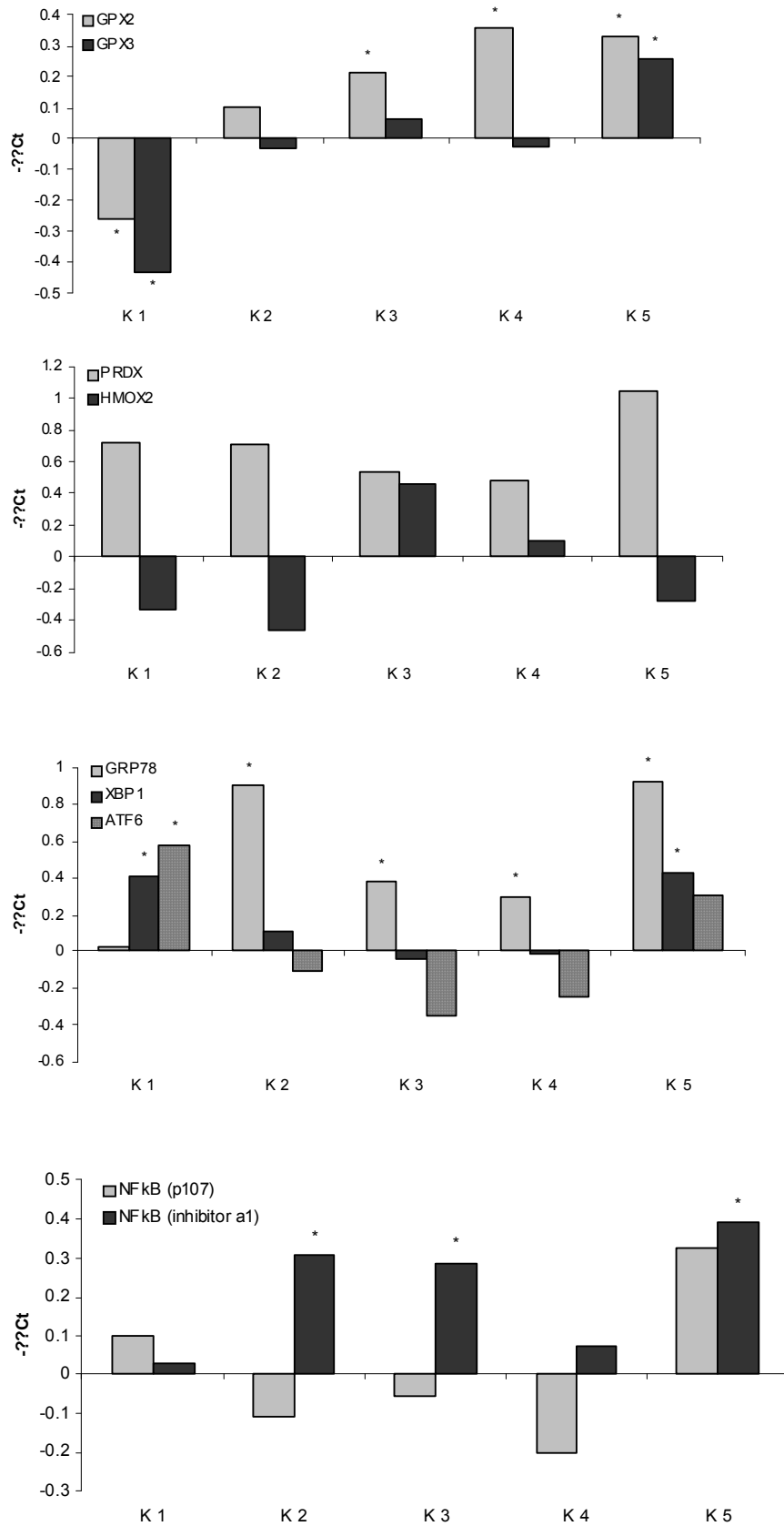
Figur 19 Glutation peroxidase (GPX) aktivitet i hepatocytter dyrket i 5 ulike oljekvaliteter (0,5 mg/ml) i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.

