

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:

10 monsters

EW

Aankomstdatum monster(s):

Woensdag, 6 januari 2010

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 tomaten.
Tomaten waren verdeeld over 2
gelabelde groepen.

EW

**Monster informatie
verstrekkt door
opdrachtgever:**

De aangeleverde tomaten waren verdeeld in twee groepen: een controle groep (zwart label, n=5) en een met *Immutines* behandelde groep (1 mL/m²/week, oranje/bruin label, n=5). De controle groep bestond uit onbehandelde tomaten. Controle tomaten werden genummerd: C-1, C-2, C-3, C-4 en C-5.

De *Immutines*-behandelde tomaten (1 mL/m²/week) werden genummerd: I-1, I-2, I-3, I-4 en I-5.

Alle tomaten werden gekweekt in de kwekerij van A.W. Vahl te IJsselmuiden.

Meer informatie over *Immutines* is vermeld in de bijlage van het ORAC Europe rapport van 23 september 2008.

**ORAC Europe
monster voorbereiding:**

Van elke tomaat uit de twee groepen werd vooraf het gewicht bepaald (*zie resultaten sectie*). Gebruikmakend van een speciale laboratorium-maler, werden alle vijf tomaten van elke groep (controle vs. *Immutines*-behandelde) grondig vermalen. Van elk resulterend homogenaat werd 5.0 gram afgewogen in een glazen reageerbuis.

Om de hydrofiele inhoudstoffen uit deze homogenaten te extraheren, werd aan elke buis 20 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 20 mL AWA werden de afgesloten reageerbuizen 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 vortexen, 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:

Donderdag 7 januari 2010

EW

Gewenste test:

Hydrofiele ORAC assay

EW

Test datum:

Vrijdag 8 januari 2010

EW

Verantwoordelijke
onderzoeker:

Dr. E. van den Worm



EW

Datum eindrapportage:

Maandag 11 januari 2010

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-methylpropionamide) 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. (*Metingen uitgevoerd volgens: Prior et al., J. Agric. Food. Chem. 53(10): 4290-4302; 2005.*) 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 μmol 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:

| Tomaat nr. | Gewicht (gram) |
|---|----------------|
| C-1 (Controle) | 129.92 |
| C-2 (Controle) | 149.64 |
| C-3 (Controle) | 127.57 |
| C-4 (Controle) | 135.89 |
| C-5 (Controle) | 132.26 |
| I-1 (<i>Immutines</i> , 1 mL/m ² /week) | 127.96 |
| I-2 (<i>Immutines</i> , 1 mL/m ² /week) | 136.70 |
| I-3 (<i>Immutines</i> , 1 mL/m ² /week) | 169.51 |
| I-4 (<i>Immutines</i> , 1 mL/m ² /week) | 177.92 |
| I-5 (<i>Immutines</i> , 1 mL/m ² /week) | 275.02 |

| Monsters | ORAC waarde (µmol TE / 100 g.)* |
|---|---------------------------------|
| Controle tomaten (C) | 295 ± 9.2 (gem. ± S.D.) |
| <i>Immutines</i>-behandelde tomaten (1 mL/m²/week, I) | 335 ± 7.1 (gem. ± S.D.) |

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

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

| | Antioxidant capaciteit (% van controle) | Toename in antioxidant capaciteit (relatief t.o.v controle) |
|---|--|--|
| Controle tomaten (C) | 100 | - |
| <i>Immutines</i>-behandelde tomaten (1 mL/m²/week, I) | 113.6 ± 2.5 | 13.6 % |

Eindverantwoordelijke:

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

-
- **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 •