

PUBLICATIE VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8310

Veiligheid van oliën en vetten

Januari 2011

SAMENVATTING

Ondanks het feit dat plantaardige vetstoffen rijk aan poly-onverzadigde vetzuren (*Poly Unsaturated Fatty Acids* - PUFA's) nutritionele voordelen inhouden, toch kan het verbruik ervan gezondheidsrisico's veroorzaken doordat ze door oxidatie kunnen ontaarden.

De oorzaken ervan kunnen talrijk en variabel zijn. Ze werden in deze publicatie onderzocht benevens de types oxidatieproducten en dat in het licht van wat er over hun toxiciteit bij de mens bekend is.

Ondanks de evolutie van de kennis in dit domein, blijven veel gegevens partieel of zelfs onbestaande, in het bijzonder betreffende de inname van geoxideerde producten via de voeding. Het is dus vrijwel onmogelijk om de risico's op grond van de huidige beschikbare gegevens grondig te beoordelen.

Het naleven van de voedingsaanbevelingen om de verhouding tussen de oliën rijk aan poly-onverzadigde omega-3- en omega-6-vetzuren en de andere verbruikte vetproducten te verhogen, impliceert een grotere waakzaamheid betreffende de wijze van fabriceren, bewaren en toepassen van de verschillende producten.

Er werden zowel voor de industrie, de overheid, de horeca als voor de verbruiker aanbevelingen geformuleerd.

In functie van de huidige kennis inzake de mogelijke risico's werden er prioriteiten vastgelegd. De belangrijkste betreft 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), de eventuele aanwezigheid daarvan in baby- en kindervoeding en zijn gezondheidseffecten.

INHOUDSTAFEL

1.	INLEIDING EN VRAAGSTELLING.....	5
2.	UITWERKING EN ARGUMENTATIE	5
2.1	Methodologie	5
2.2	Uitwerking	6
2.2.1	Factoren die de oxidatie van vetstoffen beïnvloeden	6
2.2.2	De inname van poly-onverzadigde vetzuren	8
2.2.3	Oxidatie bij verwerking, opslag en toepassing.....	10
2.2.4	Literatuurstudie rond de identiteit van vetoxidatieproducten.....	17
2.2.5	Metabolisme van de vetten	33
2.2.6	Literatuurstudie rond de toxiciteit van vetoxidatieproducten	38
2.2.7	Risicobeoordeling	43
3.	CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	48
4.	REFERENTIES	52
5.	BIJLAGE	57
6.	SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP	57

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

ACAT: acylCoA acyltransferase
ALARA: *as low as reasonably achievable*
AP-1: *activator protein 1*
ATP: adenosine-5'-trifosfaat
BMDL: *benchmark dosis lower confidence limit*
Cu: koper
DHA: docosahexaëenzuur
DNA: desoxyribonucleïnezuur
DPA: acide docosapentaëenzuur
EFSA: *European Food Safety Authority*
EPA: eicosapentaëenzuur
FAT: *fatty acid transferase*
FATP: *fatty-acid transport protein*
FABPpm: *plasma membrane fatty acid binding protein*
GC: gaschromatografie
GSH: glutathion
HDL : *high density lipoprotein*
HGR: Hoge Gezondheidsraad
4-HNE : 4-hydroxy-2-nonenal
IARC: *International Agency for Cancer Research*
IDL: *intermediate density lipoprotein*
ip : intraperitoneaal
JNK1,2: *c-Jun NH2-terminal kinases 1 and 2*
Ig: lichaamsgewicht
LDL : *low density lipoprotein*
LPL: *lipoprotein lipase*
LRP: *LDLreceptor related protein*
MDA: malondialdehyde
M1G: pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one
MOE: *margin of exposure*
NADH: nicotinamide adenine dinucleotide
NF-kB: *nuclear factor-kappaB*

NOAEL: *no observed adverse effect level*

PGC-1a: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*

PL: fosfolipiden

PPARa : *peroxisome proliferator activated receptor alpha*

PPARg: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PUFA: *poly unsaturated fatty acids* / meervoudig onverzadigde vetzuren

PV: *peroxyde value*

TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances*

TG : triglyceriden

TPM: totaal polair materiaal

VLDL : *very low density lipoprotein*

WGO / WHO: Wereldgezondheidsorganisatie / *World Health Organization*

1. INLEIDING EN VRAAGSTELLING

De voedingsaanbevelingen¹ voor vetten beogen een hoger verbruik van producten rijk aan poly-onverzadigde vetzuren ten koste van verzadigde producten. Het is echter welbekend dat de oxidatierisico's van oliën en vetten niet alleen samenhangen met hun graad van onverzadigheid maar ook met heel wat andere factoren.

De HGR heeft derhalve uit eigen beweging een project opgestart om na te gaan of het oxidatief bederf van vetten verrijkt met poly-onverzadigde vetzuren gezondheidsrisico's voor de verbruiker met zich meebrengt en welke maatregelen er genomen kunnen worden om die in te perken en onder controle te houden. Om dit project uit te voeren werd een ad-hocwerkgroep "Veiligheid van oliën en vetten" opgericht bestaande uit deskundigen in de volgende disciplines: levensmiddelenchemie, kwaliteit en veiligheid van levensmiddelen, voedingstechnologie, toxicologie, bromatologie en voeding.

2. UITWERKING EN ARGUMENTATIE

2.1 Methodologie

Op basis van gegevens afkomstig van de wetenschappelijke literatuur (de literatuurreview gebeurde via raadpleging van de databank *Web of Science* alsmede van referentiewerken), voedselenquêtes en adviezen van deskundigen die het hele onderzochte domein bestrijken, werden de werkzaamheden gericht op het opstellen van een samenvatting van de kennis aangaande:

- de belangrijkste factoren die de oxidatie van vetstoffen beïnvloeden;
- een inschatting van de inname van poly-onverzadigde vetzuren door de Belgische bevolking en van de belangrijkste betrokken producte;
- de effecten van de behandeling van de vetstoffen, hun opslag en hun toepassing op de oxidatierisico's;
- de types oxidatieproducten;
- het metabolisme van vetstoffen;
- de toxiciteit van de oxidatieproducten zoals vermeld in de literatuur.

Met al de verzamelde gegevens konden de specifieke risico's m.b.t. vier moleculen ingeschat worden. Deze benaderingswijze heeft geleid tot actieprioriteiten en aanbevelingen zowel voor de industrie als voor de overheid, de horeca en de verbruiker.

¹ Nadere informatie rond dit onderwerp kan teruggevonden worden in hoofdstuk 5 (Aanbevelingen rond vetten) van de publicatie van de HGR Nr. 8309 "Voedingsaanbevelingen voor België – Herziening 2009".

2.2 Uitwerking

2.2.1 Factoren die de oxidatie van vetstoffen beïnvloeden

Het bederf van oliën en vetten is een complex verschijnsel naargelang het type vetstof, de voorgeschiedenis ervan, de ondergane technologische bewerkingen maar ook de bewaaromstandigheden (aanwezigheid van lucht, licht, katalysatoren, antioxidantia, enz..) en de wijze van toepassing (smelten, bakken, frituren).

Het bederf van vetstoffen geschiedt op twee belangrijke vaak onderling gekoppelde wijzen:

- de hydrolytische afbraak;
- de thermische en oxidatieve afbraak (radicalair mechanisme van auto-oxidatie waarvan de snelheid functie is van de temperatuur).

De eerste wijze leidt tot het vrijkomen van vrije vetzuren vanuit triglyceriden. Die vetzuren zijn gevoeliger voor oxidatie dan de triglyceriden. Op zichzelf houden ze geen hoge toxiciteitsrisico's in. De hydrolytische afbraak is met name te wijten aan triacylglycerolhydrolasen (EC 3.1.1.3), aanwezig in voedingsmiddelen en de micro-organismen die ze kunnen besmetten. Lipolyse van vetstoffen leidt tot de vorming van vrije vetzuren (en van mono- en diglyceriden), waarvan het vrijkomen aan de basis van organoleptische wijzigingen ligt.

Als hun gehalte sterk toeneemt, zou het product wat smaak en geur betreft niet meer voor consumptie geschikt zijn.

De oxidatiesnelheid van vetzuren neemt aanzienlijk toe met hun graad van onverzadigdheid in de respectievelijke verhoudingen 1-100-1200-2500 voor de C18:0, C18:1, C18:2, C18:3.

De graad van onverzadigdheid van de vetzuren is dus een belangrijk kenmerk voor het oxidatierisico. In de voedingsmiddelen bevindt de overgrote meerderheid van de vetzuren zich in de triglyceriden en komen ze niet in vrije vorm voor. Minder verzadigde producten oxideren echter soms sneller dan andere, die meer verzadigd zijn, aangezien hier andere factoren meespelen. De triglyceriden zijn eveneens gevoelig voor oxidatie en de positie van de vetzuren op de glycerol zou de auto-oxidatiesnelheid beïnvloeden. De onverzadigde acylen in positie sn1 en sn3 zouden gevoeliger zijn dan diegene die op sn2 veresterd zijn. Bij afwezigheid (of bij aanwezigheid van lage concentraties) van pro-oxidantia, is de oxidatieve afbraak pas waarneembaar na een inductietijd die afhankelijk is van de aard van de vetten en de omgevingsomstandigheden. Factoren die de oxidatieve verschijnselen beïnvloeden, zijn deze die de vorming van vrije radicalen in de hand werken. De afbraak van (meervoudig) onverzadigde vetzuren is een autokatalytisch proces van ontbinding van hydroperoxiden die vooraf tijdens initiatiereacties gevormd werden. Hun ontbinding wordt vergemakkelijkt door sporen metaalkationen (Cu^{2+} , Fe^{2+} , enz..) of organometaalverbindingen (heemkern afkomstig van dierlijke producten, ...).

In de voedingsmiddelen bestaat het vet hoofdzakelijk uit triglyceriden en dus uit vetzuren. Nochtans kunnen ook andere lipideverbindingen oxidatie ondergaan. Zo kan er een bijzondere aandacht aan sterolen gewijd worden. Een kleine fractie van de cholesterol kan auto-oxidatiereacties ondergaan die leiden tot de vorming van oxycholesterolen in verschillende producten (zuivelproducten, eierproducten zoals koekjes, keukenbereidingen, enz.). De mechanismen zijn verwant met die welke de onverzadigde vetzuren ondergaan.

Onder de gevormde producten zouden sommige oxysterolen, naast hun normale fysiologische rol, omwille van hun biologische effecten (cytotoxiciteit, mutagene of carcinogene werking) een nadelige invloed op de gezondheid kunnen uitoefenen.

Fytosterolen kunnen eveneens dezelfde afbraak ondergaan.

De vetoxidatie kan ook voortvloeien uit de aanwezigheid van enzymen in de grondstof. Zo is de enzymatische oxidatie van vetstoffen met een 1-cis, 4-cis-pentadieenstructuur gekoppeld aan de aanwezigheid van lipoxygenase (*linoleic acid oxygen oxidoreductase* EC. 1.13.11.12), dat men zowel in planten (oxidatie van linolzuur en linoleenzuur) als bij dieren (afbraak van arachidonzuur) aantreft. De reacties leiden tot de snelle vorming van mengsels in verschillende verhoudingen van 13- en 9-hydroperoxiden naar gelang de oorsprong van de lipoxygenasen (het betrokken type isoënzym).

In de verdere enzymafbraak van de hydroperoxiden komt het hydroperoxide lyase tussen en worden typische moleculen met bijzondere aroma's gevormd (de aldehyden met een groene "geur" bij planten of nog het 1-octeen-3-ol bij paddenstoelen).

Onverzadigde vetten kunnen nog een foto-oxidatieve afbraak ondergaan door de vorming van (zeer reactieve) singlet zuurstof vanuit (stabiele) triplet zuurstof door de aanwezigheid van "sensibiliserende" moleculen zoals het chlorofyl van de plantaardige producten. In tegenstelling daarmee wordt de vorming van singlet zuurstof tegengegaan door de tussenkomst van carotenoïden (waaronder β -caroteen, element van de onverzeepbare fractie van talrijke oliën) welke erkend zijn als factor die de bescherming van de producten rijk aan meervoudig onverzadigde vetzuren in de hand werken.

Zo gaat de aanwezigheid van natuurlijke of toegevoegde antioxidantia het gevaar tegen dat er geoxideerde producten worden gevormd. De rol van de tocoferolen (vitamine E), een natuurlijk antioxidant waarvan er verschillende isomeren bestaan, moet op dit niveau in het licht gesteld worden. De lipide "peroxi-"radicalen (ROO•) reageren immers snel met de hydroxylgroepen (fenolische OH) van de antioxidantia tot door resonantie gestabiliseerde structuren die zo de oxidatieve afbraak onderbreken. Boven een optimale concentratie kan bijvoorbeeld α -tocoferol echter ook de auto-oxidatie van onverzadigde vetzuren initiëren. De peroxidatiesnelheid van deze laatste neemt toe met het tocoferolgehalte, na overgang door een minimum waarde. Om structureredenen is dit verschijnsel voor de γ -isomeer veel minder uitgesproken.

Twee identieke producten kunnen aldus verschillende vormen van oxidatieve afbraak ondergaan, omdat ze niet op dezelfde wijze bewaard werden. Hun mogelijk contact met zuurstof (vooral lucht), licht, bepaalde materialen alsmede tijd en temperatuur moeten in acht worden genomen.

Diezelfde factoren spelen een rol tijdens de fabricageprocessen en de fabrikanten moeten er rekening mee houden. De verbruiker moet zich ook bewust zijn van de degradatierisico's die hij zelf kan teweegbrengen door een ongeschikte/verkeerde wijze van bewaren en gebruik.

De "voorgeschiedenis" van de vetstoffen, hun omgeving, wat er van productie tot verbruik mee gebeurt, heeft gevolgen voor de oxidatierisico's en het type oxidatieve afbraak.

Bron : Belitz et al., 2005

2.2.2 De inname van poly-onverzadigde vetzuren

Gelet op het oxidatierisico van poly-onverzadigde vetzuren (*Poly Unsaturated Fatty Acids* - PUFA's), stelt zich ook de vraag via welke voedingsmiddelen de mensen die vetzuren vooral innemen.

De Belgische voedingsmiddelentabel bevat heel wat gegevens over de gehaltes aan poly-onverzadigde vetzuren in voedingsmiddelen. Maar deze moeten gecombineerd worden met voedselconsumptiegegevens om de meest relevante voedingsmiddelen te kennen.

Hieromtrent zijn drie recente studies in België relevant.

Ten eerste is er de Voedselconsumptiepeiling van 2004 bij de Belgische bevolking ouder dan 15 jaar (Debacker et al., 2007). De vetgroep is de voornaamste innamebron van PUFA's, met 32% van de inname (margarine betekent 23% van de inname en plantaardige olie slechts 4%). De tweede belangrijkste groep is de groep "sauzen/kruiden/specerijen" met 22% van de PUFA- inname (mayonaise zorgt voor 20% van de inname en verklaart het belang van de groep sauzen/kruiden/specerijen). Vlees en vleesproducten betekenen 13% van de inname. De vierde belangrijkste groep is de groep "granen en graanproducten" op 12% van de PUFA- inname (brood betekent 9%). De top vijf wordt afgesloten met cakes/koekjes/gebak/pudding. Vis wordt niet genoemd in de top vijf en er worden geen verdere details gegeven.

Ten tweede is er de Vlaamse kleuterstudie van 2002-2003 (Huybrechts, 2008). Deze studie bevat de top 10 van innamebronnen van poly-onverzadigde vetzuren voor kleuters. Op één komt de groep boter/margarine dus voornamelijk margarine (19,8% van de PUFA- inname), gevolgd door chocopasta (9,8%), zoete snacks zoals koekjes (9,4%), brood en dergelijke (8,3%), zoute sauzen (6,8%), vlees en vleesproducten (6,6%), charcuterie (6,4%), frieten/kroketten (4,4%), vis en visserijproducten (2,9%) en gevogelte (2,7%).

Meer details over individuele PUFA's zijn beschikbaar (Sioen et al., 2007). Er is een groot verschil tussen de bijdragen van voedselgroepen voor de inname van de verschillende individuele poly-onverzadigde vetzuren. Vette vis was het belangrijkste voor de inname van EPA, DPA en DHA, maar de inname was zeer laag. Vlees- en vleesproducten waren de belangrijkste bron van arachidonzuur. Margarine, brood, koekjes en chocoladeproducten waren het belangrijkste voor de inname van linolzuur.

Ten derde is er de voedselconsumptiestudie bij vrouwen van 18 tot 39 jaar in 2002, die later gebruikt werd om specifiek te kijken naar de inname van individuele onverzadigde vetzuren (Sioen et al., 2006). De inname van ω -6 PUFA komt uit margarines (15,6%), brood (12,8%), vette sauzen (11,2%), vlees (8,5%), snacks (6,8%), noten en zaden (6,6%), aardappelen (5,5%), chocoladeproducten (5,4%), enz.

De inname van ω -3 PUFA komt uit vette sauzen (21,6%), margarines (15,3%), brood (8,5%), vlees (7,6%), enz.

Het totaal van zoete producten overtreft ook wel de 5% (koekjes, desserts, chocoladeproducten, ...).

Voedselgroepen die minder dan 5% bijdragen, werden hier niet opgenoemd.

Op basis hiervan kunnen enkele relevante voedingsmiddelen uit de Belgische voedingsmiddelentabel NUBEL² geciteerd worden, met hun percentage aan polyonverzadigde vetzuren (NUBEL, 2004). Margarineachtige producten om te smeren bevatten veel PUFA's. Hun gehalte varieert echter van 8 tot 26% (vergelijk: boter bevat 3,4% PUFA's). Margarines met omega-3 zijn niet rijker aan PUFA's. Frituurolie is veel rijker aan PUFA's (24-56%) dan frituurvet (8%). Mayonaise bevat 46,9% PUFA's. Chocopasta met noten bevat 16,0%, een droog koekje 2,6%, een Luikse wafel 3,6%, bruin brood 1,4% en wit brood 1,1%. Vleessalade bevat 10,3% PUFA's, wat natuurlijk niet allemaal van het vlees afkomstig is. Varkensvlees en afgeleide producten bevatten meer PUFA's dan rundvlees of gevogelte. Gemengd gehakt rund- varken bevat 2,0% PUFA's, terwijl varkensgehakt 2,9% en rundgehakt 0,3% PUFA's bevat. Salami bevat 3,8% PUFA's en hespenworst 3,9%. Mager spek bevat toch 6,4% PUFA's. Een walnoot bevat 43,6% PUFA's. Aardappelchips bevat 9,0% PUFA's en bereide aardappelkroketten 7,6%.

² De v.z.w. NUBEL (Nutriënten België) heeft tot doel het samenstellen, beheren en het op peil houden van de Belgische voedingsmiddelentabel (www.nubel.com).

2.2.3 Oxidatie bij verwerking, opslag en toepassing

2.2.3.1. Inleiding

Gedurende de verwerking van vetten uit grondstoffen tot op het stadium van het levensmiddel en gedurende de opslag, bewaring en gebruik kunnen oxidatieverschijnselen plaats grijpen.

De vorm waaronder vetten aanwezig zijn is hierbij belangrijk: als vrij vet, als weefselvet of opgesloten in een weefselstructuur en als vet in een disperse fase.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat oxidatie ook kan voorkomen in levensmiddelen met een laag vetgehalte. Ook polaire lipiden, zoals fosfolipiden, vetoplosbare vitaminen en kleurstoffen, zoals β -caroteen, lycopene en xantofiel, zijn aan oxidatie onderhevig.

Naast de chemische oxidatie kan, in niet verhitte levensmiddelen, de oorzaak van oxidatie ook enzymatisch zijn door lipoxigenase activiteit. Voorbeelden hiervan zijn oxidatie bij granen en peulvruchten als soja.

2.2.3.2. Oxidatie bij bewaring van vetten, oliën en vethoudende levensmiddelen

Een ganse reeks factoren beïnvloedt de oxidatie bij bewaring, zowel de auto-oxidatie als de foto-oxidatie. Belangrijk zijn de vetzuursamenstelling, de temperatuur en duur van opslag, de toegankelijkheid voor zuurstof, de lichtinvloed, de voorafgaande processing en de aanwezige metalen (Frankel, 2005). Verpakking speelt een belangrijke rol door bescherming tegen licht en zuurstof.

De auto-oxidatie wordt verder versneld door de aanwezigheid van vrije vetzuren, mono- en diglyceriden en thermische oxidatieproducten. Bij afwezigheid van licht wordt de auto-oxidatie afgeremd door sommige fenolverbindingen. Carotenen, tocoferolen en fosfolipiden kunnen zowel een pro-oxidatieve als een antioxidatieve werking vertonen.

Bij foto-oxidatie versnelt chlorofyl de oxidatie, terwijl carotenen en tocoferolen de reactie afremmen (Choe & Min, 2006).

Oxidatie grijpt niet enkel onverzadigde vetzuren aan, maar ook de vetbegeleidingsstoffen zoals vitamine E en andere tocoferolen, tocotrienolen, β -caroteen, sterolen en antioxidanten. Verder zijn ook interacties bekend tussen oxiderende lipiden en DNA (McClements & Dekker, 2008; Frankel, 2005).