Figur 20 viser en svak tendens til økende oksidasjonsgrad i cellene med økende oksidasjonsgrad av oljene fra K2 til K4. K5 viser en kraftig økt oksidasjonsgrad i cellene sammenlignet med de andre gruppene. K5 er tilsatt i form av etylester, mens de andre oljene er tilsatt i form av triglyserid, noe som kan ha påvirket analyseresultatet. I tillegg inneholder denne gruppen også noe antioksidanter, og vi er usikker på hvorvidt disse antioksidantene kan forstyrre DPPP analysen.



Figur 20 DPPH oksidasjon i hepatocytter dyrket i 5 ulike oljekvaliteter (0,5 mg/ml) i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 1.

Figur 21 viser uttrykk av gener relatert til stress, antioksidanter og inflammasjon i hepatocytter inkubert med 5 ulike oljekvaliteter. Figuren viser en økning i uttrykk av stressresponsgenene GRP 78 og XBP 1, antioksidantene GPX og den inflammatoriske markøren NFκB i gruppene tilsatt oljer med høyest harskningsgrad sammenlignet med celler inkubert med oljer med lavere harskningsgrad.

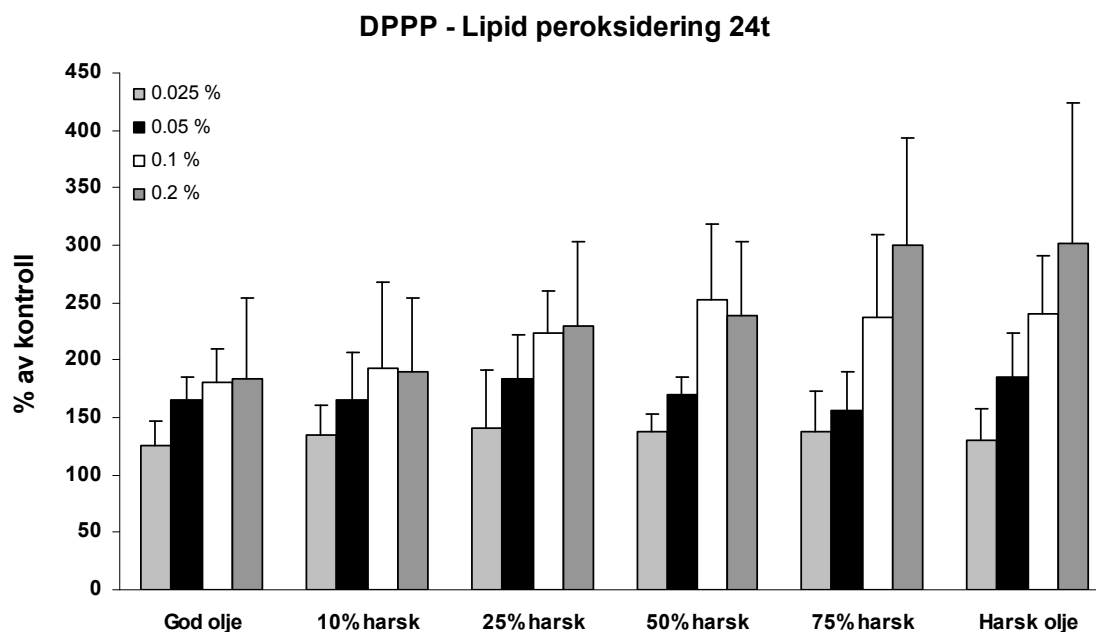


Figur 21 Uttrykk av gener relatert til oksidativt stress og inflammasjon i hepatocytter dyrket i 5 ulike oljekvaliteter (0,5 mg/ml) ved 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter

