

## Analyse rapport ORAC Europe BV

*Paraaf  
onderzoeker*

Naam opdrachtgever:

Hak Agrofeed  
t.a.v. Dhr. B. Hak  
Leemansstraat 2  
4251 LD Werkendam

Aantal aangeleverde  
monsters:

9 monsters

**EW**

Aankomstdatum monster(s):

Dinsdag, 12 mei 2009

**EW**

Toestand van monster  
bij aanlevering:

OK:  *beschadigd:*  *anders:*  (zie opmerkingen)

Monster-opslag:

Monsters werden direct na aankomst in  
het donker en bij 4°C opgeslagen.

**EW**

*Opmerkingen:*

Monsters werden aangeleverd als  
individueel verpakte komkommers.  
Kommommers waren verdeeld over 3  
gelabelde groepen.

**EW**

**Monster informatie  
verstrekkt door  
opdrachtgever:**

De aangeleverde komkommers waren verdeeld in drie groepen: een controle groep (n=3), een met Immutines behandelde groep (1 mL/m<sup>2</sup>/week, groen label, n=3) en een met Immutines behandelde groep (1,5 mL/m<sup>2</sup>/week, rood label, n=3). De controle groep bestond uit onbehandelde komkommers.

Controle komkommers werden genummerd C-1, C-2 en C-3. Immutines-behandelde komkommers (1 mL/m<sup>2</sup>) werden genummerd G-1, G-2 and G-3 en Immutines-behandelde komkommers (1,5 mL/m<sup>2</sup>) werden genummerd R-1, R-2 and R-3.

Alle komkommers werden gekweekt in de kwekerij van A.W. Vahl te IJsselmuiden. Kweekomstandigheden zijn vergelijkbaar met die zoals vermeld in de bijlage van het ORAC Europe rapport van 23 september 2008.

**ORAC Europe  
monster voorbereiding:**

Van elke komkommer werd vooraf het gewicht bepaald. Vervolgens werd exact uit het midden van elke komkommer een stuk gesneden van zoveel mogelijk gelijke grootte ( $\pm$  5 cm). Van elk uitgesneden stuk werden het gewicht en het volume bepaald (zie resultaten, pag. 5).

Gebruikmakend van een speciale laboratorium maler werd elk stuk komkommer individueel grondig vermalen.

Van elk resulterend homogenaat werd 2.5 gram afgewogen in een glazen reageerbuis. Om de hydrofiele inhoudstoffen uit deze homogenaten te extraheren werd aan elke buis 10 mL van een mengsel van aceton, water en azijnzuur (140:59:1, v/v) toegevoegd. Dit mengsel (afgekort als AWA) wordt standaard gebruikt om hydrofiele inhoudstoffen uit ondermeer voedselmonsters te extraheren.

Na toevoegen van 10 mL AWA werden de afgesloten reageerbuisen 15 minuten lang in een ultrasoon bad geplaatst.

Hierna werden alle buizen gedurende 1 minuut grondig gemengd op een zgn. vortex, waarna de buizen opnieuw voor 15 minuten in een ultrasoon bad werden geplaatst.

Na nog een laatste keer goed mengen, werden de buizen in een centrifuge gedurende 15 minuten afgedraaid (800 x g).

De supernatanten van elke buis werden zorgvuldig afgepipetteerd en in bruin-glazen flesjes opgeslagen in het donker bij 4°C, tot het moment van testen in de hydrofiele ORAC test.

Datum monster voorbereiding:

Dinsdag 12 mei 2009

**EW**

Gewenste test:

Hydrofiele ORAC assay

**EW**

Test datum:

Woensdag 13 & donderdag 14 mei  
2009

**EW**

Verantwoordelijke  
onderzoeker:

Dr. E. van den Worm



**EW**

Datum eindrapportage:

Donderdag, 04 juni 2009

**EW**

Opmerkingen:

- geen opmerkingen -

**EW**

## Korte beschrijving van de uitgevoerde test(en):

De door Hak Agrofeed aangeleverde monsters werden getest op hun antioxidant capaciteit in de hydrofiele ORAC test (**Oxygen Radical Absorbance Capacity**). Bij deze gestandaardiseerde en gevalideerde test wordt gebruik gemaakt van fluoresceïn als een fluorescente probe en van AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) als een fysiologisch relevante bron van peroxy radicalen. Het fluorescentie profiel werd in de tijd gevolgd met behulp van een geautomatiseerde fluorescentie reader (*Thermo Fluoroskan Ascent*). Fluorescentie werd gedurende een uur elke minuut gemeten en de gehele meting vond plaats bij 37°C. Bij de metingen werd gebruik gemaakt van een excitatie golflengte van 485 nm en een emissie golflengte van 538 nm.

In de ORAC test wordt Trolox (een wateroplosbare vorm van vitamine E) gebruikt als een interne standaard. Daarom worden resultaten van de ORAC test (de gevonden ORAC waarden) uitgedrukt in  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalenten (TE) **per 100 g van het testmonster**. Dit is een standaard manier van het uitdrukken van ORAC waarden.

Direct voorafgaand aan de meting werden alle monsters opgelost en doorverdund in vers geprepareerde natriumfosfaat buffer (75mM, pH = 7.4).

Direct voorafgaand aan de ORAC meting werden alle gebruikte reagentia vers bereid. De AAPH oplossing werd in het donker en op ijs bewaard tot gebruik in de ORAC test. Alle andere te gebruiken oplossingen werden in het donker bij 37°C bewaard.

