



**CYTO-LOGIC SPÓŁKA Z o.o. Rubież 46**

**61-612 Poznań**

**Polska NIP 9721306515**

**RAPORT**

**Analiza trzech suplementów diety z wykorzystaniem nowoczesnej metody  
analitycznej – cytometrii przepływowej**

**20.02.2025 Poznań**

## RAPORT Z BADAŃ

<b>Zleceniodawca</b>	E-REMEDIUUM SKLEP INTERNETOWY SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ Kolberga 77A 26-300 Opoczno, Polska NIP 7681843624		
<b>Typ próbki</b>	Produkt spożywczy		
<b>Metoda pobierania</b>	Produkty przekazane przez Zleceniodawcę		
<b>Data produkcji</b>	2024		
<b>Data ważności</b>	Wskazano w nazwie próbki		
<b>Data zlecenia</b>	11.02.2025 r.	<b>Data przygotowania sprawozdania</b>	20.02.2025 r.

### Opis próbek

<b>Nazwa próbki</b>	1. Liposomalna kurkumina (kurkumin) [numer partii/data przydatności: 30.04.2025], 2. Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) [numer partii/data przydatności: 16.06.2025] 3. Liposomalna witamina C (C) [numer partii/data przydatności: 03.08.2025]	<b>Typ opakowania</b>	oryginalne
<b>Numer partii</b>	Jw.	<b>Materiał</b>	Brak danych
<b>Punkt pobrania</b>	Zleceniodawca	<b>Data wykonania badania</b>	11.02.2025 r.
<b>Materiał</b>	Postać płynna	<b>Data zakończenia badania</b>	19.02.2025 r.
<b>Stan próbki</b>	Bez zastrzeżeń	<b>Uwagi</b>	brak

## Metodologia badawcza

Cytometryczna detekcja i charakterystyka liposomów w badanych produktach (suplementach diety): Liposomalna kurkumina (kurkumin) [numer partii/data przydatności: 30.04.2025], Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) [numer partii/data przydatności: 16.06.2025] i Liposomalna witamina C (C) [numer partii/data przydatności: 03.08.2025], została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometru przepływowego z bio-obrazowaniem FlowSight (Luminex, USA) wyposażonego w 3 lasery (405nm, 488nm oraz 642nm), kanał BF (brightfield – jasne pole widzenia), 9 kanałów fluorescencji oraz detektor światła rozproszonego lasera - side scatter (SSC) - akwizycja w postaci wielokanałowej kamery CCD.