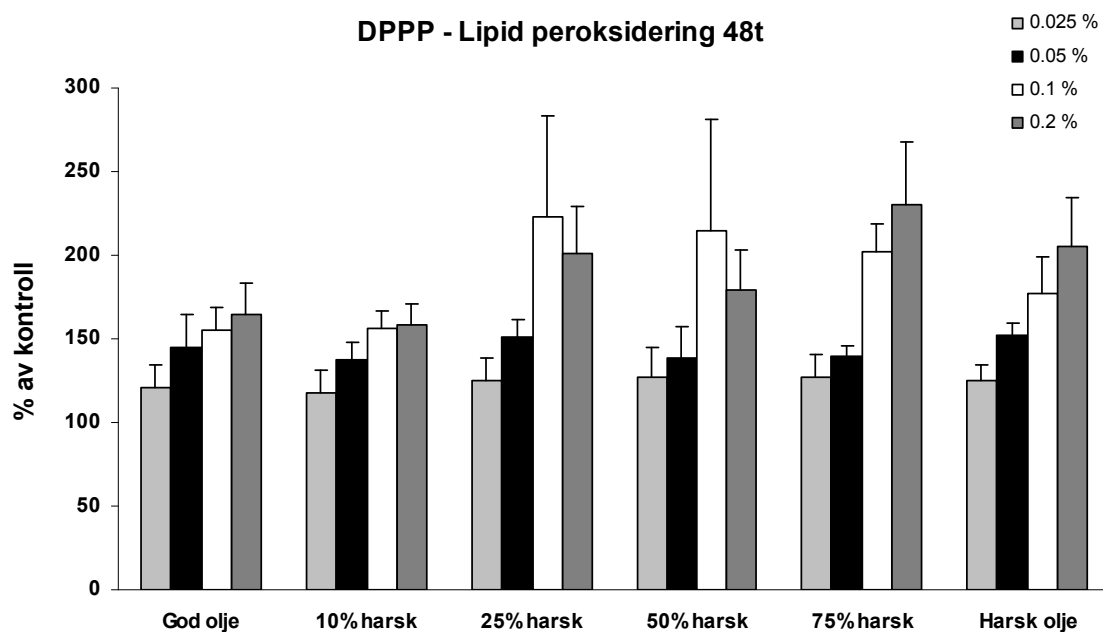
metode 1. Verdien i kontrollceller (celler ikke tilsatt oljer) er satt til 0 og alle andre grupper er beregnet relativt til denne. GRP78 er en sentral regulator av endoplasmatiske retikulum (ER) homeostase på grunn av at den har flere funksjonelle roller i proteinfolding, ER-kalsiumbinding, og kontrollering av aktiveringen av transmembrane ER-stressensorer. ATF6 er en transmembran transkripsjonsfaktor som aktiverer transkripsjon av ER molekyler. XBP1 er en transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykket av gener som er viktige for riktig funksjon av immunsystemet, og i celle- og ER-stressrespons. GPx2 og GPx3 er glutation peroksidase enzymer som finnes intra- og ekstracellulært. Disse enzymene er antioksidanter som er ansvarlig for det meste av den glutation-avhengige hydrogenperokside-reduserende aktiviteten hos mennesker. Peroxiredoxins (PRDX) er en annen antioksidant med en multifunksjonell thioredoxin-avhengig peroksidase aktivitet. Heme oksygenase (HMOX) er en viktig enzym involvert i heme katabolisme som splitter heme, og danner biliverdin. NF κ B (P107) er en kritisk regulator av tidlig patogen respons. Dette proteinet spiller en viktig rolle i å fremme betennelsesreaksjoner og er viktig i regulering av celle-poliferasjon og celleoverlevelse. NF κ B inhibitor A1 hemmer aktiviteten til NF κ B.

4.3.5 Eksperiment 5 - Kartlegging av respons, på ulik harskningsgrad av oljer, i en human Caco-2 cellelinje

Den humane tarmcellelinjen Caco-2 ble benyttet til studier av lipidperoksidering i celler. Konfluente celler ble tilsatt en fortynningsrekke av oljer med økende harskningsgrad (beskrevet i tabell 5). Figur 22 viser at både økt konsentrasjon av de enkelte oljer og også økt harskningsgrad fører til økt grad av lipidperoksidering i humane Caco-2 celler ved 24 timer. Omtrent samme respons ble også observert etter 48 timer (Figur 23), men ved 48 timers-inkubering får vi en form for metning fra og med 25 % harskning.