De uiteindelijke ORAC waarden werden berekend uit de verkregen experimentele data door gebruik te maken van de zgn. 'area under the curve' (AUC) methode. De netto AUC werd berekend door de AUC van de blanco af te trekken van de AUC van het geteste monster. De uiteindelijke ORAC waarde (uitgedrukt in Trolox equivalenten) werd berekend door extrapolatie van de verkregen Trolox calibratie curve ( $\text{AUC}_{\text{Trolox}}$  vs.  $[\text{Trolox}]$ ).

ORAC waarden werden uitgedrukt als gemiddelde waarde (gem.)  $\pm$  standaard deviatie (S.D.).

## Opmerkingen:

Bij alle verdunningsstappen en voor het uiteindelijke uitpipetteren in de meetplaat, werden alle monsteroplossingen grondig gemengd door alle reageerbuizen op een vortex te plaatsen.

## TEST RESULTATEN:

Komkommer nr.	Totaal gewicht	Gewicht (deel)	Volume (deel)
C-1 (controle)	366.18 g.	78.84 g.	78 cm <sup>3</sup>
C-2 (controle)	396.07 g.	93.85 g.	92 cm <sup>3</sup>
C-3 (Controle)	291.51 g.	68.84 g.	66 cm <sup>3</sup>
G-1 (1 mL/m <sup>2</sup> )	344.22 g.	88.41 g.	88 cm <sup>3</sup>
G-2 (1 mL/m <sup>2</sup> )	350.12 g.	82.90 g.	82 cm <sup>3</sup>
G-3 (1 mL/m <sup>2</sup> )	282.66 g.	71.25 g.	72 cm <sup>3</sup>
R-1 (1,5 mL/m <sup>2</sup> )	333.06 g.	83.53 g.	82 cm <sup>3</sup>
R-2 (1,5 mL/m <sup>2</sup> )	395.42 g.	95.23 g.	94 cm <sup>3</sup>
R-3 (1,5 mL/m <sup>2</sup> )	339.59 g.	85.50 g.	82 cm <sup>3</sup>

Monsters	ORAC waarde (µmol TE / 100 g.)*	
Controle komkommers (C)	127.5 ± 27.5 (gem. ± S.D.)	(n = 4)
Immutines-behandelde komkommers (1 mL/m <sup>2</sup> , G)	174.2 ± 27.5 (gem. ± S.D.)	(n = 4)
Immutines-behandelde komkommers (1.5 mL/m <sup>2</sup> , R)	170.0 ± 46.1 (gem. ± S.D.)	(n = 4)

\* Zoals eerder vermeld, zijn alle ORAC waarden uitgedrukt in µmol TE per 100 g monster. Indien gewenst kunnen deze ORAC waarden eventueel doorgerekend worden tot µmol TE per komkommer of µmol TE per standaard portie.

**NB: 1 µmol Trolox Equivalenten (TE) komt overeen met 250 µg Trolox**

	<b>Antioxidant capaciteit (% van controle)</b>	<b>Toename in antioxidant capaciteit (relatief t.o.v controle)</b>
<b>Controle komkommers (C)</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
<b><i>Immutines</i>-behandelde kommers (1 mL/m<sup>2</sup>, G)</b>	<b>136.63 ± 21.5</b>	<b>36.6 %</b>
<b><i>Immutines</i>-behandelde kommers (1.5 mL/m<sup>2</sup>, R)</b>	<b>133.3 ± 36.1</b>	<b>33.3 %</b>

**Eindverantwoordelijke:**

Dr. E. van den Worm  
(CEO, ORAC Europe BV)

(e-mail: E.vandenworm@uu.nl)

- .....
- **ORAC Europe BV** • PO BOX 80082 • 3508 TB Utrecht • The Netherlands •
  - Rabobank: 12 77 66 456, Utrecht • IBAN: NL41RABO 0127 7664 56 •
  - BIC: RABONL2u • KvK 30222065 • VAT nr. NL8174.77.615.B01 •
  - Tel: 00 31(0)302535933 • Fax:00 31(0) 302536941 •
  - e-mail: info@orac-europe.com •
  - www.orac-europe.com •

## BIJLAGE A

### Antioxidant capaciteit van *Immutines* oplossing

Om een inschatting te kunnen maken van de mogelijke bijdrage van de gebruikte *Immutines* oplossing aan de antioxidant capaciteit zoals die gemeten wordt in de met *Immutines* behandelde komkommers, is ook de hydrofiele ORAC waarde van de *Immutines* oplossing bepaald. De samenstelling van de *Immutines* oplossing wordt beschreven in het ORAC Europe rapport van 23 september 2008.

De antioxidant capaciteit van de *Immutines* (uitgedrukt als hydrofiele ORAC waarde) is op dezelfde manier bepaald als beschreven in dit rapport (pag. 4).

Monster	ORAC waarde ( $\mu\text{mol TE} / \text{mL}$ )*
<i>Immutines</i> oplossing	$0.05 \pm 0.0014$ (n=3)

\* De ORAC waarde is uitgedrukt in  $\mu\text{mol TE}$  per mL *Immutines*.  
Wanneer de verkregen ORAC waarde per mL, omgerekend wordt naar  $\mu\text{mol}$  per 100 gram (om deze te kunnen vergelijken met de ORAC waarden van de komkommers), dan komt de hydrofiele ORAC waarde uit op:

**3.85  $\mu\text{mol TE} / 100 \text{ g}$**  (relatieve dichtheid *Immutines* oplossing: 1,3)