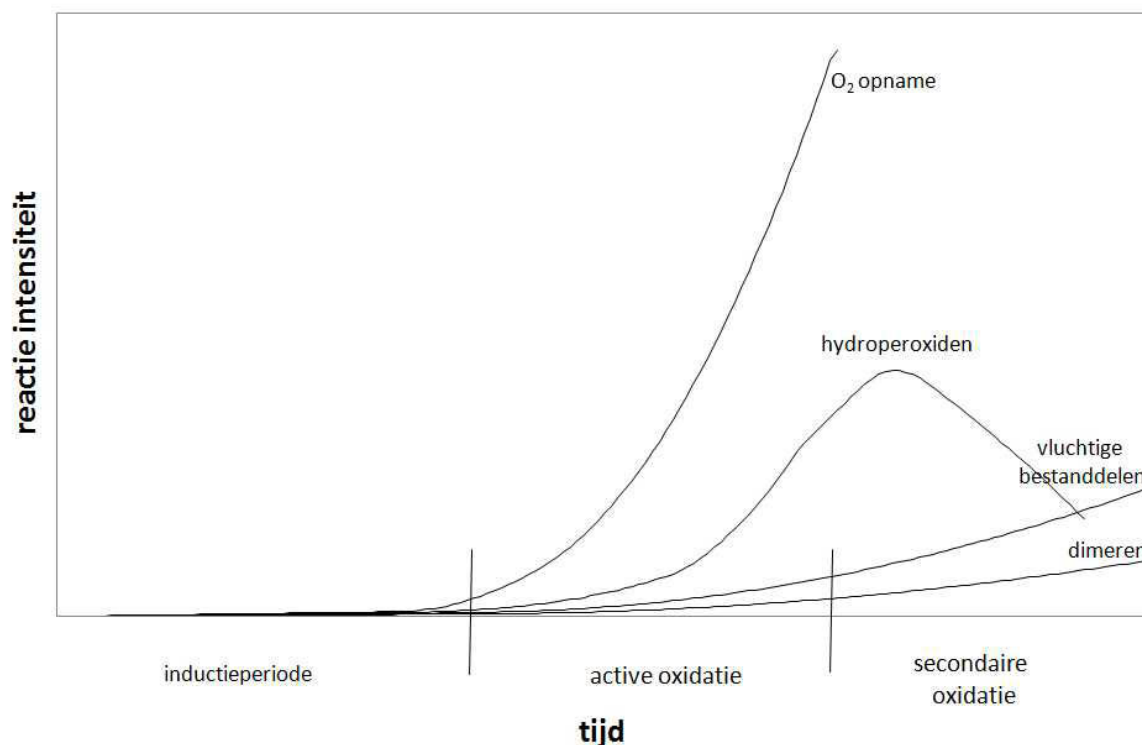
Bij verwerkte levensmiddelen kunnen antioxidantia toegevoegd worden om de reactie af te remmen. Veelal betreft het fenolderivaten, die in mengsel gebruikt worden omwille van hun synergistisch effect. Doorgaans is ook een chelaatvormer, zoals citroenzuur, aanwezig om de pro-oxidatieve rol van metalen zoals koper en ijzer te onderdrukken.

Frankel (2005) vermeldt de volgende mogelijkheden om de oxidatie te beheersen:

- inactivatie van pro-oxidanten zoals metalen;
- optimale processing bij raffinage om pro-oxidanten te verwijderen en de verliezen van antioxidanten, zoals tocoferolen, te beperken;
- gedeeltelijke hydrogenatie van poly-onverzadigde oliën;
- menging van poly-onverzadigde oliën met meer stabiele oliën;
- wijziging van de vetzuursamenstelling door genetische technieken;
- bescherming tegen licht, zuurstof en vocht door verpakking;
- toepassing van antioxidanten.

Het verloop van de oxidatie of de intensiteit van de oxidatie in functie van de tijd (figuur 1), is gekenmerkt door een inductie of lag fase, waarbij nagenoeg geen oxidatie optreedt. Gedurende deze periode is het levensmiddel stabiel en worden geen oxidatieproducten gevormd. De lengte van deze periode wordt bepaald door een reeks factoren, die de reactie versnellen of afremmen. Pro-oxidanten verkorten deze stabiele periode terwijl antioxidanten deze periode verlengen.

Na deze periode volgt een exponentiële fase waarbij de oxidatie sterkt stijgt. Dit volgt uit de aard van de reactie. Er worden producten gevormd met een afwijkend aroma alsook sensorisch niet waarneembare verbindingen.



Figuur 1 : Intensiteit van de oxidatie in functie van de tijd.

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen enerzijds oxidatietesten die de graad van oxidatie meten en anderzijds oxidatietesten die de weerstand tegen oxidatie meten.

De graad van oxidatie kan worden bepaald door een brede reeks analytische testen zoals het peroxidegetal, het gehalte geconjugeerde diënen, het anisidinegetal, het thiobarbituurzuurgetal, het gehalte carbonylverbindingen, de Totoxwaarde (2x peroxidegetal + anisidinegetal), de hoeveelheid vluchtige verbindingen met gaschromatografie methoden (GC), fluorescentiemetingen en andere. Hierbij wordt gemeten welke graad van oxidatie in een systeem bereikt is. Zoals uit bovenstaande figuur volgt hangen de verkregen waarden van de situering in het oxidatieproces af en dient er hiermee rekening te worden gehouden bij hun interpretatie. Zo is het mogelijk dat de waarde van een peroxidegetal, gemeten in functie van de tijd, toeneemt maar ook afneemt in functie van de vordering van het oxidatieproces. Dit laatste is het gevolg van het ontbinden van de hydroperoxiden met vorming van secundaire reactieproducten. Verhitte vetten vormen een typisch voorbeeld.

De weerstand tegen oxidatie (oxidatiestabiliteitstesten) wordt gemeten in systemen waarin een oxidatieparameter verhoogd wordt: de temperatuur, de zuurstof toegankelijkheid, de toevoeging van Cu ionen en andere. Voorbeelden van testen zijn de oven- of Schaalttest, de versnelde oventest, de Swifftest, de bomtest. Deze testen worden tegenwoordig vervangen door de RANCIMAT- methode. Het gaat om versnelde oxidatietesten uitgevoerd onder precieze praktijkomstandigheden. Een verband kan worden gelegd tussen deze versnelde testen en de weerstand van een gegeven levensmiddel tegen oxidatie, maar het is onmogelijk om op lange termijn de stabiliteit van vet te voorzien. Enkel de *shelf-life* testen onder gecontroleerde omstandigheden kunnen deze informatie verstrekken. Er zijn immers in levensmiddelen tal van factoren aanwezig die de oxidatie kunnen beïnvloeden. Daarom kan het verband tussen stabiliteit onder praktijkomstandigheden en een versnelde stabiliteitstest niet veralgemeend worden en van één levensmiddel op een ander overgedragen worden.

2.2.3.3. Oxidatie bij winning, raffinage en modificatie

Oxidatieprocessen, die plaats grijpen bij opslag van olie- of vethoudende weefsels, zowel plantaardige als dierlijke, worden behandeld onder 2.2.3.2. Dit gedeelte behandelt oxidatie bij processen zoals de winning van vetten uit plantaardige of dierlijke grondstoffen. De verkregen vetten en oliën kunnen als dusdanig in de handel gebracht worden als ruwe (niet geraffineerde of koud geslagen) olie of vet. De gangbare processen, die toegepast worden op ruwe vetten, omvatten raffinage en modificatie.

Raffinage bestaat uit een reeks processen, waarbij andere bestanddelen dan de triglyceriden verwijderd worden. In principe wordt de structuur van de vetzuren en triglyceriden niet gewijzigd.

Modificatie heeft als doel de samenstelling en structuur van de triglyceriden te wijzigen, zodat gewijzigde chemische en fysische eigenschappen van de vetten worden verkregen.

2.2.3.3.1. Winning

Vetten en oliën worden gewonnen door smeltprocessen, door mechanische processen als persing, bezinking en centrifugatie, of door solventextractie of door een combinatie van deze verschillende processen (Fils, 2000).

Smeltprocessen worden hoofdzakelijk toegepast bij de winning van rundvet, varkensvet, visolie en andere dierlijke vetten uit vetrijke weefsels van land- en zeedieren of bij de winning van watervrij melkvet. Naast een verhitting kunnen een aantal mechanische of fysieke scheidingsprocessen aangewend worden.

Mechanische processen worden eveneens toegepast bij winning van plantaardige oliën uit het vruchtvlies zoals olijf- en palmolie. Naast de toegepaste scheidingstechniek is de temperatuur bepalend voor de kwaliteit van de olie.

Een tweede mogelijkheid is persing uit zaden zoals cacaobonen, zonnebloempitten, maïskiemen en andere. De ruwe olie wordt als dusdanig op de markt gebracht of meestal geraffineerd.

Solventextractie wordt algemeen toegepast voor winning van plantaardige oliën. De verkregen extractieolie wordt doorgaans verder geraffineerd.

De gevoeligheid voor oxidatie stijgt zodra het vet vrijgesteld is uit het weefsel, omdat een aantal beschermende factoren wegvallen.

Gedurende de winning zelf zijn de temperaturen doorgaans lager dan 100°C. Voor ruwe oliën, die niet geraffineerd worden zoals olijfolie, wordt de winningstemperatuur trouwens zo laag mogelijk gehouden. Onder normale omstandigheden en handelwijze is verdere oxidatie beperkt. De kwaliteit van de olie hangt echter af van de kwaliteit van de grondstof en kan ook verminderen in functie van de transport- en opslagvoorwaarden.

2.2.3.3.2 Raffinage

Onder deze term worden verschillende processen gecatalogeerd die tot doel hebben een aantal nevenbestanddelen te verwijderen. Het betreft ontgommen, neutraliseren, bleken en deodoriseren.

Algemeen zijn er twee werkwijzen in gebruik: de chemische of fysieke raffinage (De Greyt & Kellens, 2000). De chemische raffinage bestaat uit het ontgommen, de neutralisatie, het bleken en de deodorisatie. De fysieke raffinage omvat het ontgommen, het bleken en een gecombineerde deodorisatie en ontzuring.

Het ontgommen heeft tot doel gommen en fosfolipiden te verwijderen. Dit gebeurt in zuur midden, bij temperaturen beneden 100°C en procestijden tot 1u. De invloed op oxidatie is beperkt.

In de klassieke neutralisatie worden vrije vetzuren verwijderd door neutralisatie met loog bij temperaturen beneden 100°C. De gevormde zeep wordt gescheiden van de olie. De invloed van de klassieke neutralisatie op oxidatie is beperkt. Vrije vetzuren kunnen ook verwijderd

worden door destillatie in een proces gecombineerd met de deodorisatie of de destillatieve ontzuring.

In het bleekproces worden ongewenste kleurstoffen verwijderd door adsorptie aan bleekarde. Tevens wordt getracht restfosfolipiden, zepen, metalen en oxidatieproducten te verwijderen. Dit gebeurt bij een matige temperatuur veelal beneden 100°C onder vacuüm. Bleekarde vertoont een catalytisch effect naar chemische omzettingen. In functie van de activiteit van de bleekarde zullen naast de verwijdering van kleurstoffen ook enkele nevenreacties doorgang vinden. De isomerisatiereactie met vorming van geconjugeerde vetzuren is wellicht de belangrijkste reactie in verband met de oxidatiegevoeligheid. Geconjugeerde vetzuren zijn meer gevoelig voor oxidatie. Bij sterolen kunnen dehydratatiereacties optreden met vorming van steroldiënen. Deze worden bij oxidatie omgezet in epoxiden.

De deodorisatie is een vacuüm stoomdestillatie en heeft in de eerste plaats tot doel ongewenste aromaverbindingen te verwijderen. De toegepaste temperatuur bedraagt 180 tot 250°C. Er kunnen nevenreacties plaats grijpen, ondermeer oxidatie in aanwezigheid van sporen zuurstof.

Bij de fysische raffinage of destillatieve ontzuring worden de vrije vetzuren onder vacuüm, bij iets hogere temperatuur, verwijderd.

In functie van de destillatie- omstandigheden kunnen naast ongewenste stoffen ook gewenste stoffen verwijderd worden zoals fytosterolen en tocoferolen. Tocoferolen zijn natuurlijke antioxidantia die een belangrijke rol spelen in de stabiliteit van een vet of olie. Verlies aan tocoferolen treedt op gedurende het bleken en de deodorisatie. De factoren die deze verliezen bepalen, werden bepaald door De Greyt (1998). In deze parameterstudie werd aangetoond dat 45-60 % van de tocoferolen behouden kan blijven door optimalisatie van de procesomstandigheden.

De invloed van raffinage op het oxidatierisico ligt in het feit dat reacties geïnduceerd kunnen worden die bij bewaring verder doorgang vinden. De verwijdering of inactivatie van natuurlijke bestanddelen met antioxidatieve werking verhoogt bovendien het risico.

2.2.3.3.3 Modificatie

Er worden drie technieken gebruikt: de fractionatie, de hydrogenatie en de interverestering (Kellens, 2000).

De fractionatie is een fysisch proces, waarbij een uitsplitsing in een hoogsmeltende (stearine) fractie en een laagsmeltende (oleïne) fractie verkregen wordt. Het proces omvat een gedeeltelijke kristallisatie, gevolgd door een scheiding van de kristallen en de vloeibare fase. Deze splitsing verloopt onder milde omstandigheden van temperatuur en tijdsduur. De invloed op oxidatie van het proces zelf is beperkt. De hoogsmeltende fractie is sterker verzadigd dan de vloeibare fractie. Bepaalde componenten zoals de natuurlijke antioxidantia worden ook aangerijkt in de vloeibare fractie. De fractionatie resulteert in twee fracties waarvan de oxidatiegevoeligheid verschillend is van het uitgangspunt, omdat hun samenstelling aan triglyceriden verschillend is.

De harding of hydrogenatie is een chemische reactie, waarbij dubbele bindingen in de vetzuurketen verzadigd worden. Dit gebeurt door de olie te verhitten in aanwezigheid van waterstof en een katalysator. Deze bevat veelal nikkel op een poreuze drager. De aangewende temperaturen bedragen 150-220°C. Naast verzadiging van dubbele bindingen treden tal van nevenreacties op zoals de vorming van plaatsisomeren, door verschuiving van dubbele bindingen, en van geometrische isomeren, zoals de vorming van transisomeren door een cis-transisomerisatie. Dit wordt hoofdzakelijk bepaald door de specificiteit van de reactie. Een hydrogenatie leidt tot verschillende types geharde vetten.

Als gevolg van het geringer aantal onverzadigde bindingen vertonen geharde vetten een grotere weerstand tegen oxidatie. In functie van de hydrogenatievoorwaarden worden meer of minder transvetzuren gevormd, die nutritioneel ongewenst zijn.

Bij selectieve partiële hydrogenatie wordt koper (Cu) aan de katalysator toegevoegd. De aanwezigheid van sporen Cu in de gehydrogeneerde olie is zeer negatief voor de oxidatiestabiliteit.

De interverestering kan onder verschillende vormen uitgevoerd worden, maar omvat steeds een herverdeling van de vetzuren binnen de glyceriden of tussen glyceriden onderling. Deze herverdeling kan intramoleculair of intermoleculair zijn, binnen één vet of meerdere vetten, al of niet gecombineerd met een fractionatie. Het proces is veelal chemisch gekatalyseerd met een stijgend belang van de enzymatisch gestuurde processen. De reactieomstandigheden zijn mild met temperaturen veelal beneden 100°C. De invloed op oxidatie is beperkt.

2.2.3.4. Oxidatie bij opslag en gebruik

Lipiden kunnen onder verschillende vormen bewaard en toegepast worden:

- als vrij vet of olie zoals bij tafelolie, frituurolie, frituurvet;
- als dispers systeem zoals bij boter, margarine, mayonaise, dressings, bakwaren, snacks, chocolade;
- in weefselstructuren zoals bij plantaardige en dierlijke weefsels zoals vlees en vleeswaren, vis en viswaren.

De factoren die de stabiliteit bepalen, werden besproken onder punt 2.2.3.2. Ze zijn van toepassing op zowel producten vervaardigd door de industrie als op producten bereid door de consument.

Bij de toepassing moet een onderscheid gemaakt worden tussen koude en warme bereidingen.

Bij koude bereidingen gelden de algemene factoren die de stabiliteit bepalen.

Bij warme bereidingen bestaan er een brede reeks toepassingen zoals bakken, braden, frituren.

Bij bak- en braadprocessen worden hoge uitwendige temperaturen aangewend. De hoge temperatuur wordt enkel bereikt in de oppervlaktelagen van het levensmiddel. Globaal is de verhittingstijd beperkt. De invloed naar oxidatie is beperkt. Wel worden oxidatieprocessen ingeleid zodat bij verdere bewaring van het bereide levensmiddel bij lage temperatuur of diepvries de oxidatie verder doorgaat zoals bij kant-en-klare maaltijden. Bij verhitting worden antioxidatieve componenten gevormd zoals bij de bruinkleuringsreacties, ondermeer de Maillard reacties.

Gezien de ontwikkelingen in de voedselbereiding in de sector van de grootkeukens en de horeca, worden gerechten in toenemende mate opnieuw opgewarmd (koude lijn) of soms warm gehouden (warme lijn).

Gedurende het hele fabricage- en bewaringsproces en tot het finale verbruik van de voedingsmiddelen kan oxidatie plaatsgrijpen.

Hogere temperaturen worden aangewend in frituurprocessen waarbij de olie of het vet ook langere tijd verhit worden. Het frituurproces is een ingewikkeld proces waarbij meerdere reacties simultaan verlopen.

Hydrolyse van triglyceriden tot vrije vetzuren, di- en monoglyceriden kan met name optreden onder invloed van het aanwezige water dat vaak afkomstig is van het gefrituurd voedingsmiddel. Dit resulteert in de verhoging van de hoeveelheid vrije vetzuren, die een gangbaar criterium zijn voor de kwaliteit van het gebruikte frituurvet.

Oxidatie treedt op met vorming van bekende tussenproducten zoals de hydroperoxiden. Deze zijn echter niet stabiel bij de temperaturen van het frituurproces. Vanaf 120°C worden zij ontbonden. De parameter 'peroxidegetal' is derhalve niet bruikbaar voor frituurvetten.

Bij een doorgedreven oxidatie ondergaan de radicalen een recombinitie met vorming van niet- radicalaire dimeren en trimeren. Deze terminatiereactie wordt ook eindketenreactie genoemd. Gezien de aard van de radicalen, betreft het zowel thermische (zonder –O– binding tussen de ketens) dimeren en trimeren als zuurstofhoudende (met –O– tussen de ketens) dimeren en trimeren.

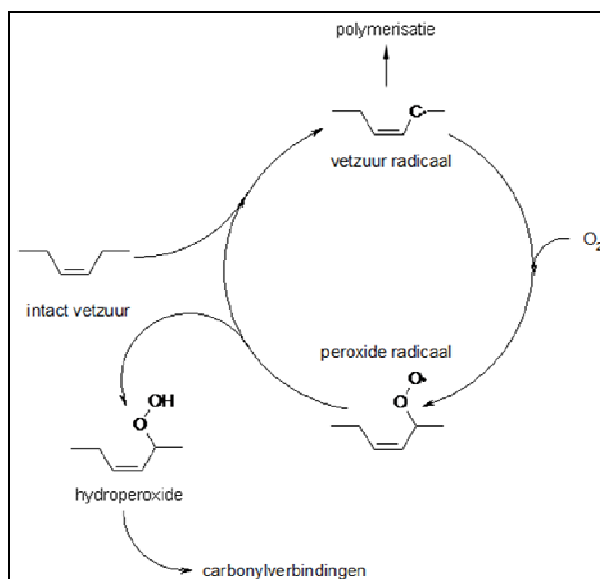
Gertz & Matthäus (2008) bespreken in detail de optimale voorwaarden van het frituurproces. Bij controle van de kwaliteit van frituurvet worden hiervoor de polaire bestanddelen alsook de polymere bestanddelen gemeten. Deze zijn opgenomen in het koninklijk besluit over verhitte vetten.

Bij hoge temperaturen worden cyclische verbindingen gevormd uit onverzadigde vetzuren. Om deze redenen is de toegelaten temperatuur bij frituurprocessen beperkt tot 180°C.

2.2.4 Literatuurstudie rond de identiteit van vetoxidatieproducten

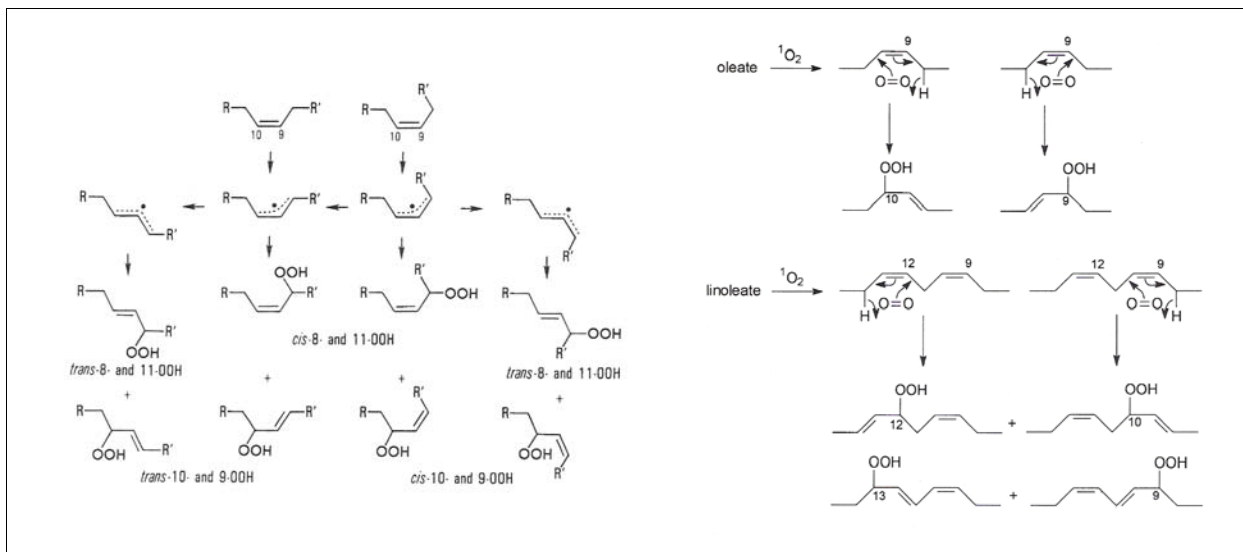
De oxidatie van lipiden is een bijzonder complex samenspel van verschillende reacties ter hoogte van verschillende componenten. Zo zijn niet enkel onverzadigde vetzuren in triacylglycerolen onderhevig aan oxidatie, maar ook andere, mineure componenten aanwezig in de vetfractie van een levensmiddel: vrije vetzuren, sterolen, vetoplosbare vitaminen, enz. Verder dient opgemerkt te worden dat, uitgaande van de vetzuuroxidatie, een complex mengsel van verbindingen ontstaat dat op zijn beurt tevens onderhevig kan zijn aan verdere reacties, die oxidatief van aard kunnen zijn, maar ook van een andere aard. Met name voor de niet-oxidatieve reacties dient rekening gehouden te worden met de interacties die er kunnen plaatsgrijpen tussen oxiderende lipiden en andere majorcomponenten in een complex levensmiddel, in het bijzonder met de eiwitfractie. Dit laatste aspect is echter momenteel nog weinig onderzocht en werd bijgevolg in eerste instantie niet opgenomen in deze eerste aanzet tot een overzicht van componenten die ontstaan tijdens de lipide-oxidatie.