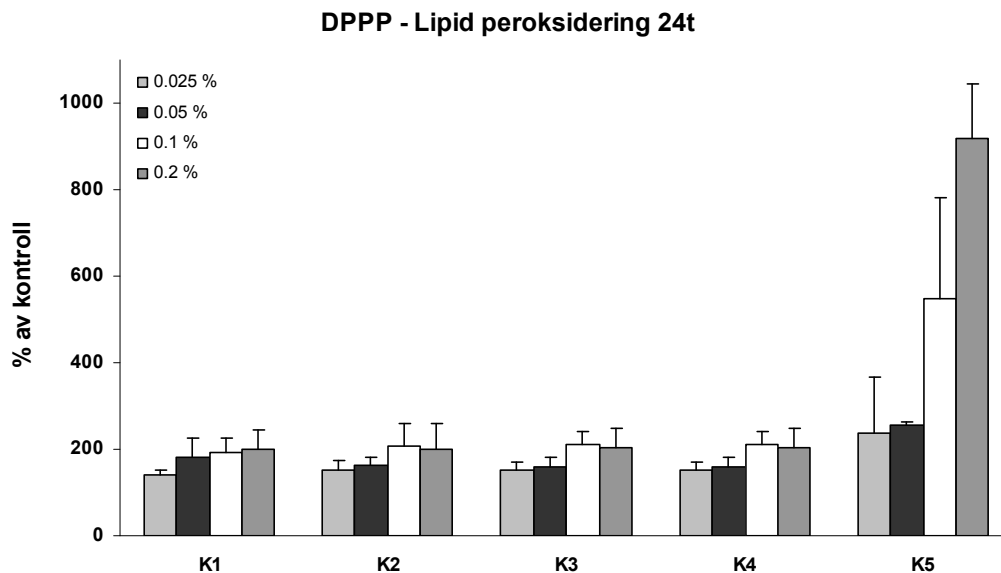
Figur 22 DPPP-Lipidperoksidering i Caco-2 celler dyrket i olje med økende harskningsgrad i 24 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.



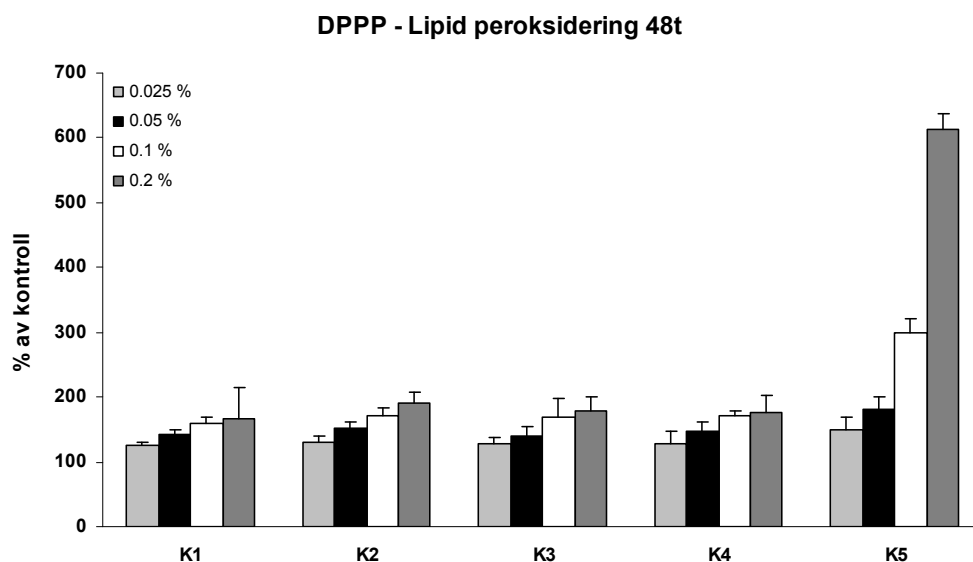
Figur 23 DPPP-Lipidperoksidering i Caco-2 celler dyrket i olje med økende harskningsgrad i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.

Figur 24 og 25 viser oksidasjonsgrad i Caco-2 celler etter inkubasjon med 5 ulike oljekvaliteter (se tabell 6) etter henholdsvis 24 og 48 timer. Olje K5 gir ekstremt mye høyere

lipid peroksidering enn forventet, noe som også ble observert i hepatocytter fra fisk. Dette kan muligens skyldes at denne oljen er en etylester og/eller at den inneholder ulike antioksidanter enn de andre testede oljene. De andre oljekvalitetene viste økt oksidasjonsgrad i cellene med økende harskningsgrad av oljene. Det samme responsmønster kunne observeres både ved 24 timer og 48 timer.



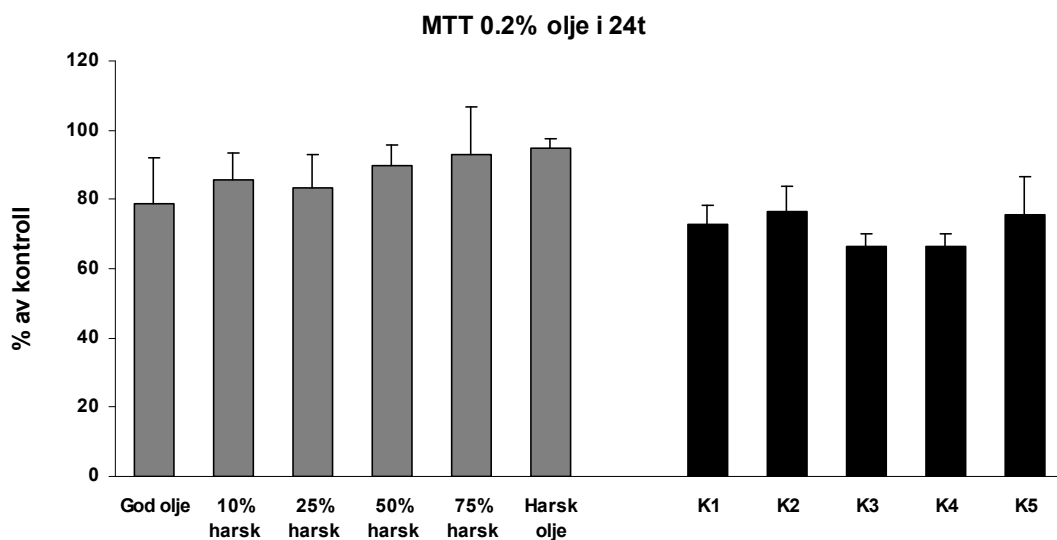
Figur 24 DPPP-Lipidperoksidering i Caco-2 celler dyrket i 5 ulike oljekvaliteter i 24 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.



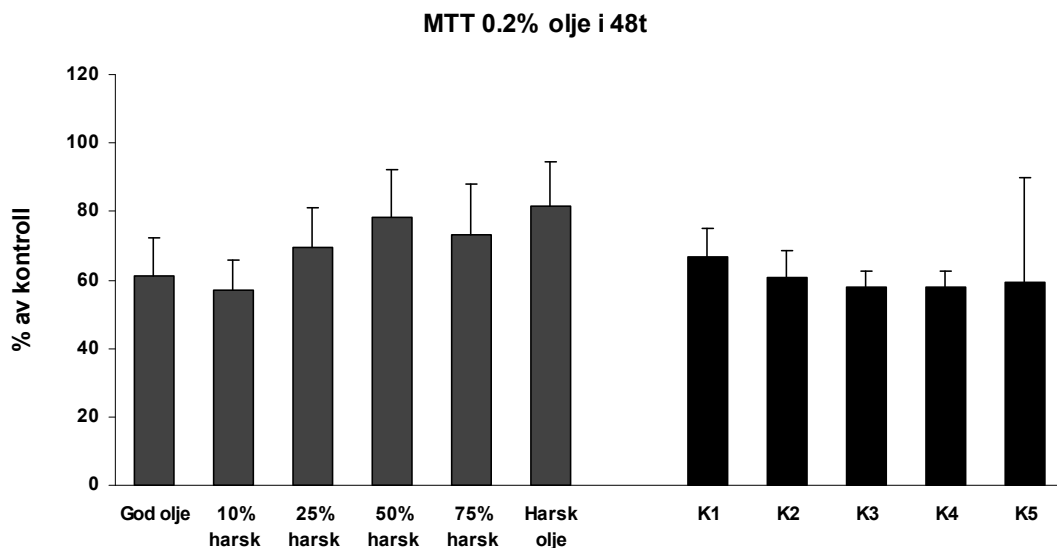
Figur 25 DPPP-Lipidperoksidering i Caco-2 celler dyrket i 5 ulike oljekvaliteter i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.