Vooreerst dient kort stil gestaan te worden bij het algemene reactieschema van de zogenaamde auto-oxidatie. Het betreft een typische kettingreactie die aanvat met de vorming van een radicaal (initiatie) dat vervolgens reageert met atmosferische zuurstof in de triplettoestand (normale energietoestand van zuurstof) tot de vorming van een peroxide radicaal. In de afwezigheid van zuurstof zal de vorming van peroxide radicalen minder uitgesproken zijn. De peroxide radicalen abstraheren op hun beurt een waterstofradicaal van een intact onverzadigd vetzuur, waardoor de propagatiereactie vorm krijgt, gezien op deze manier een nieuw vetzuurradicaal ontstaat naast een hydroperoxide. Het vetzuurradicaal reageert op een gelijkaardige manier als het voorgaande vetzuurradicaal. De terminatie binnen dit kettingreactiemechanisme kan op verschillende manieren tot stand worden gebracht en bestaat eruit dat één van de gevormde radicalen reageert met een ander radicaal, zodat een niet-radicalair eindproduct ontstaat. Frankel (2005) beschouwt ook als terminatiereactie de reactie van een peroxide radicaal met een antioxidant, waarbij een antioxidant radicaal ontstaat die gewoonlijk stabiel is dan de oorspronkelijke. Een en ander staat schematisch en verkort weergegeven in onderstaand schema (Figuur 2).



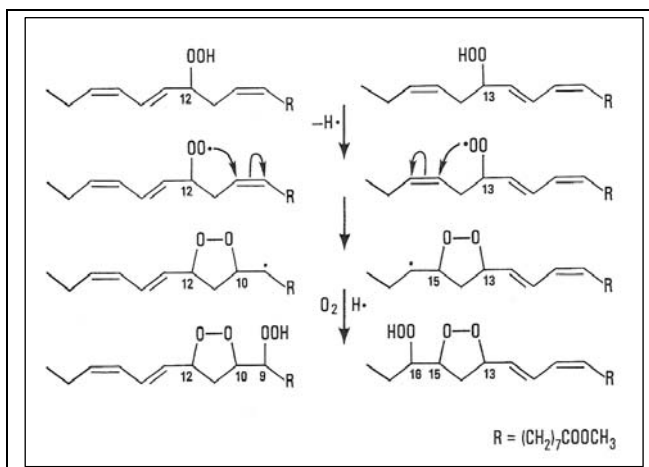
Figuur 2. Schematisch overzicht van auto-oxidatie van vetzuren.

Omtrent de verschillende oorzaken van de eigenlijke initiërende reactie wordt in deze tekst niet verder ingegaan. Het is echter wel belangrijk om even stil te staan bij het verschil van de auto-oxidatie en de foto-oxidatiereactie. De foto-oxidatiereactie biedt een belangrijke manier om hydroperoxiden te vormen die, zoals hieronder verder ook zal worden aangetoond, aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van radicalaire afbraakproducten. Foto-oxidatie grijpt plaats in de aanwezigheid van zichtbaar licht enerzijds en één of meerdere zogenaamde fotosensitizer(s). Deze laatste moleculen zijn in staat om de energie aanwezig in zichtbaar licht te gaan capteren. Er doen zich vervolgens twee mogelijkheden voor: ofwel geeft de geëxciteerde sensitizer de energie door aan het lipide (type 1), waardoor in aanwezigheid van zuurstof peroxide radicalen ontstaan. Deze peroxiden zijn gelijkaardig aan deze gevormd tijdens de auto-oxidatiereactie. In de type 2- reactie echter, wordt de energie doorgegeven aan zuurstof, waardoor singletzuurstof ontstaat. Singletzuurstof is in staat om rechtstreeks te reageren met intacte vetzuren, zonder dat eerst een radicaal dient aanwezig te zijn. Op deze manier ontstaat een beperkter mengsel van hydroperoxiden, met name rekening houdend met de verschillende cis/transisomeren die er kunnen gevormd worden (zie Figuur 3).



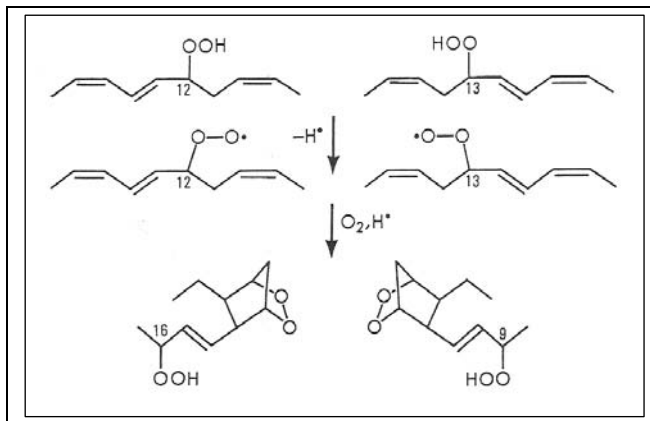
Figuur 3a+b. Auto-oxidatie van oliezuur (links) en foto-oxidatie van olie- en linolzuur (rechts) (Frankel, 2005).

Naast de vorming van de “klassieke” hydroperoxiden zoals hierboven beschreven, dient bij de oxidatie van vetzuren met drie of meer dubbele bindingen ook rekening te worden gehouden met de 1-3- cyclisatie van intermediaire peroxideradicalen tot 5-ring- hydroperoxy-epidioxiden die in een belangrijke mate kunnen gevormd worden (Figuur 4).

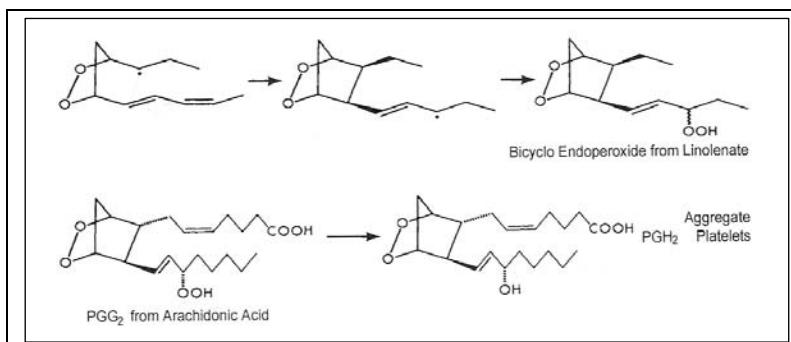


Figuur 4. Vorming van hydroperoxy-epidioxiden (Frankel, 2005).

Daarnaast kan ook een 1-5 cyclisatie ontstaan om bicyclo-endoperoxiden te vormen (Figuur 5) die enerzijds precursoren zijn van het typische secundair oxidatieproduct malondialdehyde maar anderzijds ook grote structurele gelijkenis vertonen met de fysiologische actieve prostaglandinen (vb. voor arachidonzuur in figuur 6). Het complexe mengsel van regio-isomeren en stereo-isomeren die ontstaan tijdens de oxidatie van arachidonzuur worden isoprostanen genoemd.

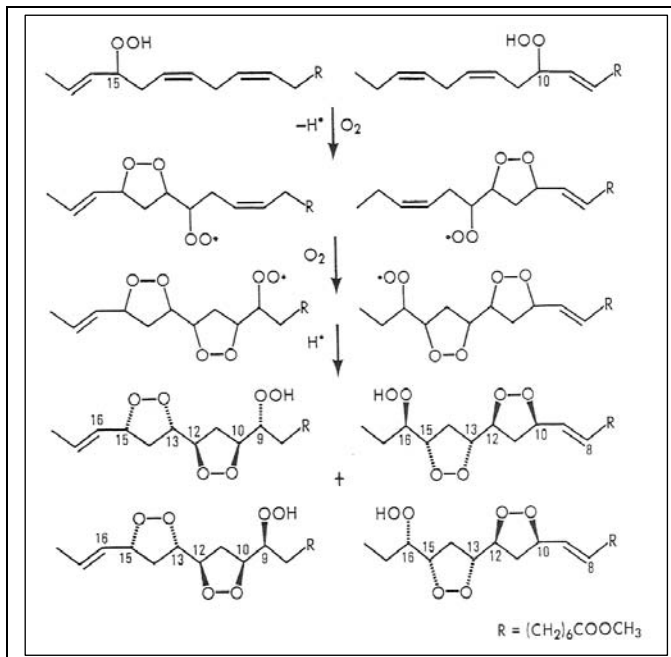


Figuur 5*. Vorming van bicyclische endohydroperoxiden (Frankel, 2005).



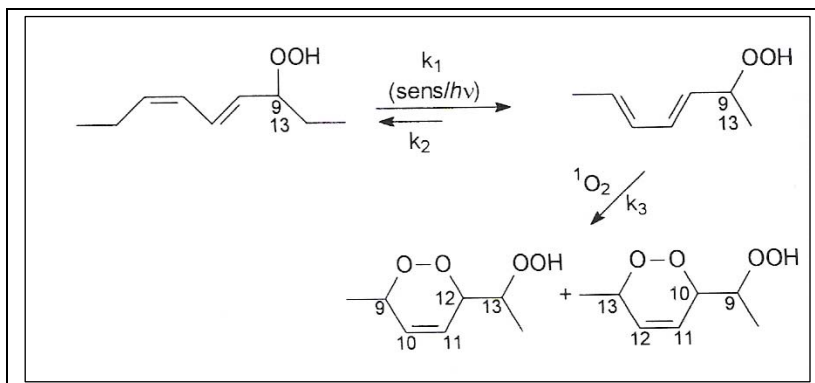
Figuur 6*. Voorbeelden van bicyclische endohydroperoxiden gevormd uit linoleenzuur en arachidonzuur (Frankel, 2005).

Omwille van de specifieke stereochemie van de reactie tussen linoleenzuur en singletzuurstof tijdens de foto-oxidatie, kan een seriële cyclisatie ontstaan van de 10 en 15-hydroperoxiden zoals aangegeven in Figuur 7.



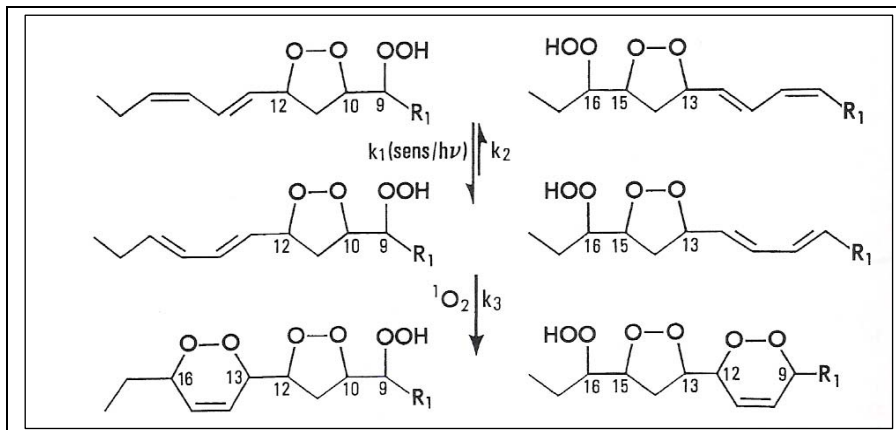
Figuur 7. Seriële cyclisatie van hydroperoxiden tijdens de foto-oxidatie van linoleenzuur (Frankel, 2005).

Verder dient bij de singletzuurstof geïnduceerde oxidatie ook rekening te worden gehouden met een directe 1,4-cycloadditiereactie van zuurstof aan een geconjugerd 1,3-dieen systeem (Figuur 8).



Figuur 8. Vorming van 6-ringperoxiden tijdens de foto-oxidatie van linoleenzuur (Frankel, 2005).

Deze laatste reactie kan in combinatie van de 1,3-cyclisatie doorgaan, waardoor nog meer complexe derivaten ontstaan (Figuur 9).



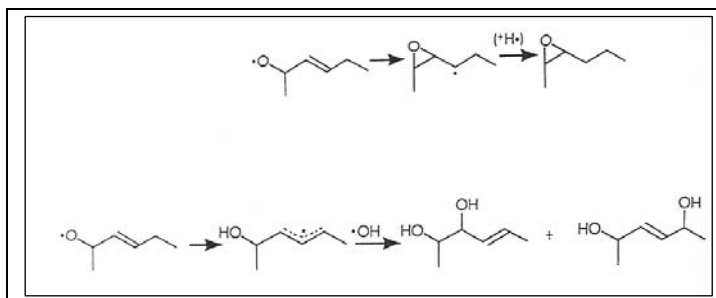
Figuur 9. Gecombineerde vorming van 5- en 6- ringperoxiden bij foto-oxidatie van linoleenzuur (Frankel, 2005).

De gevormde hydroperoxiden zijn onstabiel en zullen bijgevolg degraderen. Hierbij ontstaat een enorm gamma van secundaire oxidatieproducten:

- monomere niet- vluchtige verbindingen;
- monomere vluchtige verbindingen;
- gepolymeriseerde producten.

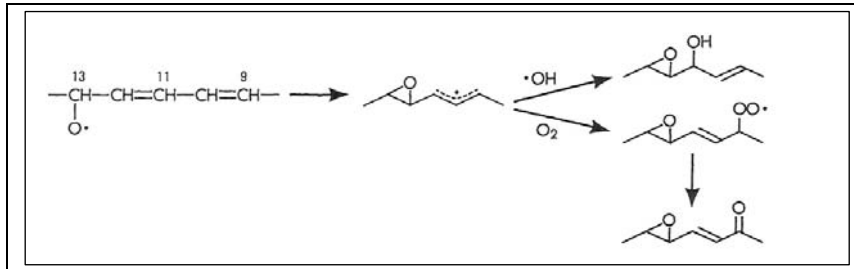
Bovendien kunnen deze secundaire oxidatieproducten zelf nog verdere afbraak ondergaan tot andere vluchtige verbindingen.

Wat betreft de niet- vluchtige monomere secundaire oxidatieproducten moet rekening gehouden worden met de vorming van keto-, epoxy- en hydroxyvetzuren, uitgaande van mono-onverzadigde vetzuren (Figuur 10).



Figuur 10*. Vorming van secundaire oxidatieproducten uit oliezuur (Frankel, 2005).

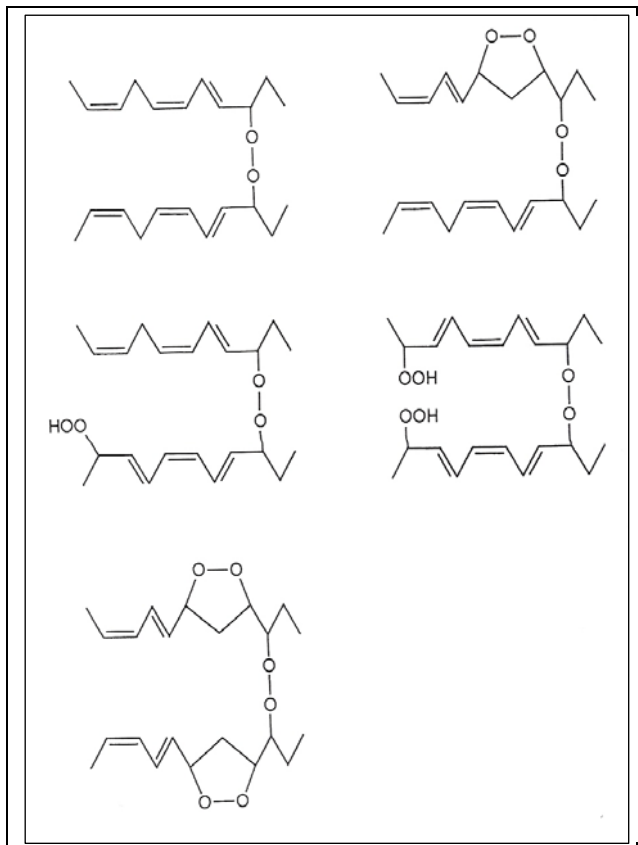
Voor linolzuur ontstaan gelijkaardige componenten, maar tevens kunnen onder andere epoxy-hydroxy, di- en trihydroxy analoga gevormd worden (Figuur 11).



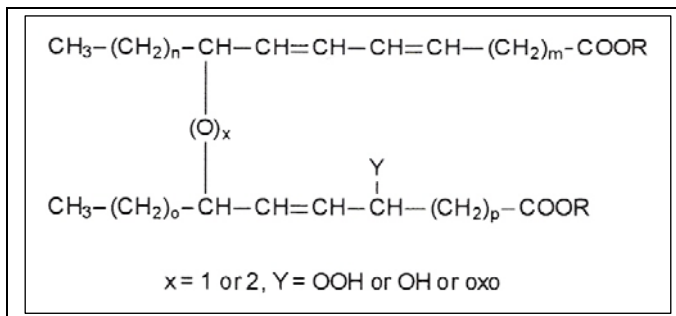
Figuur 11*. Vorming van secundaire oxidatieproducten uit linolzuur (Frankel, 2005).

Voor de sterker onverzadigde vetzuren werd reeds gewezen op de vorming van de epidioxidederivaten en de bicyclo-endohydroperoxiden. Deze laatste geven aanleiding tot de vorming van malondialdehyde.

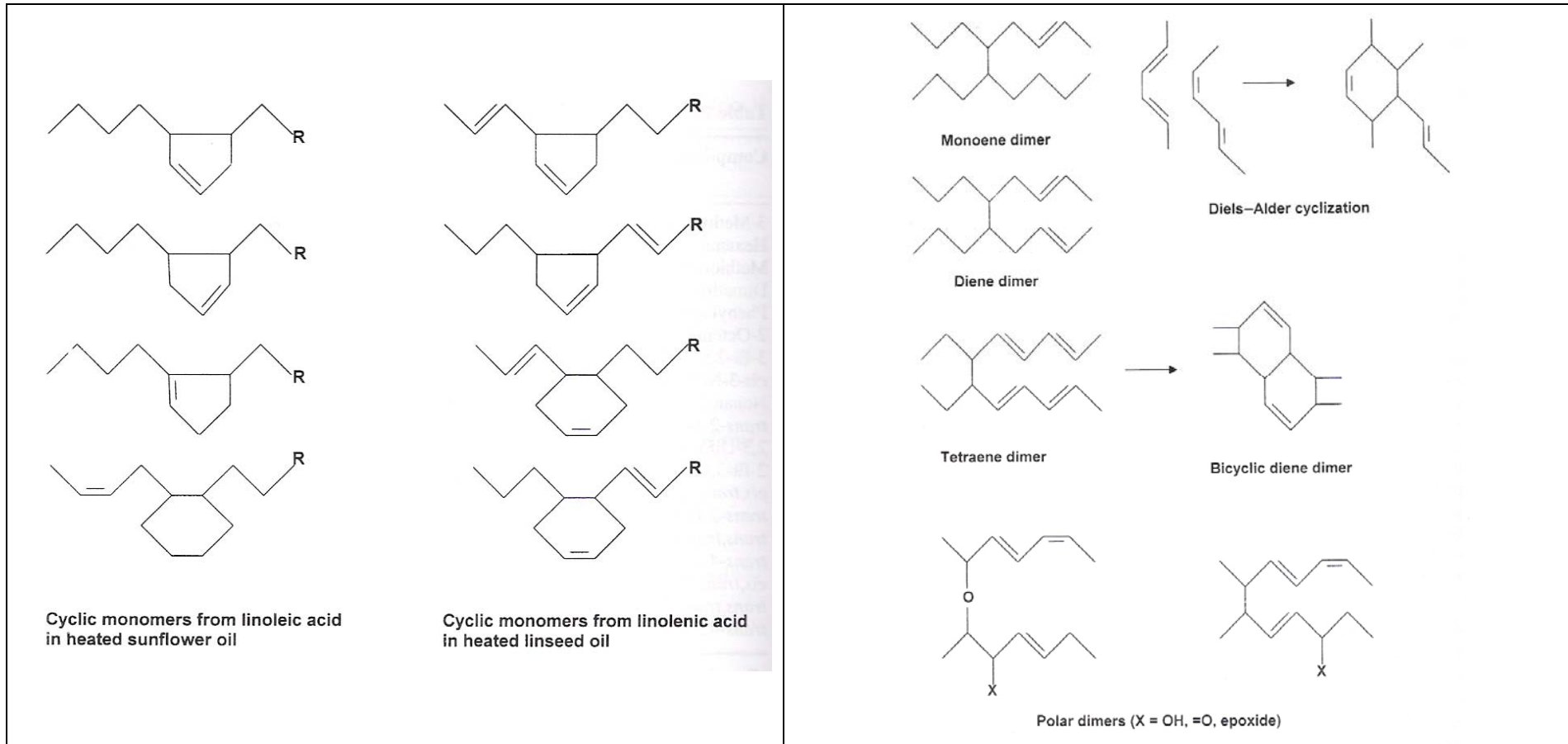
Wat de vorming van gepolymeriseerde secundaire oxidatieproducten betreft, wordt verwezen naar Figuur 12 om een idee te krijgen van een beperkt aantal componenten die kunnen gevormd worden. Naast de peroxide dimeren kunnen ook ethers gevormd worden (Figuur 13). Typisch ontstaan ook cyclische mono- en dimeren (Figuur 14). De vorming van deze gepolymeriseerde componenten treedt in triacylglycerolen vooral op bij sterke verhitting, zoals bij een frituurproces.



Figuur 12. Vorming van peroxydimeren uitgaande van linoleenzuur (Frankel, 2005).

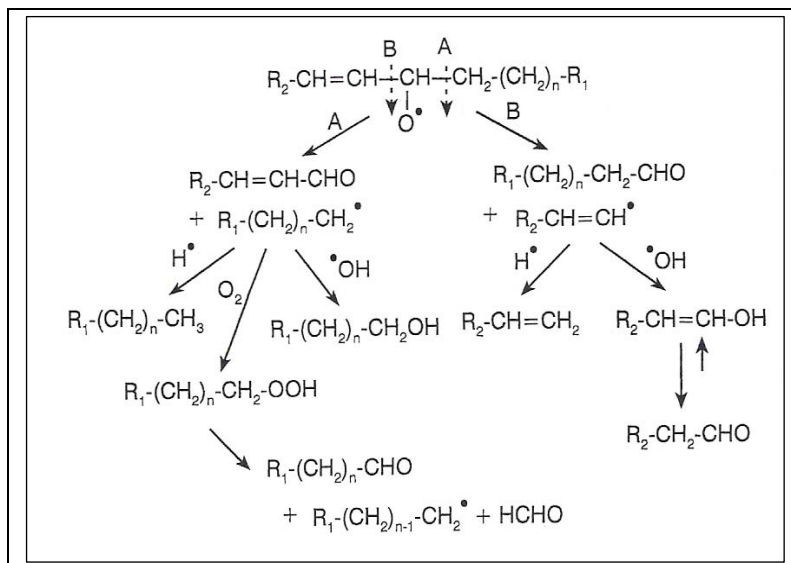


Figuur 13*. Vorming van oxidatieve dimeren uitgaande van linoleenzuur (Frankel, 2005).