Eventuell toksisk effekt av fiskeoljer på humane Caco-2 celler sjekkes ved bruk av MTT-assayet (Figur 26). Dette er en kolorimetrisk metode som benytter kapasiteten til å spalte av tetrazolium saltet MTT til purpurfargede krystaller som mål på celledelingskapasitet metabolsk aktive celler. Til denne studien benyttes celler i delingsfasen (i proliferasjon). Dose respons kurven viser at alle oljekvaliteter har en hemmende effekt på celledeling i overensstemmelse med tidligere studier som har vist at omega-3 fettsyrer har en hemmende effekt på kreftceller i tarm (Fukunaga et al., 2008). Resultatene antyder videre at oljer med lav oksidasjonsgrad i større grad har en hemmende effekt på utviklingen av kreftceller enn oljer av dårligere kvalitet (høyere harskningsgrad).

Resultater fra de 5 utvalgte oljekvalitetene stemmer ikke helt overens med resultatene fra dose respons kurven med økende harskningsgrad av samme olje. Det kan stilles spørsmål ved om ulik tilstedeværelse av antioksidanter, fettsyresammensetning og/eller opprinnelsen av oljen forklare forskjellene?



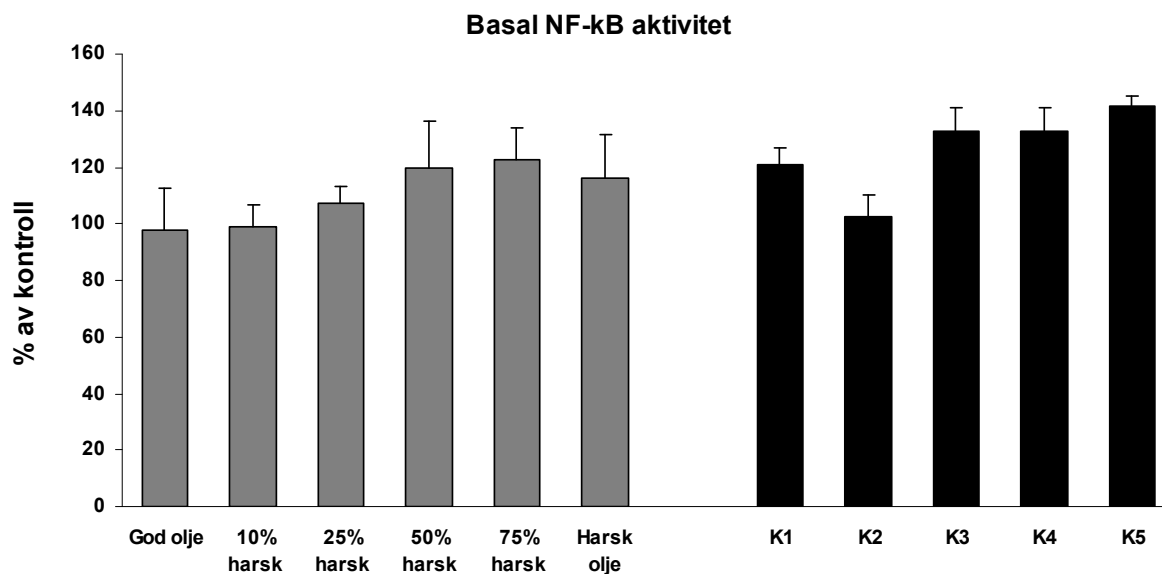
Figur 26 MTT analyse av Caco-2 celler dyrket i enten en fortynningsrekke med økende harskningsgrad av oljen eller med 5 ulike oljekvaliteter i 24 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.



Figur 27 MTT analyse av Caco-2 celler dyrket i enten en fortynningsrekke med økende harskingsgrad av oljen eller med 5 ulike oljekvaliteter i 48 timer. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.

4.3.6 Effekter i human monocytcellerlinje

For å studere effekten av oksiderte oljer på inflammasjonsresponsen benyttes en human monocytcellerlinje som er stabilt transfektert med en NF- κ B-luciferase reporterkonstrukt. Forandringer i aktiviteten til transkripsjonsfaktoren NF- κ B spiller en viktig rolle i cellulære stress, immun- og inflammasjonsrespons (Figur 28). Dose-respons-kurven antyder at økende oksidering gir en svak økning i NF- κ B aktivitet i monocytter. Men denne økningen er såpass svak at den antagelig ikke har noen skadelig effekt. Små økninger i NF- κ B aktiviteten kan tvert imot være gunstig for helsen. Resultatene med de utvalgte oljene gjenspeiler resultatene fra dose respons kurven, ved at de harske oljene gir høyere NF- κ B aktivitet enn de mindre harske oljene. Men verdiene sammensvarer ikke helt.



Figur 28 Basal NF- κ B aktivitet i humane monocyttter dyrket i enten en fortynningsrekke med økende harskingsgrad av oljen eller med 5 ulike oljekvaliteter. Fiskeoljene var tillaget etter metode 2. Resultatene er et sammendrag av 3-5 forsøk.

4.4 Konklusjon, delprosjekt 2: Cellemodeller

4.4.1 Kartlegging av effekter på helsemarkører - celle modellsystemer

Primærceller fra laks og cellelinjer fra menneske har blitt benyttet som modellsystem for å studere effekter av oljekvaliteter/oksidasjonsgrad på helsemarkører.

Innledende forsøk viste at celler i kultur er et nyttig verktøy for å studere effekter av ulike oljekvaliteter på helsemarkører. Forsøkene med primære leverceller fra laks viste at celler dyrket i et medium tilsatt oljer med økende oksidasjonsgrad, viste en økning i enzymaktivitet av den intracellulære antioksidanten SOD ved lav oksidasjonsgrad av oljen, mens høy oksidasjonsgrad førte til reduksjon i enzymaktiviteten til SOD og økning i nivå av sekundære oksidasjonsproduktet (MDA). Økende oksidasjonsgrad av oljer førte også til økt oksidasjon av cellemembran lipider og tendens til tap av membranfosfolipider. Økt oksidasjonsgrad gav økende uttrykk av stressresponsgenene GRP 78 og ATF 6, antioksidanten GPX og den inflammatoriske markøren NF κ B.

Økt konsentrasjon av de enkelte oljer og også økt harskingsgrad førte til økt grad av lipidperoksidering i humane Caco-2 celler (kreftcellelinje). Foreløpige resultater antyder at alle oljekvaliteter som ble testet hadde en hemmende effekt på celledelingen, men gode oljer med lav oksidasjonsgrad hadde en større hemmende effekt på celledelingen enn oljer med høy oksidasjonsgrad.

For å studere effekten av oksiderte oljer på inflammasjonsresponsen ble det benyttet en human monocyttecellelinje som er stabilt transfektert med en NF- κ B-luciferase reporterkonstrukt. Dose-respons kurven antyder at økende oksidasjonsgrad gir en svak

økning i NF- κ B aktivitet i monocytter. Men denne økningen er såpass svak at den antagelig ikke har noen skadelig effekt.

Resultatene viste også at responsen i celler til en stor grad er avhengig av hvorledes oljesubstratene presenteres for cellene og hvorledes de er behandlet forut for forsøkene.