Figuur 14*a°+b. Vorming van cyclische mono- en dimeren (Frankel, 2005).
 ° Aanpassing van Le Quere en Sebedio (1996) en Christie en Dobson (2000)

Het gamma vluchtige secundaire oxidatieproducten is bijzonder complex. De vorming van deze componenten kan in veel gevallen verklaard worden door de zogenaamd homolytische β -splitsing vanuit een alkoxyradicaal. Dit alkoxyradicaal ontstaat door een homolytische splitsing van een hydroperoxide. Via de homolytische β -splitsing worden diverse aldehyden, alkyl en olefinische radicalen gevormd (Figuur 15).



Figuur 15*. Homolytische β -splitsing van alkoxyradicalen (Frankel, 2005).

De alkylradicalen worden verder omgezet tot koolwaterstoffen of alcoholen. De olefinische radicalen vormen het overeenkomstige olefine of het 1-enol, dat tautomeriseert tot het verzadigde aldehyde. Alkylradicalen kunnen bovendien worden omgezet tot hydroperoxiden die op hun beurt uiteenvallen in het overeenkomstige aldehyde (uit het alkoxy radicaal). Deze hydroperoxiden kunnen echter ook splitsen tot formaldehyde en het alkylradicaal met één koolstofatoom minder (Figuur 15).

Gebaseerd op deze generieke mechanismen kan onder meer de vorming van de volgende componenten uit een aantal geselecteerde vetzuren ontstaan:

- oliezuur:
 - 2-undecenal en heptaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - decanal en oxo-octaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - 2-decenal en octaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - nonanal en 9-oxo-nonaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - octaan en oxo-deceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - octanal en oxo-decaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - heptaan en oxo-undeceenzuur (veresterd aan glycerol)

De oxidatieve vorming van heptanal, nonenal en nonaanzuur uit oliezuur kan niet via dit mechanisme verklaard worden.

- linolzuur :
 - decadienal en octaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - nonenal en oxo-nonaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - hexanal, oxo-dodeceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - pentane, pentanol en pentanal
 - octeen, octenol en oxo-deceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - heptenal en undeceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - hexanal en oxo-dodeceenzuur (veresterd aan glycerol)

De oxidatieve vorming van acetaldehyde, 2-pentylfuraan, heptaanzuur, 2-octenal, nonadienal, oxo-octaanzuur en oxo-decaanzuur uit linolzuur kan niet via dit mechanisme verklaard worden. Tevens dient de vorming van 4-hydroxy-2-nonenal vermeld te worden; deze laatste is gekend als bijzonder schadelijk. Dit reactieve aldehyde kan ook uit andere meervoudig onverzadigde vetzuren ontstaan.

In Korea bedroegen gehalten 4-hydroxy-nonenal in zuigelingenvoeding 45-130 ppb en stegen na 10 dagen bewaring bij kamertemperatuur tot 80-790 ppb (Surh et al., 2007). gehalten in gehakt vlees bedroegen 10-220 ppb.

- linoleenzuur :
 - decatrienal en octaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - nonadienal en oxo-nonaanzuur (veresterd aan glycerol)
 - heptadienal en undecceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - hexenal en oxo-dodeceenzuur (veresterd aan glycerol)
 - pentenol, pentenal
 - propanal en ethaan
 - butenal

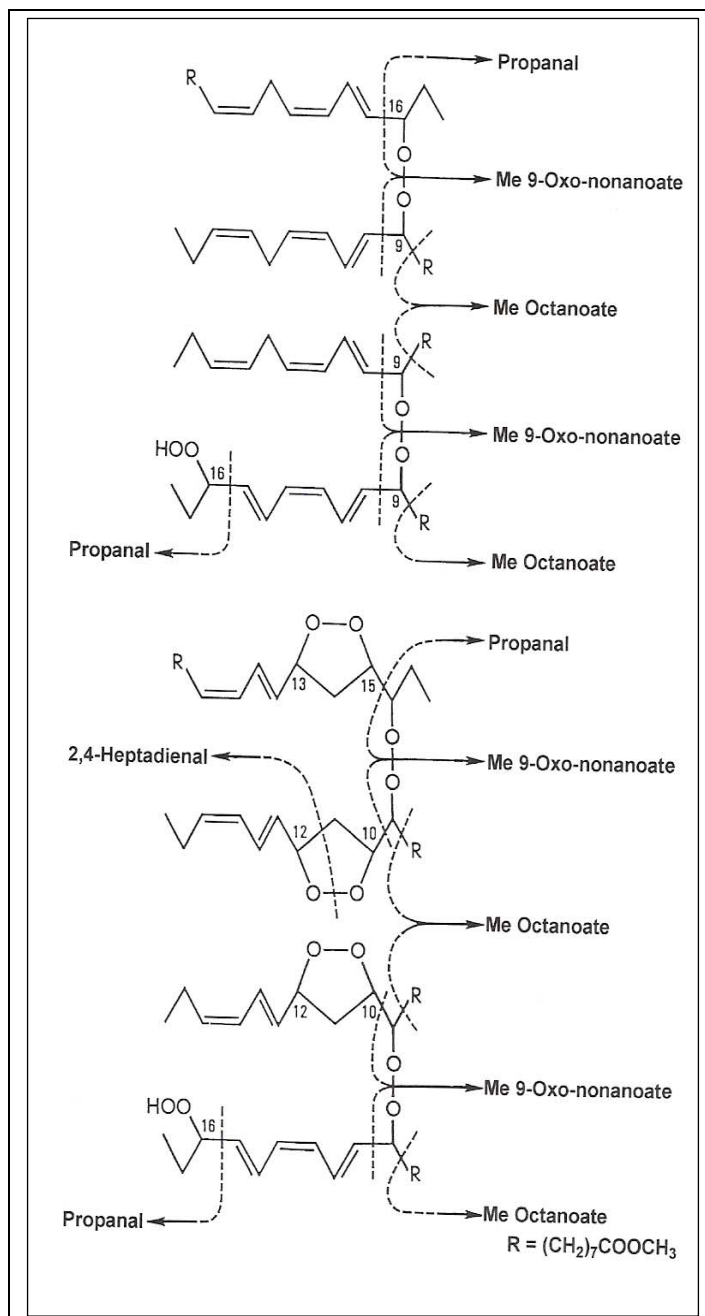
De oxidatieve vorming van acetaldehyde, butanal, 2-butyfuran, heptaanzuur, 4,5-epoxyhepta-2-enal, nonaanzuur en een aantal oxozuren kan niet via dit mechanisme verklaard worden.

Een ander vluchtig aldehyde dat gevormd wordt tijdens de oxidatie van poly-onverzadigde vetzuren is acroleïne. Naast de oxidatieve vorming kan echter ook de vorming vanuit glycerol, dat ontstaat door hydrolyse van triacylglycerolen, niet uitgesloten worden. Dit laatste mechanisme lijkt echter enkel relevant indien de producten sterk verhit worden (Stevens & Maier, 2008). Hierbij is het waarschijnlijk dat het acroleïne gezien zijn hoge vluchtigheid ogenblikkelijk verdampt. In de literatuur worden waarden gerapporteerd variërende van 9 mg/l tot 240 mg/l per uur, afhankelijk van het type olie of de verhittingstemperatuur (Fullana et al., 2004). Wat betreft de louter oxidatieve vorming kan verwezen worden naar een studie uitgevoerd op levertraan, bewaard bij 25°C gedurende 14 weken waarbij een verhoging van het acroleïnegehalte vastgesteld werd van 42 tot 152 ppb. Het zou dus relevant kunnen zijn om het acroleïnegehalte te bepalen van bepaalde voedingssupplementen (vb. capsules).

Zoals vermeld, zijn de secundaire oxidatieproducten onderhevig aan een verdere afbraak.

De onverzadigde aldehyden zullen oxidatief worden afgebroken tot dialdehyden (vb. malondialdehyde, glyoxal), aldehyden, α -keto-aldehyden (Figuur 16). Verzadigde aldehyden kunnen verder worden geoxideerd tot zuren.

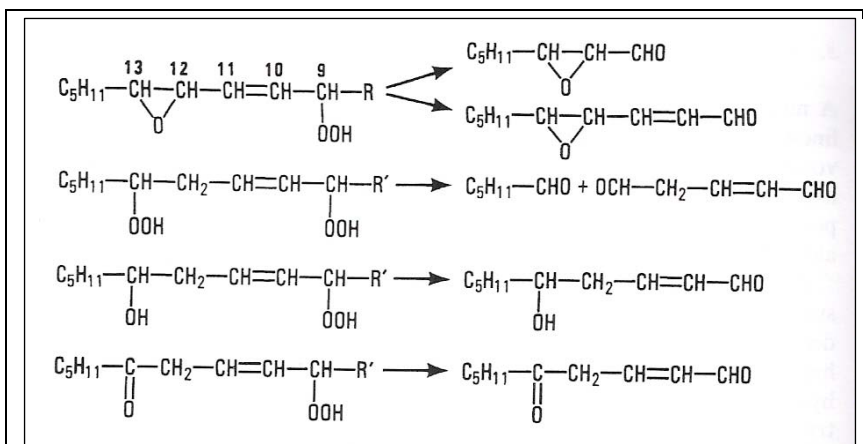
In figuur 17 is een illustratief voorbeeld geschetst van de verschillende componenten die kunnen ontstaan door een verdere afbraak van oxidatieve dimeren.



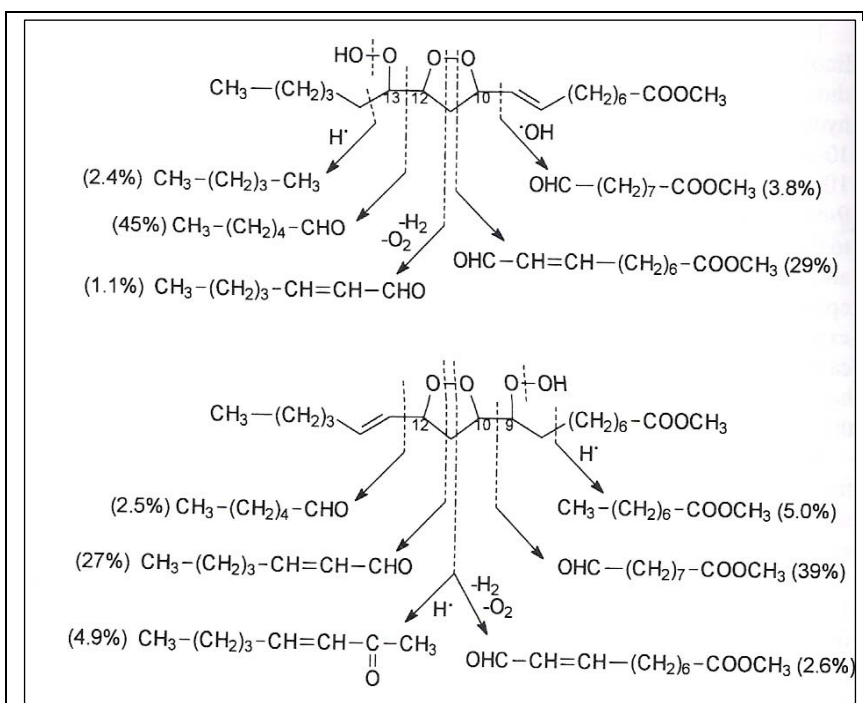
Figuur 17. Ontbinding van dimeren uigaaende van linolzuur (Frankel, 2005).

In eerste instantie ontstaan de peroxiden zelf die op een gelijkaardige manier ontbinden zoals reeds besproken. Typisch is het ontstaan van de zogenaamde aldehyde-glyceriden of *core* aldehyden.

Uitgaande van peroxy-epoxiden, epidioxiden en bicyclo-endoperoxiden ontstaan onder meer een gans gamma aan epoxyzuren en aldehyden zoals aangegeven in Figuren 18 en 19.

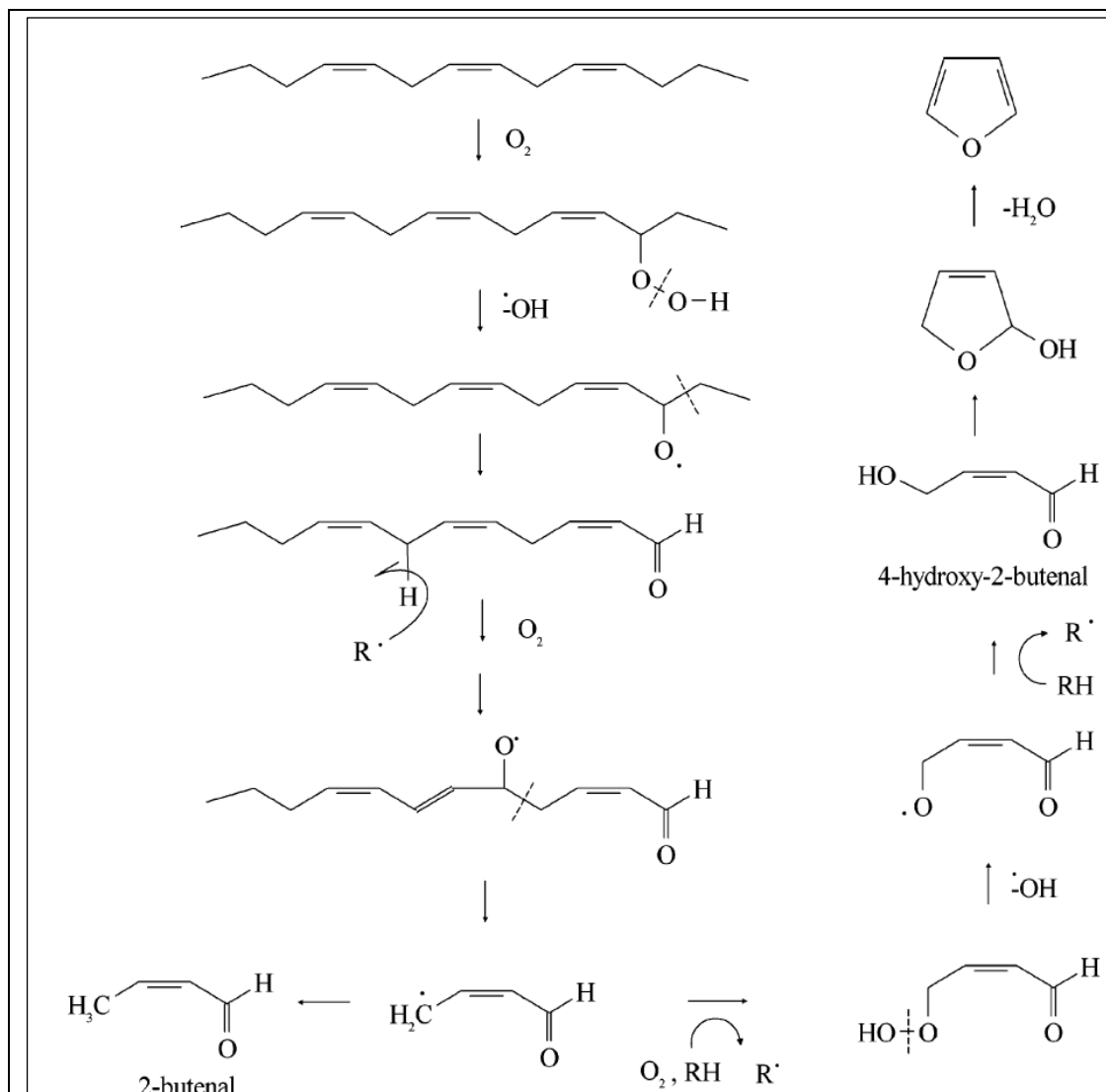


Figuur 18*. Vorming van onverzadigde epoxyaldehyden, aldehyden, OH-aldehyden en ketoaldehyden (Frankel, 2005).



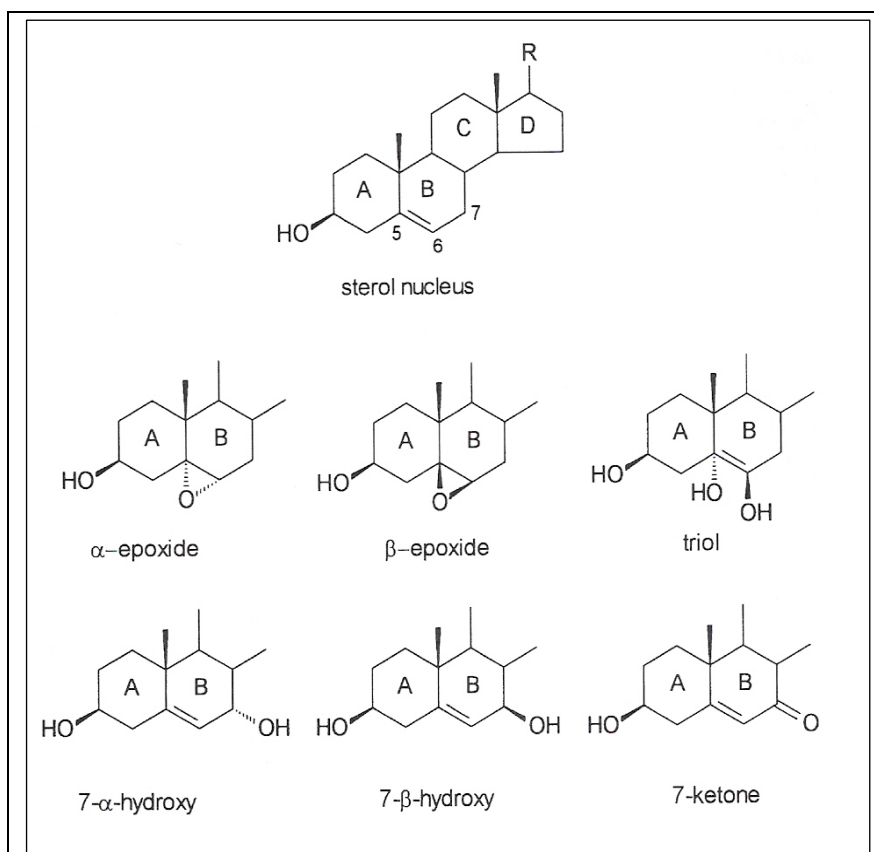
Figuur 19. Vluchtige afbraakproducten van peroxy-epidioxiden na oxidatie van linoleenzuur met singletzuurstof (Frankel, 2005).

Zoals reeds werd aangegeven, is het mogelijk dat een aantal furaanderivaten ontstaan uit vetoxidatie. Recent werd ook de vorming van het niet- gesubstitueerde furaan zelf uit vetoxidatie gepostuleerd (Figuur 20). Zoals uit dit mechanisme blijkt, zou furaan ontstaan uit de toxische 4-hydroxy-2-onverzadigde aldehyden.



Figuur 20. Gepostuleerd mechanisme voor de vorming van furaan via de oxidatie van linoleenzuur (Locas & Yaylayan, 2004).

Tot slot wordt in dit overzicht nog gewezen op het ontstaan van verschillende sterolderivaten, zoals de cholesteroloxiden (Figuur 21). Tevens is het duidelijk dat ook fytosterolen en -stanolen oxidatiegevoelig zijn en dus omgezet worden tot analoge producten (Hovenkamp et al., 2008).



Figuur 21*. Overzicht van typische cholesteroloxiden (Frankel, 2005).

Figuren 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21 aangeduid met (*) werden in dit document overgenomen met de toelating van de uitgever, The Oily Press.

2.2.5 Metabolisme van de vetten

2.2.5.1 Inleiding

De triglyceriden (TG), de fosfolipiden (PL) en de sterolen zijn drie klassen voedingsvetten waarmee men in het kader van de menselijke voeding rekening dient te houden. De vetzuren bevinden zich voor het merendeel in de vorm van TG in alle vetrijke levensmiddelen, terwijl de fosfolipiden maar 3 tot 6% van de ingenomen vetzuren vertegenwoordigen (Ramirez et al., 2001). De vetzuren afkomstig van de vertering van de TG en de PL uit de voeding, worden ofwel opgeslagen ofwel als onderdeel van membraanstructuren ingebouwd ofwel als energiebron gebruikt, waardoor ze een energiewaarde van 9 kcal/g toegekend krijgen. Hun rol als regulator van het metabolisme is eveneens belangrijk. Een overmatige opname van voedingsvetten draagt in ruime mate bij tot een abnormale accumulatie van vetweefsel in het organisme. Maar de overtollige vetzuren worden eveneens “ectopisch” in andere weefsels (lever, skeletspieren, hart) opgestapeld, waarbij ze in deze organen een rol spelen bij de insulineresistentie en het ontstaan van pathologieën die vaak met een overmaat aan vetmassa geassocieerd worden (niet-alcoholische steatohepatitis, diabetes, hartpathologieën) (Delarue & Magnan., 2007; Eckel, 2007; Schrauwen, 2007).

Cholesterol zelf is voorloper van tal van hormonale mediators en is essentieel voor de structuur van de celmembranen. Ingenomen in duidelijk lagere hoeveelheden dan de TG (de aanbevelingen voor volwassenen bedragen < 300 mg per dag) speelt voedingscholesterol meer een rol van regulator dan van metabolisch substraat. De betrokkenheid van voedingscholesterol bij de ontwikkeling van dyslipidemieën en cardiovasculaire ziekten, lijkt voor 20% van de bevolking van belang te zijn, maar blijft het onderwerp van talrijke controverses.

Het doel van dit hoofdstuk is niet zozeer het in detail beschrijven van de fysiopathologische weerslag van voedingsvetten, maar wel het beschrijven van het lot ervan in het menselijk organisme na inname.

2.2.5.2. Vertering en metabolisme van voedingsvetten

Postprandiaal wordt 95% van de ingenomen vetten geabsorbeerd. Door het maaglipase wordt tot 30% van de ingenomen TG gehydrolyseerd. Bij de maagfase van de vertering van triglyceriden worden vooral diglyceriden en vetzuren geproduceerd. Het pancreaslipase zorgt eveneens voor de hydrolyse van de sn-1- en sn-3-verbindingen van de TG in aanwezigheid van co-lipase en galzouten, waardoor vetzuren en 2-monoacylglyceriden worden gevormd. Het pancreasenzym cholesterylester hydrolase geeft vrij cholesterol en vetzuren af. Het kan ook een rol spelen bij de vertering van triglyceriden met lange vetzuurketens (Ramirez et al., 2001). De PL uit de voeding worden door het pancreas A2- fosfolipase gehydrolyseerd tot 1-lysofosfolipide en een vetzuurmolecule. De hydrolyseproducten van de TG en PL uit de voeding worden door de darmcellen geabsorbeerd. De onverzadigde vetzuren met middellange keten zijn meer oplosbaar in water en worden efficiënter opgenomen dan de verzadigde vetzuren met lange keten. Zo ook vertonen de vetzuren aanwezig op positie 2 op de TG en PL een betere biologische beschikbaarheid (Ramirez et al., 2001; Mu & Hoy, 2004). In de darmcellen worden de vetzuren en monoglyceriden herveresterd en in chylomicronen geïntegreerd. Talrijke intracellulaire factoren (*fatty acid binding protein pm* - FABPpm, *Fatty acid transport protein* - FATP, CD36, enz.) zijn onontbeerlijk voor die metabolisatie- en assemblagewegen binnen de darmcel (Armand, 2007; Beylot et al., 2007). De chylomicronen worden in de darmcel gevormd vanuit apolipoproteïne B48, cholesterol, TG en PL. Ze transporteren de voedingsvetten eerst in de lymfe en vervolgens postprandiaal in de bloedsomloop. De lever scheidt de VLDL (*very low density lipoprotein*) af; de natieve VLDL worden gevormd door associatie van de bovengenoemde verschillende vettypes met het apolipoproteïne B100 (bij de mens). Het profiel van de apolipoproteïnen te midden van de chylomicronen en de VLDL evolueert in de loop van hun intravasculaire metabolische evolutie: toevoeging van andere types apolipoproteïnen, zoals de

apolipoproteïnen C of E vanuit HDL (*high density lipoprotein*). Tijdens hun passage in de bloedsomloop worden de chylomicronen en de VLDL armer aan TG tengevolge van de inwerking van het lipoproteïne-lipase (LPL), dat covalent gebonden (heparansulfaat) is met de capillairen die de verschillende weefsels van bloed voorzien. Zo worden eveneens chylomicronrestanten (zgn. 'chylomicron-remnants') en IDL (*intermediate density lipoprotein*) gevormd. De hydrolyse van de TG in vetzuren door de LPL is een enzymatisch proces waarvoor apolipoproteïne CII als co-factor nodig is. De vrijgekomen vetzuren dringen in de weefsels en kunnen er als energiesubstraten dienen (hepatische of musculaire β -oxidatie), er, na herverestering, opgeslagen worden in de vorm van TG (vooral in het vetweefsel) of dienen als precursoren voor de synthese van membranale of intracellulaire vetbestanddelen (fosfolipiden, sfgolipiden, enz.) met verscheidene belangrijke functies (structurele rol, signalisatie, enz.). De chylomicronrestanten worden door de lever opgevangen via de LDL-receptoren en via het LDL receptor-related protein (LRP). De VLDL-remnants (IDL genaamd: *intermediate density lipoprotein*) kunnen eveneens de inwerking van het leverlipase ondergaan wat hen nog armer maakt aan TG en aldus omzet tot LDL (*low density lipoprotein*).

Het snelle verdwijnen van de chylomicronen uit de bloedsomloop (enkele minuten) is hoofdzakelijk te wijten aan de selectieve toename van de lipoproteïne-lipase activiteit van het vetweefsel (activatie door insuline), ten koste van de andere weefsels (Goldberg, 1996). In een tweede stap dragen de VLDL eveneens bij tot de postprandiale verhoging van de triglyceridemie. Dit verschijnsel zou kunnen voortvloeien uit een toegenomen halfwaardetijd van de VLDL in het plasma, toe te schrijven aan de competitie tussen VLDL en de chylomicronen voor het lipoproteïne-lipase (Williams, 1997 ; Roche, 1999). De lever speelt een sleutelrol in het VLDL-metabolisme; figuur 22 illustreert de complexiteit van de metabole wegen die leiden van het vetzuur in de lever (zelf afkomstig van verschillende bronnen: vrije vetzuren afkomstig van het vetweefsel, afbraak van de lipoproteïnen, de-novo synthese of lipogenese) tot de afscheiding van de in de VLDL opgenomen triglyceriden. De vrije vetzuren in het plasma afkomstig van het vetweefsel, vormen een belangrijke energiebron voor de lever, maar zijn eveneens het hoofdsustraet voor de synthese van triglyceriden in dat orgaan wanneer de flux aanzienlijk is (bij obesitas bijvoorbeeld). De specifieke carriërs (FAT, FATP, FABPm), met name gestimuleerd door o.a. de nucleaire receptoren zoals de PPAR α (*peroxisome proliferator activated receptor alpha*), die eveneens bij de regulering van de oxidatie van de vetzuren betrokken is, werken het doordringen van de vrije vetzuren in de levercel in de hand.

Het opnemen van de chylomicronrestanten of van de IDL door de lever en de *de novo* synthese van vetzuren vanaf gluciden vormen alternatieve bronnen voor de vorming van de TG in de lever (Bauchart et al., 1997 ; Karpe, 1997).

2.2.5.2.1 Weefselaccumulatie van vetzuurderivaten of "lipotoxiciteit": oorzaken en gevolgen

Een vetrijk dieet en de toename van de serumconcentratie aan vrije vetzuren afkomstig van het teveel aan vetmassa, veroorzaken een abnormale opstapeling van triglyceriden in de lever- en spierweefsels. De opstapeling van TG in de lever veroorzaakt leversteatose, die tegenwoordig beschouwd wordt als een voorbeschikkende factor voor het optreden van niet-alcoholische steatohepatitis, één van de pathologische elementen die met het metabool syndroom geassocieerd worden. De vetopstapeling kan worden toegeschreven aan het disfunctioneren van de mitochondriale oxidatieactiviteit (in de spieren afhankelijk van sommige factoren zoals de co-activator van de PPAR γ of PGC-1 α). Een gevolg van de lipotoxiciteit is met name een lagere gevoeligheid voor insuline in de lever en de spieren (Schrauwen, 2007). Sommige vetzuurderivaten (sfgolipiden (ceramiden), diacylglyceriden of derivaten van acylCoënzym A) blijken te interfereren met de intracellulaire signalisatie van insuline en het glucosetransport (Delarue & Magnan, 2007). Dat weefselement, met name de intramyocytair of intrahepatische opstapeling van triglyceriden, moet heden in aanmerking genomen worden bij metabolestoornissen samengaand met obesitas en een onaangepaste voeding.

2.2.5.2. Diversiteit van vetzuren en metabole effecten

Als men spreekt van een vermindering van de totale hoeveelheid vetten in de voeding, moet men echter opmerken dat het lot van de vetzuren in het organisme, hun distributie en hun fysiologische effecten afhankelijk zijn van hun scheikundige kenmerken, met name de lengte van de koolwaterstofketen, de onverzadigheidsgraad, de lokalisatie en de isomerie (cis-trans) van de dubbele bindingen. Gewoonlijk houdt men rekening met de positie van het koolstof t.o.v. de alfa COOH om de nomenclatuur van de vetstoffen te geven. Als het om voeding gaat, spreekt men echter eerder over meervoudig onverzadigde n-3- of n-6- vetzuren (ook aangeduid met ω -3 en ω -6), waarbij verwezen wordt naar de positie van de eerstkomende dubbele binding vanaf de eindstandige methylgroep (CH₃). De letter n (of ω) duidt de laatste koolstof van de alifatische keten aan. Dit structurele kenmerk kent hen immers bijzondere eigenschappen toe. In dat opzicht wordt er voorgesteld om, wanneer men aanraadt om de inname van verzadigde vetzuren te beperken, een geschikte verhouding tussen meervoudig onverzadigde n-3- (of ω -3) en n-6- (of ω -6) vetzuren te behouden; de postprandiale triglyceridemie wordt immers beperkt als de inname van meervoudig onverzadigde n-3-vetzuren (DHA, EPA) hoger ligt (Sanders et al., 1997). Er blijft echter een onbekende wat de vraag betreft welke van de twee, de DHA of de EPA, het meest uitgesproken hypotriglyceridemiërend effect heeft (Froyland et al., 1997).

Het is interessant te zien dat de wijziging van het cholesterolgehalte in melk eveneens invloed zou kunnen uitoefenen op de triglyceridemie. Bij gezonde vrijwilligers levert de consumptie van standaard- of gewijzigde melk respectievelijk 428 en 248 mg cholesterol/dag op zonder wijziging van de hoeveelheid en de verhouding van de ingenomen vetzuren met als gevolg een significante vermindering van de VLDL-triglyceriden (Jacques et al., 1999).

Welk/Welke mechanisme(n) wordt/worden er aangevoerd om het hypotriglyceridemiërend effect van de meervoudig onverzadigde n-3-vetzuren te verklaren? De studies bij mens en dier suggereren dat het belangrijkste effect een verzwakking is van de postprandiale triglyceridemische respons, te wijten aan een toename van de klaring via een activering van het lipoproteïne-lipase in de perifere weefsels, een betere captatie door de lever van lipoproteïnerestanten rijk aan TG, een toegenomen oxidatie van de vetzuren en een afname van de VLDL-secretie (voor review zie Williams, 1997; Delzenne, 2008).

2.2.5.3. Metabolisme van sterolen

Cholesterol is één van de essentiële bestanddelen die men bij dieren aantreft als bouw molecuule van de dierlijke celmembranen en voorloper van de steroïdhormonen. De lever produceert endogeen cholesterol in aanzienlijke hoeveelheid. De voedingsbronnen van cholesterol zijn in hoofdzaak van dierlijke oorsprong. Planten bevatten geen cholesterol, maar wel zeer verwante moleculen, die men onder de generische benaming van plantensterolen of fytoosterolen onderverdeelt. De in de natuur meest voorkomende molecuulesoorten (in plantaardige oliën, volle granen, droge groenten, vruchten en groenten) zijn cholesterolderivaten met een methyl- (campesterol, stigmasterol, brassicasterol) of ethylgroep (β -sitosterol) op de zijketen en derivaten zonder dubbele binding in de meervoudige ringstructuur (respectievelijk campestanol en sitostanol) (Lairon & Martin, 2008).

De opname van voedingscholesterol volgt dezelfde metabole weg als die van de TG; de vorming van gemengde micellen met galzuren resulteert nl. in de internalisering van cholesterol in de enterocyten. Wanneer fytoosterolen in hoge dosissen via de voeding worden ingenomen, kunnen ze – ook al worden ze over het algemeen weinig geresorbeerd (behoudens bij aangeboren β -sitosterolemie of bij genetische mutatie aanwezig bij 20% van de bevolking) – de opname in de darm van een significant deel van de cholesterol inhiberen.

Zodra cholesterol – vrij en veresterd – opgenomen is, wordt die in de chylomicronen geïntegreerd; het opnemen van de *chylomicron-remnants* en van de IDL door de lever draagt bij

tot de cholesterol*pool* in de lever, die men intracellulair in vrije of veresterde vorm aantreft dankzij de inwerking van het AcylCoA acyltransferase (ACAT). De *pool* van vrij cholesterol beïnvloedt de integratie ervan in het membraan en zijn regulerende werking, met name bij de synthese van de LDL leverreceptoren (Apo B en Apo E receptoren). Intracellulaire cholesterol die in de lever eveneens van de de-novo synthese van cholesterol afkomstig is, beheert hierdoor het gehalte aan circulerende LDL.

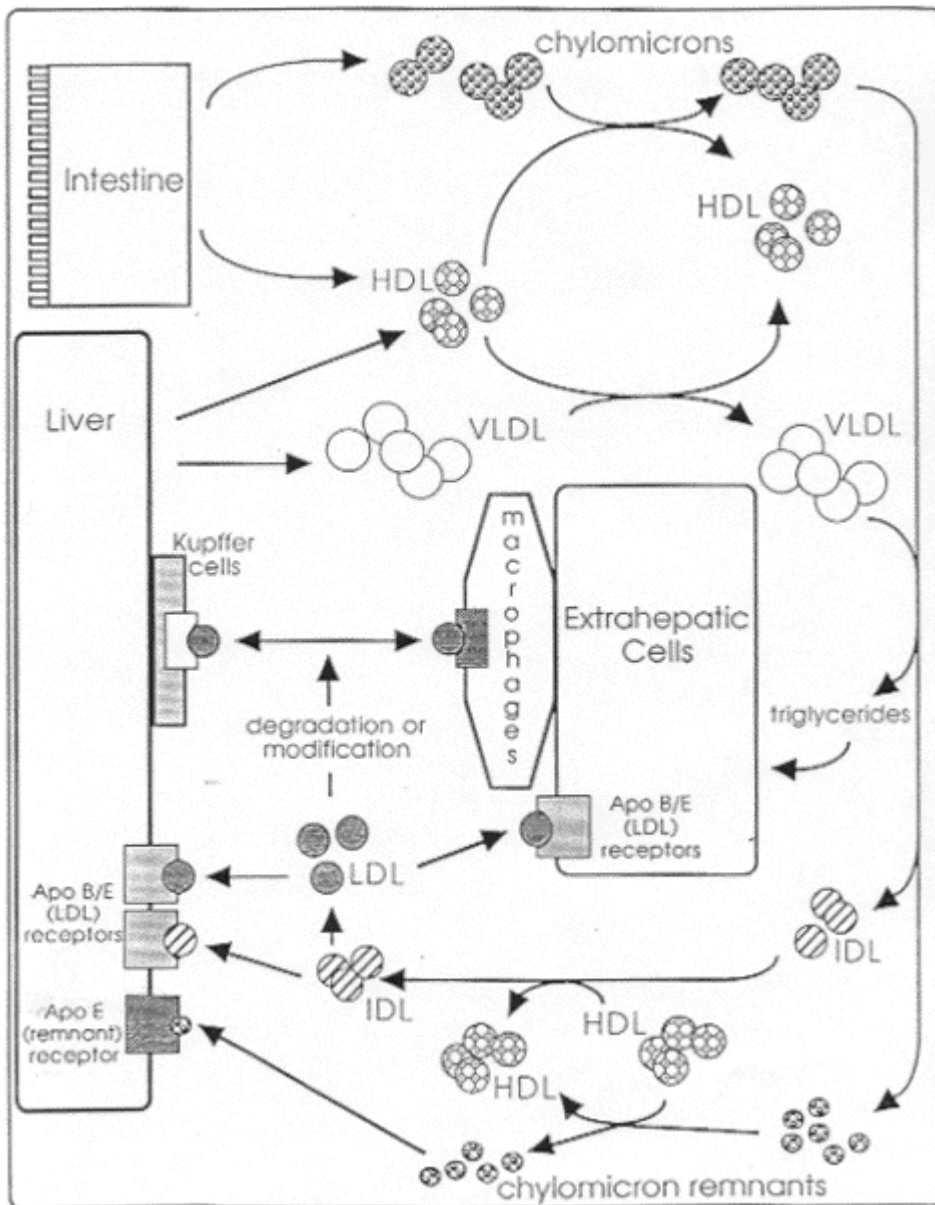
De lever zorgt, samen met onder meer de darm, ook voor de aanmaak van de natieve HDL, die een sleutelrol zullen spelen bij het omgekeerde cholesteroltransport, waardoor het leverweefsel het teveel aan cholesterol van de perifere weefsels kan verwerken. De lever kan een sleutelrol spelen bij het cholesterolkatabolisme, waarbij in de eerste lijn primaire galzuren (cholzuur en chenodeoxycholzuur geconjugeerd met taurine of glycine) gevormd worden.

Ook al wordt een groot deel van de galzuren die via de galafscheiding in het darmlumen terecht komt, via de enterohepatische cyclus opnieuw geabsorbeerd, toch bereikt een fractie de dikke darm, waar de anaërobe bacteriën ze tot secundaire galzuren (lithochol-, deoxycholzuur) omvormen. Deze laatste kunnen dan zelf opnieuw geabsorbeerd worden of met de faeces uitgescheiden. Dit is de enige kwantitatieve uitscheidingsweg voor de overtollige cholesterol.

2.2.5.4. Metabolisme van de oxidatieve afbraakproducten van vetten

Onze voeding bevat niet te verwaarlozen concentraties van vetoxidatieproducten, die men voor het grootste deel terugvindt in zuivelproducten, eieren, vlees en vis. De oxidatieproducten van cholesterol zijn eveneens aanwezig in bijvoorbeeld de bakkerijproducten, die eieren en/of vetstoffen bevatten. De opname in de darm van deze oxidatieproducten werd tot op heden nog maar weinig onderzocht. Een studie heeft echter aangetoond dat er bij de mens een proportionele verhouding bestaat tussen de inname van geoxideerde vetten enerzijds en anderzijds de integratie van geconjugeerde diënen (vroegtijdige producten van de vetoxidatie) en van alfa-epoxycholesterol in de chylomicronen, maar ook in andere lipoproteïne fracties (Staprans et al., 2005). Door gebruik van gehydroxyleerde vetzuurderivaten gemerkt met het isotoop ¹³C en door de metabolieten op te volgen hebben Wilson et al. (2002) met een doelgerichte techniek aangetoond dat de toename van hun concentratie in het serum die van de TG voorafging, wat een andere tot op heden onverklaarde absorptiekinetiek doet vermoeden. Voorts blijkt er een grote individuele variabiliteit te bestaan wat de biologische beschikbaarheid van die oxidatieproducten betreft. Het is algemeen aanvaard dat de hydroxyperoxiden van vetzuren in grote mate in gehydroxyleerde vetzuren omgezet worden voor hun opname in de darm. Niettemin zijn geïsoleerde chylomicronen van mensen na consumptie van geoxideerde vetten gevoeliger voor *ex vivo* peroxidatie, wat doet vermoeden dat toch een niet te verwaarlozen deel hydroxyperoxidenderivaten van vetzuren de bloedsomloop bereikt. Dit moet echter nog aangetoond worden (Wilson et al., 2002).

Kort samengevat is de biologische beschikbaarheid van de vetoxidatieproducten en hun impact op de toxiciteit van vetrijke diëten tot op heden nog maar weinig onderzocht, maar er zijn voldoende argumenten om aan te nemen dat dit proces verre van verwaarloosbaar is.



Figuur 22. Metabolisme van de lipoproteïnen.

2.2.6 Literatuurstudie rond de toxiciteit van vetoxidatieproducten

De problematiek van geoxideerde vetten in voeding wordt reeds ten dele behandeld in een vorig document van de Hoge Gezondheidsraad (HGR 7945: Aanbevelingen en beweringen betreffende de omega-3- vetzuren, versie 2004, p. 78-80). Zowel geoxideerde vetzuren (in relatie tot ontwikkeling van atherosclerose) als oxisterolen worden daar behandeld. In de hiernavolgende tekst worden enkele aanvullingen op dit rapport gegeven.

2.2.6.1. Invloed van geoxideerde lipiden op gezondheid

Geoxideerde vetten worden teruggevonden in lipoproteïnen. LDL- oxidatie is een progressief proces dat leidt tot de vorming van mild tot sterk oxLDL, aangerijkt met potentieel toxische, geoxideerde vetcomponenten (aldehyden, oxisterolen, lipide peroxiden, enz.). oxLDL leidt tot modificaties van cellulaire eiwitten, oxidatieve stress, peroxidatie van lipiden, wijziging van signaal transferreacties en genexpressie. oxLDL is tevens een belangrijke component bij de vorming van atherosclerotische plaques in de bloedvaten (Salvayre et al., 2002; Turner et al., 2006).

Billek (2000) geeft een algemeen overzicht van de gezondheidsaspecten van geoxideerde oliën en vetten. Belangrijke conclusies in de studie zijn:

- Het voederen van sterk oververhitte plantaardige oliën (bv. op 250-300°C voor 6-24h) aan ratten (20% in voeder) geeft gewichtsverlies en hoge mortaliteit. De toxiciteit is vooral geassocieerd met de destilleerbare fractie; de gepolymeriseerde fractie geeft diarree maar is minder toxisch. Deze situatie is minder relevant voor de praktijk, aangezien dergelijke oliën en vetten niet voor humane voeding worden verwerkt.
- Drie generaties ratten werden gevoederd met onverhitte versus gefrituurde soja en aardnootolie (8h bij 175°C gedurende 10 dagen; het gehalte totaal polair materiaal (TPM) bedroeg 20-25%) aan 10% in het voeder. Gedurende de volledige studieduur (10 jaar) werd geen verschil gevonden tussen de controle en de interventiegroep. Gebruik van frituuroliën die voldoen aan de opgestelde kwaliteitscriteria (voor de studie TPM < 24-25%) heeft bijgevolg geen negatieve invloed op de gezondheid van de proefdieren.
- Wanneer ratten gedurende 1,5 jaar worden gevoederd met de TPM- fractie (bevat een groot deel van de geoxideerde componenten) uit verhitte zonnebloemolie (20% in voeder) wordt in vergelijking met de onverhitte olie een lagere gewichtstoename, een groter gewicht voor lever en nieren en hogere serum transaminase activiteit bij de proefdieren weergevonden. Geoxideerde polaire componenten in verhitte oliën en vetten vragen extra aandacht wat hun toxiciteit betreft.

De aangehaalde resultaten zijn van toepassing op geoxideerde componenten in frituuroliën. Voor gebruik van minder intens verhitte oliën en vetten met toepassing in diverse levensmiddelen gelden mogelijk andere criteria.

2.2.6.2. Overzicht van de verschillende klassen geoxideerde vetten

In het recente overzicht van Berliner & Zimman (2007) worden drie verschillende klassen van geoxideerde vetten besproken, afgeleid van respectievelijk vetzuren, PL en cholesterolesters. Vele van deze geoxideerde vetten worden in toenemende mate erkend als determinanten in het ontstaan van ziekten bij de mens, waarbij hun invloed vooral gerelateerd wordt met verstoring van unieke signaalprocessen en receptorgemedieerde functies in het lichaam. Verder onderzoek is echter nodig om deze rol beter te begrijpen en het belang en gebruik van verschillende soorten geoxideerde vetten als procescontaminant in levensmiddelen en als biomarker in lichaamssweefsels beter te onderbouwen.