4.5 Referanser delprosjekt 2: Cellemodeller

- Aura, A. M.; Harkonen, H.; Fabritius, M.; Poutanen, K., Development of an in vitro enzymic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *Journal of Cereal Science* 1999, 29, (2), 139-152.
- Berridge M. V. and Tan A. S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 474-482.
- Blomhoff R. (2004). Antioksydanter og oksydativt stress. *Tidsskrift for den norske legeforening*: 124: 1643-5.
- Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola JD, Morrow IA (1994). Detection of endogenous malonaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265, 1580-1582.
- Dannevig BH, Berg T (1985) Endocytosis of galactose-terminated glycoproteins by isolated liver cells of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B* 82:683–688.
- Estebauer H, Gebicki H, Puhl G, Jurgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13, 341-390.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fukunaga K. Hossain, Z and Takahashi K (2008) *Nutr. Res.* 28 (9) 635-40.
- Hoshi, M., Williams, M., Kishimoto, Y., (1973). Esterification of fatty acids at room temperature by chloroform methanolic HCl cupric acetate. *J. Lipid Res.* 14, 599–601
- Kjaer, M.A., Todorčević, M., Torstensen, B.E., Vegusdal, A., Ruyter, B., 2008. Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon. *Lipids* 43, 813–827.
- Novotny MV, Yancey MF, Stuart R, Wiesler D, Peterson RG (1994). Inhibition of glycolytic enzymes by endogenous aldehydes: a possible relation to diabetic neuropathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1226, 145-150.

- Ostbye, T.K., Kjaer, M.A., Rora, A.M.B., Torstensen, B., Ruyter, B., 2009. High n-3 HUFA levels in the diet of Atlantic salmon affect muscle and mitochondrial membrane lipids and their susceptibility to oxidative stress. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/j.13652095.2009.00721.x-
- Paglia, D.E. and W.N. Valentine (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab Clin. Med.*, 70: 158-169.
- Staff AC, Halvorsen B (2003). Isoprostaner – nye markører for oksidativt stress. *Tidsskr Nor Lægeforen* nr. 3, 123: 315-318.
- Todorčević, M., Škugor, S., Ruyter, M. (2010). Alterations in oxidative stress status modulate terminal differentiation in Atlantic salmon adipocytes cultivated in media rich in n-3 fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 156 (2010) 309–318
- Todorčević, M., Skugor, S., Krasnov, A., Ruyter, B., 2010. Gene expression profiles in Atlantic salmon adipose-derived stromo-vascular fraction during differentiation into adipocytes. *BMC Genomics* 11:39.
- Turner, R, McLean, C.H. and Silvers, K.M. 2006). “Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation?” *Nutrition Research Reviews*, 19, 53-62.
- Yoritaka A, hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadman ER, Mizuno Y (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2696-2701.

5 Felles oppsummering delprosjekt 1 og 2

Det er vel kjent at omega-3-oljer fører til positive helseeffekter i mennesker. Omega-3-fettsyrer er viktig for normal utvikling av nyfødtes nervesystem og netthinne. I voksne er det vist at omega-3-fettsyrer er med på å redusere risikofaktorer assosiert med hjerte- og karsykdommer. Andre områder hvor omega-3-fettsyrer gir fordeler er kontroll av kronisk betennelse, forebygging av kreft og psykisk helse. Det er imidlertid en økende bekymring for at økt oksidasjonsgrad av oljer rike på omega-3 fettsyrer kan redusere de positive helseeffektene. Dokumentasjon relatert til både positive og negative effekter er derfor etterspurt. For å kunne benytte ferskhet, eller grad av oksidering til å differensiere mellom kommersielle oljer, er man avhengig av at det finnes en godt dokumentert og verifiserbar sammenheng mellom positive helseeffekter og lav oksidasjonsgrad.

Ett mål i dette Rubin-prosjektet har vært å øke kunnskapen om spredningen i oljekvaliteter/oksidasjonsgrad av omega-3-oljer som i dag er tilgjengelig i helsekost- og dagligvarebutikker, og videre å dokumentere hvorvidt kvalitet/oksidasjonsgrad av omega-3-oljer påvirker utvalgte helsemarkører i cellemodellsystemer. Analyser av harskningsgrad av 113 ulike kommersielle omega-3-produkter kjøpt fra dagligvarebutikker og helsekostbutikker viste at bare noen få av produktene tilfredsstilte kvalitetskravene (GOED).

Våre undersøkelser viste videre at kvalitet/oksidasjonsgrad av omega-3-oljene påvirket uttrykk av utvalgte helsemarkører som enzymaktivitet av intracellulære antioksidanter, celledeling og inflammatoriske markører. Videre studier er nødvendig for å verifisere om resultatene fra modellsystemene gjelder for mennesker generelt.