2.2.6.2.1. Geoxideerde vetzuren

Belangrijk zijn:

1) lipoxines (oxidatieproducten van arachidonzuur) en resolvines (oxidatieproducten van omega-3- poly-onverzadigde vetzuren) die een rol spelen in het inflammatieproces. Lipoxines verstoren de activiteit van neutrofielen (bijvoorbeeld bij astma, colitis en cystische fibrose). Lipoxine- en resolvinereceptoren werden onlangs geïdentificeerd. Omtrent de enzymatische en niet-enzymatische synthese en omzetting van lipoxines en resolvines in het lichaam is meer onderzoek nodig;

2) isoprostanen (ontstaan door niet- enzymatische oxidatie van arachidonzuur) die gebruikt worden als indicatoren voor oxidatieve stress. Het gebruik van F2-isoprostanen als biomarker werd reeds gevalideerd voor atherosclerose, Alzheimer, autisme en astma. Isoprostanen bezitten verder een biologische activiteit, bv. vasoconstrictie en bronchoconstrictie (15-F2 en 15-E2) of inhibitie van de aggregatie van bloedplaatjes (15-F2). Een receptor voor F2-isoprostanen werd reeds geïdentificeerd. Tijdens inflammatie en oxidatieve stress kunnen echter meerdere isoprostanen worden gevormd die tot nog toe onvoldoende werden onderzocht. Bovendien is meer informatie nodig omtrent het metabolisme van deze verbindingen in het lichaam, aangezien individuen met een hoge activiteit aan degraderende enzymen valse waarden voor deze stoffen kunnen vertonen;

3) aldehyden afgeleid van geoxideerde poly-onverzadigde vetzuren, waaronder 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), malondialdehyde (MDA) en acroleïne.

Aldehyden (MDA, acroleïne, crotonaldehyde, 4-HNE) reageren met vrije thiolgroepen (glutathion en andere thiole) en met α -aminogroepen (lysine) en imidazolgroepen (histidine) in eiwitten. Deze aldehyde-eiwit adducten inhiberen enzymen, metabolische pathways en cel signaal transfer reacties (Salvayre et al., 2002; Takekoshi et al., 2003; O'Brien et al., 2005):

- 4-HNE remt de mitochondriale respiratie door inactivatie van α -ketoglutaarzuur/ pyruvaat dehydrogenase in de citroenzuurcyclus. Het remt tevens NADH-dehydrogenase van complex I (tijdens cardiale ischemie-reperfusie) en/of cytochroom-C-oxidase en glutathion (GSH) reductase.
- 4-HNE komt voor in de celkern, maar kan mogelijk ook interageren met de celkern vanaf de celmembraan. Het is een potentiële inhibitor van de celgroei (via de transcriptiefactor NF- κ B en via beïnvloeden van cell stress pathways, bv. JNK1,2 en AP-1).
- Acroleïne vormt een zeer reactief eiwit-carbonyl adduct (3-formyl-3,4-dehydropiperidinolysine), dat thiol-afhankelijke enzymen remt en covalente bindingen aangaat met GSH.

Inhibitie van metabolische pathways kan ten dele het toxisch effect van deze aldehyde derivaten verklaren. Vooral hydroxyalkenal en acroleïne zijn het meest toxisch (Salvayre et al., 2002). Naarmate de hydrofobiciteit en het elektrofiel karakter van het aldehyde-derivaat toeneemt, stijgt ook de cytotoxiciteit. Dit kan toegeschreven worden aan een verhoogde reactiviteit en een beter vermogen om carbonyl-metaboliserende enzymen (van belang bij detoxificatie) te inhiberen. Op basis van hun vermogen om hepatocyten te doden, kan de cytotoxiciteit van de volgende aldehyden als volgt gerangschikt worden : acroleïne > 4-HNE > crotonaldehyde. Inactivatie van antioxidant enzymen (glutathion reductase, glutathion peroxydase, glutathion transferase) verhoogt de oxidatieve stress in de cel. 4-HNE verhoogt de fibrinogeenvorming, wat belangrijk kan zijn bij het ontstaan van levercirrose en atherosclerose (O'Brien et al., 2005).

Afbraakproducten van alkenal zijn meer mutageen in vergelijking met malondialdehyde (MDA): acroleïne > crotonaldehyde > MDA. Pyrimido [1,2 α]-purine-10(3H)-one (M1G) is één van de belangrijkste DNA- adducten gevormd met MDA. Exocyclische propaan DNA- adducten ontstaan door reactie van 2-hexenal, 4-HNE, acroleïne en crotonaldehyde met DNA- deoxyguanosine. Alkenal en alkenal vormen tevens DNA-histon crosslinks (O'Brien et al., 2005).

Bij langdurige blootstelling (2 jaar) blijkt malondialdehyde (MDA) carcinogeen (schildklier-kanker) in ratten. De incidentie van leverkanker bij de rat neemt met 7% toe bij een dagelijkse inname van 4 mg/kg crotonaldehyde via het drinkwater. Acroleïne tweemaal per week toegediend aan 2 mg/kg *ip* induceert blaaskanker bij de rat. Het gehalte exocyclische propaan DNA- adducten neemt significant toe bij rokers (x4) en bij ratten met verlaagde GSH gehalten in de lever (tot x21). Acroleïne en crotonaldehyde worden door de IARC (*International Agency for Cancer Research*) geklasseerd als groep 3 agentia. Crotonaldehyde wordt aanzien als mogelijk carcinogeen bij de mens, maar acroleïne heeft voorlopig geen classificatie wegens gebrek aan voldoende informatie (O'Brien et al., 2005).

Bij neurodegeneratieve ziekten (Alzheimer, Parkinson) worden hogere gehalten aan 4-HNE in het cerebrospinaal vocht en 4-HNE-eiwit adducten in de aangetaste regio's van de hersenen teruggevonden. 4-HNE en acroleïne zijn cytotoxisch voor neuronnen, voornamelijk omwille van hun hoge mitochondriale toxiciteit.

2.2.6.2.2. Oxidatieproducten van fosfolipiden

De hoger beschreven oxidatieproducten kunnen ook actief zijn wanneer gebonden aan PL. Geoxideerde PL werden in verband gebracht met atherosclerose, type 2 diabetes en leverziekten (alcoholmisbruik). Voor de geoxideerde fractie van enkele goed gekarakteriseerde PL (bv. 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine) werden specifieke gezondheidseffecten beschreven (Berliner & Zimman, 2007):

- regulatie genexpressie in endotheliale cellen;
- accumulatie in atherosclerotische plaques en in cellen onder apoptose of onderworpen aan oxidatieve stress.

2.2.6.2.3. Cholesteroloxiden

Oxidatieproducten van cholesterol, zgn. oxisterolen, induceren apoptose en necrose. Oxisterolen zijn aanwezig in celmembranen, waar zij zowel de membraanstructuur als de membraanfunctie beïnvloeden. Zij kunnen eveneens het gehalte aan intracellulair calcium verhogen, wat resulteert in apoptose. Oxisterolen kunnen ook binden aan oxisterol bindende eiwitten die participeren in intracellulair oxisterol transport en regulatie van genexpressie bij apoptose (O'Brien et al., 2000; Salvayre et al., 2002).

Oxisterolen kunnen toxische, inflammatoire en finaal ook atherogene effecten induceren. Zij kunnen voorkomen in LDL, vooral bij hypercholesterolemische individuen. Zij dragen vermoedelijk bij tot de opname van gemodificeerd (geoxideerd) LDL in de vaatwand en de toename in fagocytose activiteit (vorming van schuimcellen) (Leonarduzzi et al., 2002).

2.2.6.2.4. Epoxyderivaten van poly-onverzadigde vetzuren

Studies naar toxiciteit van epoxyderivaten van poly-onverzadigde vetzuren blijven vooralsnog beperkt. Er bestaat een duidelijke belangstelling omtrent verschillen in toxiciteit tussen epoxiden van vetzuren en hun metabolische omzettingsproducten (bv diolen). Onderzoek met celculturen (Sf-21 insectencellen) heeft aangetoond dat zowel mono-epoxiden van linolzuur als de daarvan afgeleide diolen toxisch kunnen zijn ter hoogte van de elektronentransportketen in de mitochondria. (Moran et al., 2001).

2.2.6.2.5. Furaan

Furaan wordt snel geadsorbeerd en gemetaboliseerd. In de lever gebeurt een omzetting tot cis-2-buteen-1,4-dialdehyde, dat verder urinair wordt uitgescheiden. Een hoge dosis furaan (250 mg/kg lg) induceert wijzigingen in het chromosoom van beenmergcellen bij de muis. Ook cis-2-buteen-1,4-dieen reageert met DNA en heeft mutagene eigenschappen. Furaan of zijn metabolieten verlagen de ATP- productie door het irreversibel ontkoppelen van mitochondriale oxidatieve fosforylatie in de lever. Door activatie van endonucleasen ontstaan breuken in het DNA gevolgd door geprogrammeerde celdood (Crews & Castle, 2007).

Furaan is een potentieel carcinogene verbinding. Bij ratten en muizen wordt bij dosissen van 20 tot 160 mg/kg (duur studie 16 dagen) een toegenomen mortaliteit vastgesteld. Bij middellange studies (13 weken) met lagere dosissen (15 mg/kg) wordt gewichtsverlies, toename in lever en niermassa, daling in gewicht van de thymus en toxiciteit in lever en nieren vastgesteld. Dosissen van 15 mg/kg toegediend bij lange termijn studies (5 dagen per week, 2 jaar), geven gewichtsverlies en toename van levercarcinomas. Momenteel zijn er geen data beschikbaar omtrent toxiciteit tijdens de ontwikkeling en reproductie. Er werden ook geen studies uitgevoerd bij de mens (Heppner & Schlatter, 2007).

2.2.6.3. Kwantitatieve evaluatie van inname vetoxidatieproducten bij de mens

Momenteel zijn er geen betrouwbare kwantitatieve data beschikbaar omtrent inname van geoxideerde vetten via de voeding. Deze informatie is essentieel om in te schatten of het aandeel geoxideerde vetten in het huidig voedingspatroon kan bijdragen tot de hoger beschreven fysiologische effecten. Enkele belangrijke problemen bij het uitwerken van deze studies zijn het ontbreken van informatie omtrent geoxideerde lipiden in levensmiddelen databanken, alsook het sterk toegenomen aandeel onzichtbare vetten in voedingsmiddelen, met de hierbij ontbrekende informatie omtrent receptuur van samengestelde levensmiddelen (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003).

Er zijn wel studies gepubliceerd omtrent inname van geoxideerde lipiden op beperkte groepen personen in gecontroleerde omstandigheden. Diabetespatiënten met lage glycemische controle vertonen postprandiaal een hoger en langer aangehouden aandeel geoxideerde lipiden in chylomicronen, vergeleken met een controlegroep van gezonde volwassenen en diabetici met goede glycemische controle. Tijdens de studie werd een voeding van 1ml maïsolie/kg lichaamsgewicht met een laag (40-99 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TG) respectievelijk hoog (100-200 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TG) gehalte geoxideerde lipiden vergeleken. 200 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TG kwam overeen met 220-350 μmol lipideperoxiden/ mmol TG en 4-10 μmol TBARS/ mmol TG (Staprans et al., 1999). Bij gezonde volwassenen werd in lipoproteïnen een verhoogde gevoeligheid voor oxidatie vastgesteld na consumptie van verhitte oliën rijk aan geoxideerde lipiden (12-26,4 mmol/kg peroxiden en 24,1-57,9 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ geconjugeerde diënen) t.o.v. niet-verhitte oliën (6,4-6,8 mmol/kg peroxiden en 12,6-22,5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ geconjugeerde diënen) (Sutherland et al., 2002). In het algemeen blijft deze opgegeven informatie omtrent oxidatieproducten in de geteste oliën en vetten tijdens interventiestudies echter te laag en te weinig gedetailleerd om een duidelijke relatie tussen inname van oxidatieproducten en optreden van fysiologische effecten vast te stellen (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003).

2.2.7 Risicobeoordeling

2.2.7.1. Inleiding

De risicobeoordeling van het verbruik van geoxideerde vetstoffen is een belangrijke fase om, indien nodig, acties te ondernemen t.b.v. de overheid, de bedrijven en de verbruikers.

Deze vraag wordt echter bemoeilijkt door het aantal voedingsproducten die vetstoffen bevatten en nog meer door het grote aantal moleculen die van de oxidatiereacties afkomstig kunnen zijn.

De risicobeoordeling voor de mens geschiedt over het algemeen in vier fasen (EFSA, 2009):

1. gevareninventarisatie
2. gevarenkarakterisatie
3. blootstellingschatting van de bevolking
4. risicokarakterisatie (gebruik van de fasen 2 en 3)

De werkgroep heeft besloten om te mikken op vier moleculen, gelet op hun kankerverwekkend en genotoxisch of mogelijk kankerverwekkend en genotoxisch vermogen voor de mens.

Deze vier moleculen zijn:

- acroleïne
- crotonaldehyde
- malondialdehyde
- 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)

Gelet op het carcinogene risico van deze moleculen is een recente benadering in het evaluatieproces ingevoerd: de **margin of exposure (MOE)** (EFSA/WHO, 2006).

Het begrip MOE werd in 2005 door EFSA ingevoerd om prioriteiten te kunnen stellen in de risicobeheersing van kankerverwekkende stoffen waarvan de blootstelling niet te vermijden is. MOE wordt uitsluitend voor zulke stoffen gebruikt. Hoe belangrijk is een dergelijk carcinogeen in het gebruikelijk voedselconsumptiepatroon? Is er al of niet reden voor bezorgdheid voor de volksgezondheid?

Voor de berekening zijn twee gegevens nodig: de BMDL- waarde voor proefdieren en de geschatte blootstelling van de mens aan het carcinogeen.

BMDL (*Benchmark Dosis Lower Confidence Limit*) staat voor de laagste dosis die met 95% zekerheid in 10 % van de gevallen bij proefdieren tot kanker leidt. Dit is 10 % boven de controle (knaagdieren kunnen ook spontaan kanker krijgen zonder toediening van het carcinogeen, vaak op hoge leeftijd). Men spreekt soms ook van BMDL₁₀

Ze wordt uitgedrukt in mg, µg of ng/kg lg per dag voor het betrokken proefdier.

De **MOE**- waarde wordt berekend door de **BMDL voor dieren te delen door de geschatte menselijke blootstelling**.

Men is ook overeengekomen dat een MOE- waarde van **10.000 of hoger** geen reden geeft tot bezorgdheid voor de volksgezondheid en dat voor de overheid maatregelen voor risicobeheersing dan niet direct prioritair zijn.

2.2.7.2. Toepassing van de vier risicobeoordelingsfasen

2.2.7.2.1. Acroleïne

2.2.7.2.1.1. Gevareninventarisatie

Acroleïne is een oxidatieproduct van vetten dat men met name terugvindt wanneer deze bij te hoge temperatuur verhit worden (cfr. hoofdstuk Nr. 2.2.4. omtrent de identiteit van vetoxidatieproducten).

2.2.7.2.1.2. Gevarenkarakterisatie

Er werden studies gevoerd over de mutageniteit *in vitro* en de verbinding met DNA en dat met en zonder metabole activatie. De testen zijn positief gebleken (WHO, 2002) betreffende de mutageniteit op bacteriecellen, gekweekte zoogdiercellen, hamster-eierstokcellen en menselijke lymfocyten (testen van chromosoomafwijkingen en zusterchromatiden-uitwisselingen).

Andere studies werden op dieren uitgevoerd:

- Een intraperitoneale inspuiting, tweemaal per week, van een dosis van 2mg/kg lichaamsgewicht bijvoorbeeld veroorzaakt blaaskanker bij de rat (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.6. omtrent de toxiciteit van vetoxidatieproducten).
- Langetermijnstudies bij de rat en de muis hebben een toename van de mortaliteit aangetoond zonder verklaring hiervoor (WGO, 2002).

Acroleïne is mogelijk kankerverwekkend en genotoxisch (WGO, 2002), wat het belang aantoont om de bestudering ervan voort te zetten.

Er werd voorlopig een toelaatbare dosis van 7,5 µg/kg lg/dag (WHO, 2002) vastgesteld.

2.2.7.2.1.3. Blootstellingschatting van de bevolking

Er werden veel studies uitgevoerd in het kader van de risicobeoordeling van acroleïne door inademing. Belangrijke innamen worden genoteerd door inhalatie in gesloten ruimten (o.m. via sigarettenrook).

Er bestaan maar weinig gegevens over de aanwezigheid in de voedingsmiddelen. WGO (2002) geeft aan dat, op basis van een redelijk beperkt aantal data, acroleïnegehalten in voedingsmiddelen bijna steeds lager zijn dan 40 µg/g en voor de meeste producten zelfs lager zijn dan 1 µg/g. Waarden hoger dan 1 µg/g worden gevonden in verhitte plantaardige oliën, maar ook in sommige gerijpte kaassoorten en in rode wijn. Verder dient aangegeven dat acroleïne niet enkel afkomstig kan zijn van vetten, maar eveneens uit koolhydraten en specifieke aminozuren (Stevens & Maier, 2008).

2.2.7.2.1.4. Risicokarakterisatie

Bij gebrek aan toxicologische gegevens heeft het IARC acroleïne niet in de lijst van kankerverwekkende stoffen kunnen onderbrengen, maar het mogelijk risico blijft behouden. Bij gebrek aan kwantitatieve gegevens betreffende de aanwezigheid van de molecule in levensmiddelen, is bijgevolg een risicokarakterisatie heden onmogelijk.

2.2.7.2.2. Crotonaldehyde

2.2.7.2.2.1. Gevareninventarisatie

Crotonaldehyde is eveneens een oxidatieproduct van vetten (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.4.).

2.2.7.2.2.2. Gevarenkarakterisatie

Minstens twee studies maken het mogelijk om het gevaar te karakteriseren.

Een studie bij de rat wijst op een toename van 7% leverkanker bij een dagelijkse inname van 4 mg/kg lichaamsgewicht in het drinkwater (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.6.).

Deze studie had betrekking op 27 dieren gedurende 113 weken (langetermijnstudie) met gebruik van dosissen van 0,6 mM en 6,0 mM in het drinkwater (Chung et al., 1986).

Voor een dosis van 0,6 mM, werden er neoplastische leverletsels (6/27) en levercelcarcinomen vastgesteld (2/27) met een beduidend hogere incidentie dan voor de controlegroep.

Voor een dosis van 6,0 mM, werd er bij 10 van de 27 dieren leverschade vastgesteld die soms zeer ernstig was. Voor die dosis werd er bij de rat evenwel geen enkele preneoplastisch of neoplastisch letsel vastgesteld. Dit wijst waarschijnlijk op de noodzaak om een bijkomende cancerogeniteitsstudie uit te voeren.

Op dit ogenblik kan crotonaldehyde als een mogelijk carcinogeen beschouwd worden (Chung et al., 1986) en mogelijk mutageen (O'Brien et al., 2005).

De dosis zonder effect lijkt niet bekend te zijn.

2.2.7.2.2.3. Blootstellingschatting van de bevolking

Het aantal studies aangaande crotonaldehyde is beperkt. Eén studie werd besproken door Eder & Budiawan (2001). Innamen zijn weergegeven voor fruit en groenten, vis, vlees en alcoholische dranken (whisky, wijn). De hoogste innamen worden gevonden voor vis (tot 3,1 µg/kg lg) en wijn (tot 5,9 µg/kg lg). Deze innamen blijven relatief laag in vergelijking met inhalatie door sigarettenrook (44-140 µg/kg lichaamsgewicht).

2.2.7.2.2.4. Risicokarakterisatie

De studie van Eder & Budiawan (2001) betreft een risk assessment studie voor inname van crotonaldehyde via de voeding, met een geschat risico op het ontstaan van hepatocellulaire carcinomen, en vorming van DNA-adducten van levercellen. Het geschat kankerrisico is afhankelijk van het ingenomen product en is het grootst bij inname van vis (9-130 incidenties/10⁶ personen) en wijn (90-240 incidenties/10⁶ mensen). In analogie met de inname is het geschat risico in vergelijking met rookgedrag zeer laag (1800-5700 incidenties/10⁶ mensen). De vorming van DNA-adducten haalt enkel de detectielimiet (0,3 adducten/10⁸ nucleotiden) ingeval van vis en wijn. Bij inhalatie van sigarettenrook bedraagt dit 0,3-0,6 adducten/10⁸ nucleotiden.

2.2.7.2.3. Malondialdehyde

2.2.7.2.3.1. Gevareninventarisatie

Malondialdehyde is een oxidatieproduct van vetten (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.4.). De molecule is mutageen en dus mogelijk kankerverwekkend (O'Brien et al., 2005).

2.2.7.2.3.2. Gevarenkarakterisatie

Meerdere studies vermelden mutagene effecten van malondialdehyde met *Salmonella typhimurium* (Basu & Marnett, 1983), met *Escherichia coli* (Benamira et al., 1995), met menselijke cellen (Niedernhofer et al., 2003) alsmede door malondialdehyde veroorzaakte DNA-schade (Marnett, 1999 ; Leuratti et al., 1998).

Een 90-dagen studie in de muis (Siu et al, 1983) aan verschillende dagdosissen (2, 10, 50, 250, 500 µg/g lichaamsgewicht) heeft dosisgerelateerde effecten in de lever aangetoond (anisokaryose, hyperchromiciteit, vesiculatie). Voor de hoogste dosis zijn er pancreasbeschadigingen zichtbaar geworden.

In een studie gedurende 2 jaar bij de rat voor een dosis van 500 µg/g lg/dag zijn pancreasbeschadigingen gebleken (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.6.). Er werd bovendien een geval van schildklierkanker vastgesteld.

2.2.7.2.3.3. Blootstellingschatting van de bevolking

Er lijken geen gegevens te bestaan om de blootstelling van de bevolking aan malondialdehyde te kunnen schatten.

2.2.7.2.3.4. Risicokarakterisatie

Er zijn geen gegevens genoeg om een risicobeoordeling uit te voeren.

2.2.7.2.4. 4-HNE

2.2.7.2.4.1. Gevareninventarisatie

4-HNE is een oxidatieproduct van vetten (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.4.), dat in Zuid-Korea in verrijkt melkpoeder voor zuigelingen en jonge kinderen teruggevonden werd (cfr. hoofdstuk nr. 2.2.6. ; O'Brien et al., 2005 ; Siu et al., 1983) en in gehakt (O'Brien et al., 2005).

2.2.7.2.4.2. Gevarenkarakterisatie

4-HNE vertoont cytotoxische effecten en is een mogelijke inhibitor van de celgroei (O'Brien et al., 2005).

Studies zijn noodzakelijk om de mutagene en kankerverwekkende risico's, de doelorganen en de NOAEL-dosis (*no observed adverse effect level*) te beoordelen.

2.2.7.2.4.3. Blootstellingschatting van de bevolking (Surh et al., 2007)

De aanwezigheid van 4-HNE werd in (met meervoudig onverzadigde vetzuren verrijkte) voedingsproducten voor zuigelingen en jonge kinderen aangetoond. Deze studie werd in Zuid-Korea uitgevoerd.

Tabel 1 vat de belangrijkste resultaten kort samen.

Tabel 1: Onderzoek van 4-HNE in de met meervoudig onverzadigde vetzuren verrijkte voedingsmiddelen.

	aantal onderzoeken	dag 0 in µg/kg	dag 10 in µg/kg
Voor zuigelingen	7	36-116	135-572
Voor jonge kinderen	12	41-132	79-792

Dergelijke studie lijkt in België nog niet te zijn uitgevoerd.

2.2.7.2.4.4. Risicokarakterisatie

Gelet op de aanwezigheid ervan in de voeding van zuigelingen en jonge kinderen, moet er voorrang gegeven worden aan deze molecule.

In afwachting van resultaten herinnert de HGR eraan dat het ALARA-principe (*as low as reasonably achievable*) in de nijverheid moet worden toegepast.

2.2.7.3. Algemene opmerking

Ook al worden er vele mutageniteitstesten uitgevoerd, toch stemmen die vaak niet overeen met de vereisten zoals voorgeschreven door de gids voor het opsporen van de mutageniteit (WGO, 1985).

Het betreft basistesten:

- mutageniteitstest met bacteriën, *Salmonella typhimurium*
- chromosoomafwijkingen
- veroorzaakte DNA-schade
- genmutatietest in eukaryote cellen

Minstens de twee eerste testen moeten worden uitgevoerd.

3. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

De huidige kennis op het gebied van voeding en gezondheid toont het hele belang aan van een evenwichtige voeding en, wat de vetten betreft, de noodzaak in onze streken om de verhouding te verhogen tussen oliën rijk aan meervoudig onverzadigde vetzuren van het ω -3- en ω -6-type en de andere verbruikte vetproducten.

Dergelijke voedingsaanbevelingen moeten echter vergezeld gaan van een toegenomen waakzaamheid op de wijze van fabriceren, bewaren en gebruiken van de verschillende producten. Deze waakzaamheid moet vanaf de producent t/m bij de verbruiker worden uitgeoefend en ook de overheid heeft hier een taak.

De producten rijk aan meervoudig onverzadigde vetzuren zijn immers veel gevoeliger voor bederf door oxidatie, met als gevolg een verlaagde nutritionele en sensorische kwaliteit maar ook toegenomen gezondheidsrisico's.

De oxidatie betreft natuurlijk niet enkel de TG, de belangrijkste bestanddelen van de voedingsoliën en -vetten. Andere kleine bestanddelen zijn eveneens gevoelig voor oxidatie.

Goede fabricagepraktijken, de aanwezigheid van antioxiderende bestanddelen en goede gebruikspraktijken maken uiteraard deel uit van de te nemen maatregelen ter beperking van de risico's. Dat neemt niet weg dat die oxidatierisico's groter zijn voor de voedingsmiddelen rijk aan meervoudig onverzadigde vetzuren, dat de oxidatieve afbraak een zeer complex verschijnsel is en dat de literatuur aantoont dat die nadelige gezondheidseffecten kan hebben.

Het bederf van vetten is een complex verschijnsel waarvoor een algemene aanpak nodig is om er de gezondheidsrisico's van te beoordelen, maar die benadering stuit voor het ogenblik op een gebrek aan gegevens en kennis op verschillende vlakken.

De oxidatie kan zich enerzijds voordoen bij de grondstoffen, gedurende hun opslag, tijdens de extractie- en verwerkingsprocedures van de oliën of tijdens de vervaardiging van meer verwerkte voedingsmiddelen zoals margarine, mayonaise, enz. De oxidatie kan zich ook nog voordoen of ontwikkelen na de fabricage, in de handelscircuits t/m bij de verbruiker.

Men heeft anderzijds ook al veel oxidatieve afbraakproducten kunnen identificeren. De ontwikkeling van de analyse- en identificatiemethoden laat ons hopen dat er nog andere in de toekomst ontdekt zullen worden, gelet op de complexiteit van het verschijnsel. Men moet in het bijzonder de mogelijkheden onderstrepen van het verloop van de gevormde producten alsmede het risico van reacties van de gevormde moleculen met andere moleculen of andere afbraakproducten.

De studie van de biologische beschikbaarheid van de oxidatieproducten van vetten en de impact van dit verschijnsel op de toxiciteit van vetrijke diëten blijft tot op heden weinig onderzocht, maar voldoende argumenten doen veronderstellen dat dit proces zeker niet te verwaarlozen is.

Men moet wel vaststellen dat de studies van de toxische effecten op de gezondheid zeer partieel blijven en vooral dat er nauwelijks of geen betrouwbare kwantitatieve gegevens bestaan betreffende de inname van geoxideerde vetten via de voeding.

Het is bijgevolg nauwelijks denkbaar om een kwantitatieve risicobeoordeling uit te voeren op grond van de huidige gegevens. Dat wil echter niet zeggen dat er op grond van de beschikbare kennis geen reden is tot zorg en dat maatregelen niet gerechtvaardigd zouden zijn.

1. Aanbevelingen voor **onderzoek**

Er zijn meer studies nodig, zowel vanuit toxicologisch oogpunt als wat de beoordeling van de blootstelling aan risicohoudende stoffen betreft.

1.a. De HGR beveelt vooral aan om de blootstelling te beperken en onderzoek uit te voeren op vier moleculen die hij heeft kunnen inventariseren: acroleïne, crotonaldehyde, malondialdehyde en prioritair de 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) die buiten Europa in bepaalde zuigelingen- en kindervoeding aangetoond werd. De HGR beveelt dus aan om in België en Europa een onderzoekscampagne betreffende deze molecule in de voedingsmiddelen van hetzelfde type op te starten.

1.b. De HGR beveelt ook een langetermijncarcinogeniteitstudie aan bij de rat voor crotonaldehyde om de resultaten van de studie van Chung, gebruikt door Eder en Budiawan voor het uitvoeren van hun risicobeoordeling, te bevestigen.

1.c. Ook al lijkt de prioriteit te moeten worden gelegd bij de vier bovenvermelde geïdentificeerde moleculen - het gaat inderdaad om genotoxische carcinogenen – toch zijn de effecten van andere moleculen zoals lipoxinen, geoxideerde sterolen, ...ook niet voldoende gekend.

1.d. De problematiek van de inname van oxidatieproducten zou nog moeilijker worden moest men rekening houden met hun mogelijke vorming via andere wegen (al dan niet via de voeding), bijvoorbeeld door sigarettenrook. De gezondheidsrisico's kunnen er sterk door toenemen. Daarom moeten deze andere blootstellingwegen in toekomstige blootstellingstudies bij de mens in acht worden genomen.

1.e. De HGR beveelt daarenboven aan om meer bijzonder onderzoek te doen rond sommige frituuroliën rijk aan ω -3 et ω -6 om hun weerstand tegen oxidatie na te gaan en de kennis over de eventuele gevormde afbraakproducten te verbeteren.

2. Aanbevelingen voor de **industrie**

Ondanks de complexiteit van een precieze en objectieve beoordeling, herinnert de werkgroep aan de belangrijke in zijn studie ontwikkelde principes die als aanbevelingen voor de industrie kunnen dienen.

2.a. Om de oxidatierisico's zoveel mogelijk te vermijden moet er bij verwerking en gebruik van vetten rekening worden gehouden met de aanwezigheid van meervoudig onverzadigde vetzuren (ω -6, ω -3) en andere moleculen die vatbaar zijn voor oxidatie, zoals vitamine E α -tocoferol en de andere tocoferolen), β -caroteen, de sterolen...

Onderzoek in dit domein wordt voortgezet om nieuwe moleculen afkomstig van de vetoxidatie te kunnen identificeren.

2.b. Men moet zoveel mogelijk de aanwezigheid van pro-oxidatieve metalen vermijden die als oxidatiekatalysator kunnen optreden (ijzer, koper) of minstens hun aanwezigheid beperken en te lang contact ermee vermijden.

2.c. Bij de verwerking van vetten in het algemeen (extractie, raffinage, bewaring) moet men trachten zoveel mogelijk de antioxidantia te behouden die er van nature in aanwezig zijn. Het bleken, de desodorisatie en in het bijzonder de fysische raffinage (distillatie) kunnen, als men daar niet voor oppast, een hoog tocoferolenverlies veroorzaken.

2.d. Door herhaalde verhitting aan een hoge temperatuur is frituurolie bijzonder gevoelig voor oxidatie. Te hoge temperaturen moeten vermeden worden (maximum 180°C) en ook de vorming

van luchtbellen die, geïncorporeerd in dunne olielaagjes, het contact met zuurstof maximaal bevorderen (schuimvorming). Om dit probleem te beperken, wordt het gebruik van antischuimmiddelen, zoals bijvoorbeeld dimethylpolysiloxaan (E900), in frituurolie soms door de industrie overwogen. De keuze van de gebruikte olie is primordiaal en oliën rijk aan enkelvoudig onverzadigde vetzuren moeten aanbevolen worden.

2.e. In het bijzonder geval van frituuroliën rijk aan ω -3 et ω -6 lijken de risico's verbonden met een slechte gebruikspraktijk, zoals een langdurig gebruik, prioritair in aanmerking genomen te moeten worden, gelet op de handelsbelangen en zelfs belangen van nutritionele aard.

2.f. Bovendien moet er in een duidelijke en gemakkelijk leesbare etikettering worden voorzien.

2.g. Bij het continue gebruik in de industrie moet rekening worden gehouden met het risico van concentratie van sommige oxidatieproducten (polymeren bv.) als er geen strenge controle van de bestanddelen van de frituurolie, regelmatig met nieuwe olie aangevuld, uitgevoerd wordt.

3. Aanbevelingen voor de **horeca** en de **verbruiker**

3.a. Door herhaalde verhitting aan een hoge temperatuur is frituurolie bijzonder gevoelig voor oxidatie. Te hoge temperaturen moeten vermeden worden (maximum 180°C) en ook de vorming van luchtbellen die, geïncorporeerd in dunne olielaagjes, het contact met zuurstof maximaal bevorderen (schuimvorming). De keuze van de gebruikte olie is primordiaal en oliën rijk aan enkelvoudig onverzadigde vetzuren moeten worden aanbevolen.

3.b. Binnen frituren moet een aangepaste ventilatie aanwezig zijn om te beletten dat de persoon die voor het bakken zorgt, de dampen beladen met vluchtige, vaak toxische oxidatieproducten die uit de frituurbaden vrijkomen, inademt.

3.c. Geraffineerde vetten kunnen als dusdanig gebruikt worden (tafelolie, frituurolie), maar ook in geëmulgeerde vorm (margarine, mayonaise, enz.) of bij de bereiding van andere eetwaren. De HGR beveelt aan om de gebruikers, in het bijzonder de consument en de horeca, degelijk in te lichten over goede gebruikspraktijken voor deze producten: nood aan sensibilisering rond de risico's van "het warm houden" gedurende de tijd nodig tot het verbruik, bv. bij het transport van maaltijden naar de scholen, de ziekenhuizen, de alleenstaanden, enz., wat de oxidatierisico's doet toenemen.

3.d. Voedingsmiddelen in contact met de lucht koel bewaren en na gebruik snel weer op lage temperatuur brengen, ook al kan de oxidatie bij lage temperatuur en in de ingevroren producten doorgaan; de vervaldatum niet overschrijden, buiten lucht en licht bewaren, enz.

3.e. Er bestaat een toegenomen voorliefde voor "kant-en-klare producten". Door hun aard zijn die voedingsmiddelen gevoeliger voor oxidatie. De meeste hebben immers al een thermische behandeling ondergaan. Ze worden bovendien vaak blootgesteld aan licht en, ondanks het gebruik van antioxidantia, kunnen er al sommige oxidatieproducten aanwezig zijn.

4. Aanbevelingen voor de **overheid**

Wat de verwachtingen van de overheid betreft, is het, bij gebrek aan gegevens, onmogelijk om zich prioritair op een of ander risicoproduct toe te spitsen, behalve de hierboven vermelde producten, en met bijzondere nadruk op de voedingsmiddelen voor zuigelingen. Er bestaan gegevens over de inname van meervoudig onverzadigde vetzuren via de voedingsenquêtes in België. De producten type smeermargarine, chocopasta, mayonaise, zoete snacks, zoals koekjes, bevatten duidelijke hoeveelheden PUFA's. Al die producten hebben niet dezelfde levens- en bewaringsduur. De gegevens blijven dus onvolledig en op zichzelf maken ze het niet

mogelijk om een groep bijzondere voedingsmiddelen die verschillende oxidatieproducten kan bevatten, en de eruit voortvloeiende gezondheidsrisico's aan te wijzen.

4.a. Daarom beveelt de HGR aan om de initiatieven inzake analysemethodes van oxidatieproducten, vooral diegene die hij geïnventariseerd heeft, te ondersteunen en om eventueel een campagne voor analyse van sommige met PUFA'S verrijkte producten op te starten.

4.b. Studies over de veroudering van dergelijke producten lijken relevant.

4.c. Vanuit dit standpunt zijn de parameters die in de verschillende wetgevingen (eetbare oliën, margarines en eetbare vetten, frituurolieën en -vetten, ...) worden beschreven waarschijnlijk ontoereikend vanuit toxicologisch oogpunt, maar de meeste vermelde testen zijn indicatoren van verminderde kwaliteit van de producten die een indirect verband met de toxicologische problemen kunnen hebben. Bij gebrek aan een duidelijke identificatie van de meest toxische op te sporen moleculen, hebben de testen de verdienste dat ze het op de markt brengen van producten van algemene goede kwaliteit waarborgen, dus met minder toxicologische risico's (cfr. Bijlage: advies HGR 8148).

Jammer genoeg baseren die testen zich vaak op een schatting van globale parameters of een productenfamilie en dus niet op een dosering van zeer specifieke producten zoals degene die in deze studie opgesomd werden.

Na afloop van deze overwegingen heeft de HGR de omvang kunnen meten van de taak die hij zich heeft gesteld en van de moeilijkheden om die tot een goed einde te brengen.

Hij acht de problematiek echter voldoende belangrijk om er aandacht aan te blijven schenken, met name in het licht van de antwoorden die op zijn aanbevelingen kunnen worden gegeven

4. REFERENTIES

- Armand M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(2):156-64.
- Basu AK, Marnett LJ. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 1983; 4(3):331-3.
- Bauchart D, Gruffat D, Graulet B, Durand D. Production et stockage des triglycérides par le foie *Cah Nutr Diet* 1997; 32 (4):324-41.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. *Food Chemistry*. 3rd ed., Berlin : Springer-Verlag, 2005; 1070 p.
- Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ. Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 1995; 16(1):93-9.
- Berliner JA, Zimman A. Future of toxicology--lipidomics, an important emerging area for toxicologists: focus on lipid oxidation products. *Chem Res Toxicol* 2007; 20(6):849-53.
- Beylot M, Forcheron F, Letexier D. Chapter 10 Triacylglycerols and cholesterol metabolism in *Handbook of Prebiotics* Roberfroid M, Gibson G, editors. Florida (US): Taylor and Francis press 2007.
- Billek G. Health aspects of thermoxidized oils and fats. . *Eur J of Lipid Sci and Technol* 2000; 102:587-93.
- Choe E, Min DB. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation *Compr Rev in Food Science and Food Safety* 2006; 5:169-86.
- Christie WW, Dobson G. Formation of cyclic fatty acids during the frying process. *Eur J of Lipid Sci and Technol* 2000; 102 (8-9) : 515–520.
- Chung FL, Tanaka T, Hecht SS. Induction of liver tumors in F344 rats by crotonaldehyde. *Cancer Res* 1986; 46(3):1285-9.
- Crews C, Castle L. A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. *Trends in Food Sci & Technol* 2007; 18:365-72.
- Debacker N, Temme L, Cox B, Huybrechts I, Van Oyen H. *De Belgische voedselconsumptiepeiling 2004. Voedingsgewoonten van de Belgische bevolking ouder dan 15 jaar. Uitgave van het WIV.: 2007.*
- De Greyt W. *Effect of physical refining on selected minor components in vegetable oils.* Ghent University; 1998.
- De Greyt W, Kellens M. *Refining Practice In: Hamm W, Hamilton RJ, editors. Edible Oil Processing.* Sheffield: Sheffield Academic Press; 2000. p. 79-127.
- Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(2):142-8.

- Delzenne NM. Modulation nutritionnelle du métabolisme des triglycérides in *Aliments fonctionnels*. . In: Roberfroid MB, Coxam V, Delzenne N, editors. 2nd ed: Lavoisier; 2008. p. 485-97.
- Dobarganes C, Marquez-Ruiz G. Oxidized fats in foods. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(2):157-63.
- Eckel RH. Mechanisms of the components of the metabolic syndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. *Proc Nutr Soc* 2007; 66(1):82-95.
- Eder E, Budiawan. Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD(50) and comparison with 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adduct levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(8):883-8.
- EFSA - European Food Safety Authority. Transparency in Risk Assessment Scientific Aspects. . *EFSA J* 2009; 1051:1-22.
- EFSA - European Food Safety Authority, WHO - World health Organization. Risk Assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic. Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe *Food Chem Toxicol* 2006; 44:1636-50.
- Fils JM. The Production of Oils In: Hamm W, Hamilton RJ, editors. *Edible Oil Processing* Sheffield: Sheffield Academic Press; 2000. p. 47-78.
- Frankel ED. Control of Oxidation In: The Oily Press, editor. *Lipid Oxidation*. 2 ed. Bridgewater, UK: PJ Barnes, P.J. & Associates; 2005, 470p.
- Froyland L, Madsen L, Vaagenes H, Totland GK, Auwerx J, Kryvi H, et al. Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J Lipid Res* 1997; 38(9):1851-8.
- Fullana A, Carbonell-Barrachina AA, Sidhu S. Comparison of volatile aldehydes present in the cooking fumes of extra virgin olive, olive, and canola oils. *J Agric Food Chem* 2004; 52(16):5207-14.
- Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996; 37(4):693-707.
- Gertz C, Matthäus B. Optimum Deep Frying Recommendations by the German Society for Fat Science, . Frankfurt, Germany 2008. p. 24.
- Heppner CW, Schlatter JR. Data requirements for risk assessment of furan in food. *Food Addit Contam* 2007; 24 Suppl 1:114-21.
- HGR - Hoge Gezondheidsraad. Aanbevelingen en beweringen betreffende omega-3-vetzuren, versie 2004. Brussel: HGR, 2005. Advies nr.7945.
- HGR - Hoge Gezondheidsraad. Voedingsaanbevelingen voor België - Herziening 2009. Brussel: HGR, 2009. Advies nr. 8309.
- Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Prog Lipid Res* 2008; 47(1):37-49.

- Huybrechts I. Dietary habits in preschool children as a basis for the development of a methodological framework for future dietary surveillance: Ghent University; 2008.
- Jacques H, Gascon A, Arul J, Boudreau A, Lavigne C, Bergeron J. Modified milk fat reduces plasma triacylglycerol concentrations in normolipidemic men compared with regular milk fat and nonhydrogenated margarine. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(6):983-91.
- Karpe F. Postprandial lipid metabolism in relation to coronary heart disease. *Proc Nutr Soc* 1997; 56(2):671-8.
- Kellens M. Oil Modification processes. In: Hamm W, Hamilton RJ, editors. *Edible Oil processing* Sheffield: Sheffield Academic Press; 2000. p. 129-72.
- Lairon D, Martin J-C. Modulations nutritionnelles du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines dans Aliments fonctionnels. In: Roberfroid M, Coxam V, Delzenne N, editors. 2nd ed: Lavoisier; 2008.
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem* 2002; 13(12):700-10.
- Le Quere JL, Sebedio JL. Cyclic monomers of fatty acids, in *Deep frying: Practices, Chemistry and Nutrition*. Perkins E. and Erickson M, eds, AOCS Press, 1996, Champaign, USA, 49-88.
- Leuratti C, Singh R, Lagneau C, Farmer PB, Plastaras JP, Marnett LJ, et al. Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. *Carcinogenesis* 1998; 19(11):1919-24.
- Locas CP, Yaylayan VA. Origin and mechanistic pathways of formation of the parent furan - A food toxicant. *J Agric Food Chem* 2004; 52(22):6830-6.
- Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ* 1999; (150):17-27.
- McClements DJ, Decker EA. Lipids In: Damodaran S, Parkin, K. L. & Fennema. O., editor. *Fennema's Food Chemistry*. 4 ed. Boca Raton, US: CRC Press 2008. p. 155-216.
- Moran JH, Mon T, Hndrickson TL, Mitchell LA, Grant DF. Defining mechanisms of toxicity for linoleic acid monoepoxides and diols in Sf-21 cells. *Chem Res Toxicol* 2001; 14(4):431-7.
- Mu H, Hoy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 2004; 43(2):105-33.
- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278(33):31426-33.
- Nubel. *Belgische voedingsmiddelentabel*, 4de editie. 2004.
- O'Brien NM, Callaghan YC, Lyon NM, Woods JA. Biological effects of dietary cholesterol oxidation products. *J Agric Food Res* 2000; 39(2):265-73.

- O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol* 2005; 35(7):609-62.
- Ramirez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev* 2001; 65 Suppl:S95-S101.
- Roche HM. Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999; 58(1):201-7.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585(2-3):213-21.
- Sanders TA, Oakley FR, Miller GJ, Mitropoulos KA, Crook D, Oliver MF. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(12):3449-60.
- Schrauwen P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 2007; 66(1):33-41.
- Sioen I, Huybrechts I, Verbeke W, Camp JV, De Henauw S. n-6 and n-3 PUFA intakes of pre-school children in Flanders, Belgium. *Br J Nutr* 2007; 98(4):819-25.
- Sioen IA, Pynaert I, Matthys C, De Backer G, Van Camp J, De Henauw S. Dietary intakes and food sources of fatty acids for Belgian women, focused on n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 2006; 41(5):415-2
- Siu GM, Draper HH, Valli VE. Oral toxicity of malonaldehyde: a 90-day study on mice. *J Toxicol Environ Health* 1983; 11(1):105-19.
- Staprans I, Hardman DA, Pan XM, Feingold KR. Effect of oxidized lipids in the diet on oxidized lipid levels in postprandial serum chylomicrons of diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22(2):300-6.
- Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(11):1075-82.
- Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(1):7-25.
- Surh J, Lee S, Kwon H. 4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. *Food Addit Contam* 2007; 24(11):1209-18.
- Sutherland WHF, de Jong SA, Walker RJ, Williams MJA, Skeaff CM, Duncan A, et al. Effects of meals rich in heated olive and safflower oils on oxidation of postprandial serum in healthy men *Atherosclerosis* 2002; 160(1):195-203.
- Takekoshi S, Nagata H, Matsuzaki K, Osamura RY. Involvement of lipid peroxidation in the alteration of protein kinase C signaling. *Acta histochem cytochem* 2003; 36(4):281-5.
- Turner R, McLean CH, Silvers KM. Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation? *Nutr Res Rev* 2006; 19(1):53-62.

- WHO - World health Organization. Concise International Chemical Assessment n° 43 Acrolein. International Program on Chemical Safety (IPCS) 2002.
- WHO - World health Organization. Environmental Health Criteria n° 51: Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. International program on Chemical Safety (IPCS) 1985.
- Williams CM. Post-prandial lipid metabolism : effects of dietary fatty acids Proc Nut Soc 1997; 56:579-92.
- Williams CM. Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. Atherosclerosis 1998; 141 Suppl 1:S87-92.
- Wilson R, Lyall K, Smyth L, Fernie CE, Riemersma RA. Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo. Free Radic Biol Med 2002; 32(2):162-8.

5. BIJLAGE

- Advies van de Hoge Gezondheidsraad over de veiligheid van oliën en vetten (HGR 8148)

6. SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP

Al de deskundigen hebben **op persoonlijke titel** aan de werkgroep deelgenomen. De namen van de deskundigen van de HGR worden met een asterisk * aangeduid.

De volgende deskundigen hebben hun medewerking verleend bij het opstellen van het advies:

DE MEULENAER Bruno *	(levensmiddelenchemie, in het bijzonder chemische kwaliteit en veiligheid van levensmiddelen – UGent)
DAENENS Paul	(toxicologie, bromatologie – KULeuven)
DELZENNE Nathalie *	(voeding, toxicologie – UCL)
FONDU Michel *	(chemie, additieven, contaminanten – ULB)
HUYGHEBAERT André *	(chemie, technologie – UGent)
LOGNAY Georges	(analytische chemie – Gembloux Agro-Bio Tech)
PAQUOT Michel *	(chemie, technologie – Gembloux Agro-Bio Tech)
VAN CAMP John *	(nutritionele waarde van levensmiddelen, voeding en gezondheid – UGent)

De administratie werd vertegenwoordigd door:

VINKX Christine	(contaminanten, additieven – FOD Volksgezondheid, DG4)
-----------------	--

Het voorzitterschap werd verzekerd door de heer Michel PAQUOT en het wetenschappelijk secretariaat door mevrouw Michèle ULENS.

BIJLAGE**ADVIES VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD
OVER DE VEILIGHEID VAN OLIËN EN VETTEN**

(HGR 8148 – Uitgebracht en goedgekeurd door de werkgroep
"Voeding en gezondheid, voedselveiligheid inbegrepen" op 25 januari 2006)

Inleiding:

De administratie vraagt het advies van de HGR over de relevantie van de onderstaande parameters i.v.m. de instabiliteitsrisico's van oliën en vetten : eetbare oliën, eetbare oliën en voedingsvetten bij het frituren van voedingsmiddelen, eetbare margarines en vetten alsmede Salatrim (Novel Food).

Doel :

Kunnen onderscheiden of het gaat om parameters met een onmiddellijk verband met de toxicologische problemen te wijten aan afbraakproducten (of een indirect verband als indicator) dan wel om "eenvoudige" kwaliteitsparameters.

De vraag heeft betrekking op de relevantie van de parameters (criteria) en niet op cijfermatige waarden.

Lijst van parameters :

1. Gehalte aan vrije vetzuren, uitgedrukt als oliezuur in g per 100 g (Koninklijk Besluit frituur, Koninklijk Besluit voedingsvetten)
2. De zuurte, uitgedrukt als KOH per g olie (Koninklijk Besluit eetbare oliën)
3. Zuurtegraad in % (meten van vrije vetzuren, verordening 2568/91/EEG olijfolie)
4. Gehalte aan dimere en polymere triglyceriden in g per 100 g (Koninklijk Besluit frituur)
5. Gehalte aan polaire stoffen in g per 100 g (Koninklijk Besluit frituur)
6. De viscositeit (Koninklijk Besluit frituur)
7. Het rookpunt (Koninklijk Besluit frituur)
8. Gehalte aan vluchtige stoffen bij 105°C, in % (Koninklijk Besluit eetbare oliën)
9. Peroxidegetal in millimol zuurstof per kg (Koninklijk Besluit voedingsvetten)
10. peroxidegetal in meq 2,0/kg (Verordening (EG) 2568/91 olijfolie, Beschikking 2003/867/EG Novel Food Salatrim, Aanbevelingen en beweringen betreffende de omega-3-vetzuren van de HGR)
11. Oxidatiewaarde van olie (IR-absorptie, zelfcontroleparameter in het frituurbedrijf)
12. K232 en K270 (UV-spectrometrie)
13. Organoleptische beoordeling (Koninklijk Besluit eetbare oliën, EG-verordening 2568/91 olijfolie)
14. Andere mogelijke parameters

Parameters 1, 2 en 3 : Gehalte aan vrije vetzuren, zuurte, zuurtegraad

Het gaat om zeer verwante parameters die niet onmiddellijk verband houden met toxicologische problemen maar die toch ofwel indicatoren voor een tekort aan kwaliteit (afbraak door hydrolyse) van de vetten (vrije vetzuren) ofwel authenticiteitsindicatoren (zuurtegraad voor de niet-geraffineerde maagdenoliën) zijn.

De zuurte (%) is het percentage vrije vetzuren gebruikelijk uitgedrukt als oliezuur voor een grote meerderheid van de vetten (als palmitinezuur voor palmolie, als laurinezuur voor laurinevetten).

De zuurte (%) is dus het gehalte aan vrije vetzuren gebruikelijk uitgedrukt als oliezuur in g per 100 gr. (parameter 1)

De zuurtecoëfficiënt is het aantal mg kali dat nodig is om de zuurte van 1 gr vet te neutraliseren. Het gaat om parameter 2 van de lijst (zuurte). We wensen op te merken dat de zuurtecoëfficiënt ongeveer gelijk is aan tweemaal de oliezuurte omdat de verhouding tussen de molecuulgewichten van kali en oliezuur ongeveer gelijk is aan 0.2.

De zuurte van geraffineerde vetten moet altijd lager liggen dan die van de maagdenoliën.

Die parameters zijn verbonden met de organoleptische kwaliteit (meer in het bijzonder wat de vetzuren met korte keten betreft) maar vooral, een hoog gehalte aan vrije vetzuren kan de oxidatieve afbraak van oliën en vetten bevorderen.

De 3 parameters zijn onderling zeer verwant.

Parameters 4, 5, 6 en 7 :

Deze parameters zijn bestemd om de frituuroliën en -vetten te kenmerken. Sommige van hen kunnen gecorreleerd zijn. Het herhaalde verhitten van vetten bevordert de oxidatie en de vorming van talrijke verbindingen die, ofwel een hoog molecuulgewicht hebben ofwel polair zijn en splitsingsproducten.

Er wordt een verhoogd gehalte aan dimere en polymere triglyceriden waargenomen (parameter 4), waardoor de viscositeit neigt te verhogen (parameter 6). Die polymeren vertegenwoordigen een zeer belangrijk deel van de polaire verbindingen (parameter 5). De aanwezigheid van polaire glyceriden wijzigt ook de oppervlakte-eigenschappen (schuimtest).

Met het rookpunt (parameter 7) kan hoofdzakelijk de afbraak door hydrolyse gecontroleerd worden, omdat zure olie een lager rookpunt heeft. Het rookpunt is immers zeer gevoelig voor een toename van de vrije zuurte en staat ook in verband met de risico's van ongevallen (ontvlammen).

De viscositeit en het rookpunt weerspiegelen geen toxisch effect maar het gaat om vrij eenvoudige controletesten.

Het Koninklijk Besluit van 22 januari 1988 (betreffende het gebruik van eetbare oliën en voedingsvetten bij het frituren van voedingsmiddelen) bevat voor hun eerste ingebruikname de kwaliteitscriteria betreffende de eetbare oliën (Koninklijk Besluit van 23 april 1974) en de eetbare margarines en vetten (waaronder het gehalte aan vrije vetzuren of de zuurte en het peroxidegetal).

De parameters 4 tot 7 komen daar nog bij en zijn gericht op het herhaalde gebruik van frituuroliën. Het koninklijk besluit van 22 januari 1988 bepaalt ook nog dat de maximumtemperatuur nooit hoger dan 180°C mag zijn, wat moeilijk (van buitenaf) gecontroleerd kan worden tenzij er registratiesystemen in bedrijven opgelegd worden. De waarden van de parameters 4 tot 6 geven de eventuele oververhittingstoestand weer.

Parameter 8 : Gehalte aan vluchtige stoffen bij 105°C

Het gehalte aan vluchtige stoffen moet vooral in verband worden gebracht met het sensorisch onderzoek.

De vluchtige stoffen zijn over het algemeen stoffen in zeer geringe hoeveelheid en ze worden bij desodorisatie verwijderd.

Er werden talrijke methodes ontwikkeld en hun reproduceerbaarheid kan zeer hoog zijn. Het onderzoek van de vluchtige producten met GC-MS toont echter vrij regelmatig een honderdtal of meer pieken aan en sommige ervan zijn meer dan andere gecorreleerd met het sensorisch onderzoek (bv. : pentaan, hexanal, 2,4-decadiënen, enz.).

De test in de lijst (meting bij 105°C, in %) is vrij beknopt en mag niet direct gelinkt worden met toxische aspecten van olie, behoudens waarschijnlijk gehalten aan residuele oplosmiddelen waarvan het gehalte bepaald moet worden (bv. hexaan).

Parameters 9 en 10 : Peroxidegetal in millimol zuurstof per kg en peroxidegetal in meq 2.0/kg

Het peroxidegetal (*peroxide value*, PV) is een zeer nuttig criterium om de eerste fasen van een oxidatieve afbraak te beoordelen.

Het peroxidegetal is per definitie het aantal microgrammen actieve zuurstof afkomstig van het peroxide vervat in een gram vet en dat kaliumjodide kan oxideren met jodiumafgifte.

Dit getal kan uitgedrukt worden in millimol per kg of in milli-equivalent actieve zuurstof per kg vet.

$$\text{PV (millimol/kg)} = 1/16 \times \text{PV } (\mu\text{g/g})$$

$$\text{PV (milli-eq/kg)} = 1/8 \times \text{PV } (\mu\text{g/g})$$

Als besluit kunnen we stellen dat de parameters 9 en 10 hetzelfde criterium vormen. Dit is relevant voor de aspecten betreffende de oxidatieve afbraak maar het heeft ook zijn beperkingen. Het geeft bv. niet de **vatbaarheid** voor oxidatie weer. Twee oliën met hetzelfde peroxidegetal kunnen meer afgebroken worden aan zeer verschillende snelheden.

Het peroxidegetal geeft in geen geval het oxidatieve verleden weer: een vet kan ranzig worden zonder een hoge PV te hebben. Dit getal is weinig relevant voor verhitte vetten aangezien in die omstandigheden de peroxiden sneller afgebroken worden dan dat er gevormd worden.

Bij de desodorisatie, een fase in de raffinage, worden de hydroperoxiden verwijderd. De geraffineerde oliën hebben lage PV's (< 1 milli-eq./kg).

Parameter 11 : Oxidatiewaarde van olie**Koninklijk besluit van 22 januari 1988**

Art.2. De fabrikanten of bereiders van gefrituurde voedingsmiddelen moeten de nodige maatregelen treffen opdat de tijdens de bereiding aangewende eetbare oliën of voedingsvetten voldoen aan de eisen gesteld in artikel 1, 2° tot 7° ($t \leq 180^\circ\text{C}$, parameters 1, 4, 5, 6 et 7).

Art.5. Worden schadelijk verklaard de eetbare oliën of voedingsvetten die niet voldoen aan de eisen gesteld in artikel 1, 3° tot 7° evenals de voedingsmiddelen die hiermee bereid of gefabriceerd werden.

De artikels 4, 5, 6 hebben betrekking op de met de oxidatie verbonden criteria. Onder de oxidatieverbindingen kunnen er sommige met infrarode spectroscopie aangetoond worden.

Parameter 12 : K232 en K270 (U.V.-spectrometrie)

U.V.-spectrometrie is nuttig om oxidatieproducten van oliën aan te tonen. De zelfoxidatie van vetten met meervoudig onverzadigde vetketens gaat immers met een conjugatie van de dubbele bindingen gepaard.

De hydroperoxiden van het linolzuur en de geconjugeerde dieensystemen die uit hun ontbinding voortkomen, absorberen rond 232 nm. De secundaire oxidatieproducten en in het bijzonder α -diketonen of α -onverzadigde ketonen vertonen een maximumabsorptie bij ongeveer 270 nm.

Hoe sterker de absorptiegraad bij 232 nm hoe meer het vet geperoxideerd wordt. Hoe sterker de absorptiegraad bij 268-270 nm hoe rijker het vet aan secundaire oxidatieproducten is.

In principe moeten die oxidatieproducten met eventuele toxische aspecten in verband worden gebracht. Toch hangt die beoordelingsmethode af van het soort olie en meer in het bijzonder van de samenstelling aan vetzuren. Die moet dus op vergelijkende wijze toegepast worden tussen oliën van verwante scheikundige samenstellingen. Zo bevatten sommige soorten talkvet van nature geconjugeerde trieensystemen die een drievoudige absorptieband bij 262-270 en 278 nm vertonen. Die trieensystemen kunnen eveneens bij sommige raffinagebewerkingen (ontkleuring) gevormd worden.

Parameter 13 : Organoleptische beoordeling

Deze parameter kan met parameter 8 vergeleken worden wat de eetbare oliën betreft zonder waarschijnlijk onmiddellijk met toxicologische aspecten gepaard te gaan.

Het sensorisch onderzoek kan echter geoxideerde "smaken" aantonen.

Voor de olijfoliën wordt het sensorisch onderzoek met andere testen gecombineerd om de verschillende oliën te onderscheiden.

Andere eventuele parameters – Besluit

De afbraak van oliën en vetten is een complex fenomeen dat afhangt van het soort vet, zijn verleden, de ondergane technologische behandelingen maar ook van de bewaaromstandigheden (aanwezigheid van lucht, licht, katalysatoren, antioxidanten, enz.) en de aanwendingswijze (smelten, koken, frituren).

De afbraak van vetten geschiedt op twee belangrijke wijzen die vaak verbonden zijn :

- hydrolytische afbraak
- thermische en oxidatieve afbraak

De eerste leidt tot de afgifte van vrije vetzuren vanuit triglyceriden. Deze vetzuren zijn meer vatbaar voor oxidatie dan de triglyceriden. Zelf vertonen ze geen hoge toxiciteitsrisico's.

Als hun gehalte sterk toeneemt, kan het product vanuit organoleptisch oogpunt niet meer verbruikt worden.

Hun oxidatiesnelheid neemt met hun graad van onverzadigheid aanzienlijk toe met de verhoudingen 1-100-1200-2500 voor de C18 :0, C18 :1, C18 :2, C18 :3.

Het aantonen van de hydrolytische afbraak berust op het meten van het rookpunt maar vooral van het zuurgetal.

Bij aanwezigheid van lucht vindt er thermische en oxidatieve afbraak plaats. Het gaat om zeer complexe fenomenen, die hoofdzakelijk op de onverzadigde vetzuren inwerken, ook al kunnen cholesterol en andere verbindingen van het onverzeepbare element ook oxideren.

De thermolytische afbraak van de onverzadigde vetzuren leidt hoofdzakelijk tot intra- of intermoleculaire dimeren. Er kunnen cyclisaties (Diels-Alderreactie) plaatsgrijpen.

In aanwezigheid van zuurstof zijn de oxidatiereacties van het radicalaire en autokatalytische type. Men kan drie fasen onderscheiden: initiatie, propagatie en terminatiereactie.

Behoudens bij het begin van de oxidatie vinden de drie fasen gelijktijdig plaats, wat hun bestudering des te moeilijker maakt wanneer de hoeveelheid vrije radicalen voldoende is (initiatie). De reactie verspreidt zich door afzondering van een waterstofatoom in α t.o.v. een dubbele binding.

Er wordt een door resonantie gestabiliseerd R° -radicaal gevormd dat met de zuurstof reageert waardoor er een COO° -radicaal gevormd wordt dat op zijn beurt met een nieuwe vetmolecule kan reageren.

Er worden dan een hydroperoxide en een nieuw radicaal gevormd waardoor de reactie zichzelf onderhoudt.

De vrije radicalen zijn zeer reactioneel, het hydroperoxidegehalte neemt snel toe maar hun ontbinding, die sneller verloopt naarmate de t° hoog ligt, bevordert de initiatiereacties.

Op het einde van de oxidatie worden de hydroperoxiden ontbonden en interageren ze om een hoog aantal niet-radicalaire verbindingen te vormen. De hydroperoxiden kunnen bovendien met de zuurstof blijven reageren en bijvoorbeeld epoxyperoxiden, dihydroperoxiden, cyclische peroxiden, enz. gaan vormen.

Talrijke secundaire oxidatieproducten worden verder afgebroken.

Als men naast die oxidatiemechanismen ook met de afbraakmogelijkheden door het licht (foto-oxidatie) rekening houdt, bemerkt men dat de fenomenen van vetoxidatie uiterst complex zijn. Het indrukwekkend aantal afbraakproducten verklaart de afwezigheid van onderzoeksmethoden waarmee alle wijzigingen van een vet bestudeerd kunnen worden. Daarom zijn verschillende onderzoekstechnieken nodig om de afbraak op te volgen, als men belang stelt in kwaliteit in de brede zin van het woord.

Algemeen gezien kunnen ofwel de voorlopers van oxidatie, vrije radicalen, hydroperoxiden ofwel de oxidatieproducten, zoals aldehyden of ketonen gemeten worden.

- Het peroxidegetal wordt gebruikt voor de eerste auto-oxidatiefasen maar niet voor verhitte oliën.
- Het anisidinegetal meet de geconjugeerde diënolen en wordt gebruikt voor de monitoring van verhitte oliën. Het is mogelijk om dat met het peroxidegetal (= totox-waarde) op te tellen.
- Het meten van de specifieke absorptiegraad bij 232 nm (geconjugeerde diënen) en bij 270 nm (geconjugeerde ketodiënen) geeft de oxidatie-evolutie weer.
- De test met thiobarbituurzuur TBA met name de toename van de absorptiegraad bij 530 nm door de reactie van 1 mgr vet in 1 ml butanol met een precieze hoeveelheid TBA. Sommige oxidatieproducten (hydroperoxiden die tot malondialdehyde kunnen leiden) reageren immers met het thiobarbituurzuur waardoor de absorptiegraad bij 530 nm toeneemt.

De criteria in de lijst zijn prioritair op algemene aspecten (indicatoren) (fysisch-chemische, fysische en ook chemische testen) van de kwaliteit gericht. Weinige hebben een onmiddellijk verband met toxicologische problemen. Met sommige kunnen er echter vrij "geavanceerde" oxidatieproblemen in frituurolieën aangetoond worden (gehalte aan dimere en polymere triglyceriden, gehalte aan polaire stoffen).

Het merendeel van de testen zijn evenwel afbraakindicatoren die een onrechtstreeks verband met toxicologische problemen kunnen hebben. Zonder een duidelijke identificatie van de meest toxische moleculen die moeten worden opgespoord (bv. polycyclische aromatische koolwaterstoffen in bepaalde gevallen), bieden de huidige testen het voordeel dat ze de verkoop van producten van algemene goede kwaliteit, en dus met minder toxicologische risico's, waarborgen.

Veel van deze testen zijn betrekkelijk gemakkelijk uitvoerbaar en omzetbaar in bedrijven.

Over de Hoge Gezondheidsraad (HGR)

De Hoge Gezondheidsraad is een federale dienst die deel uitmaakt van de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Hij werd opgericht in 1849 en geeft wetenschappelijke adviezen i.v.m. de volksgezondheid aan de ministers van volksgezondheid en van leefmilieu, aan hun administraties en aan enkele agentschappen. Hij doet dit op vraag of op eigen initiatief. De HGR neemt geen beleidsbeslissingen, noch voert hij ze uit, maar hij probeert het beleid inzake volksgezondheid de weg te wijzen op basis van de recentste wetenschappelijk kennis.

Naast een intern secretariaat van een 25-tal medewerkers, doet de Raad beroep op een uitgebreid netwerk van meer dan 500 experts (universiteitsprofessoren, medewerkers van wetenschappelijke instellingen), waarvan er 200 tot expert van de Raad zijn benoemd; de experts komen in multidisciplinaire werkgroepen samen om de adviezen uit te werken.

Als officieel orgaan vindt de Hoge Gezondheidsraad het van fundamenteel belang de neutraliteit en onpartijdigheid te garanderen van de wetenschappelijke adviezen die hij aflevert. Daartoe heeft hij zich voorzien van een structuur, regels en procedures die toelaten doeltreffend tegemoet te komen aan deze behoeften bij iedere stap van het tot stand komen van de adviezen. De sleutelmomenten hierin zijn de voorafgaande analyse van de aanvraag, de aanduiding van de deskundigen voor de werkgroepen, het instellen van een systeem van beheer van mogelijke belangenconflicten (gebaseerd op belangenverklaringen, onderzoek van mogelijke belangenconflicten, en een referentiecomité) en de uiteindelijke validatie van de adviezen door het College (eindbeslissingorgaan). Dit coherent geheel moet toelaten adviezen af te leveren die gesteund zijn op de hoogst mogelijke beschikbare wetenschappelijke expertise binnen de grootst mogelijke onpartijdigheid.

De adviezen van de werkgroepen worden voorgelegd aan het College. Na validatie worden ze overgemaakt aan de aanvrager en aan de minister van volksgezondheid en worden de openbare adviezen gepubliceerd op de website (www.hgr-css.be), behalve wat betreft vertrouwelijke adviezen. Daarnaast wordt een aantal onder hen gecommuniceerd naar de pers en naar doelgroepen onder de beroepsbeoefenaars in de gezondheidssector.

De HGR is ook een actieve partner binnen het in opbouw zijnde EuSANH netwerk (*European Science Advisory Network for Health*), dat de bedoeling heeft adviezen uit te werken op Europees niveau.

Indien U op de hoogte wil blijven van de activiteiten en publicaties van de HGR kan U zich abonneren op een mailing-list en/of een RSS-feed via volgende link: <http://www.hgr-css.be/rss>.