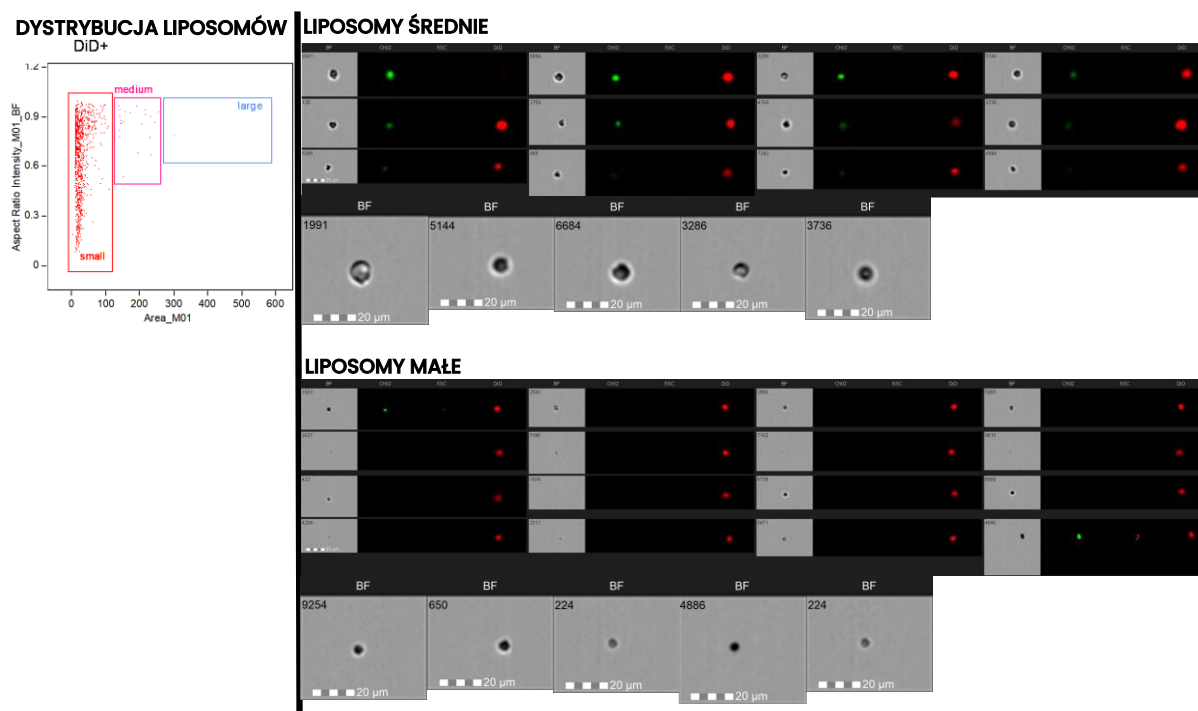
Wszystkie próbki zostały rozcieńczone 10 000 razy w 1% roztworze PBS poddanego filtracji (0,1  $\mu\text{m}$ ). Do wykrywania cząstek liposomów wykorzystano lipofilowy barwnik DiD (ThermoFisher Scientific, Germany), który wiąże się z błonami liposomów, wykazując czerwoną fluorescencję (maksimum = 668nm). Próbka Liposomalnej kurkuminy była dodatkowo charakteryzowana pod kątem obecności zawartej w liposomach kurkuminy na podstawie jej autofluorescencji (po wzbudzeniu światłem lasera niebieskiego 488nm kurkumina wykazuje zieloną fluorescencję w zakresie (500 – 530nm).

Cząsteczki liposomów charakteryzowano w oparciu o następujące parametry: *Gradient RMS BF*, *Aspect ratio BF* oraz *Area BF*, pochodzące z cyfrowego przetwarzania obrazu komórek w jasnym polu widzenia (kanał BF – BrightField) oraz *Intensity SSC* – intensywność światła rozproszonego z detektora side scatter SSC (kanał SSC), *Intensity DiD* - intensywność czerwonej fluorescencji (kanał DiD), pochodzącej z lipofilowego barwnika DiD (Thermo Fisher Scientific, Germany) (maksimum emisji = 668nm) i *Intensity Ch02* – intensywność zielonej fluorescencji (kanał Ch02), pochodzącej z kurkuminy – autofluorescencja (zakres emisji = 500 - 530nm). Ten ostatni parametr wykorzystywano w charakterystyce liposomów w próbce z produktu Liposomalna kurkumina (kurkumin). Dla wzbudzenia fluorescencji barwnika DiD wykorzystywano laser czerwony 642nm. Fluorescencję cząsteczek kurkuminy w liposomach wzbudzano laserem niebieskim 488nm. Każdą próbkę analizowano w 3 powtórzeniach technicznych.

## Analiza uzyskanych wyników

Analizę post-akwizycyjną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania IDEAS (Luminex, USA). Na kropkowym wykresie zależności pola powierzchni analizowanych obiektów - *Area* (kanał BF) od stosunku krótkiej do długiej osi analizowanych obiektów – *Aspect Ratio Intensity* (kanał BF) zdefiniowano 3 główne sub-populacje obiektów (liposomów): małe liposomy (small), średnie liposomy (medium) oraz duże liposomy (large). Rozkład wielkości analizowanych miceli

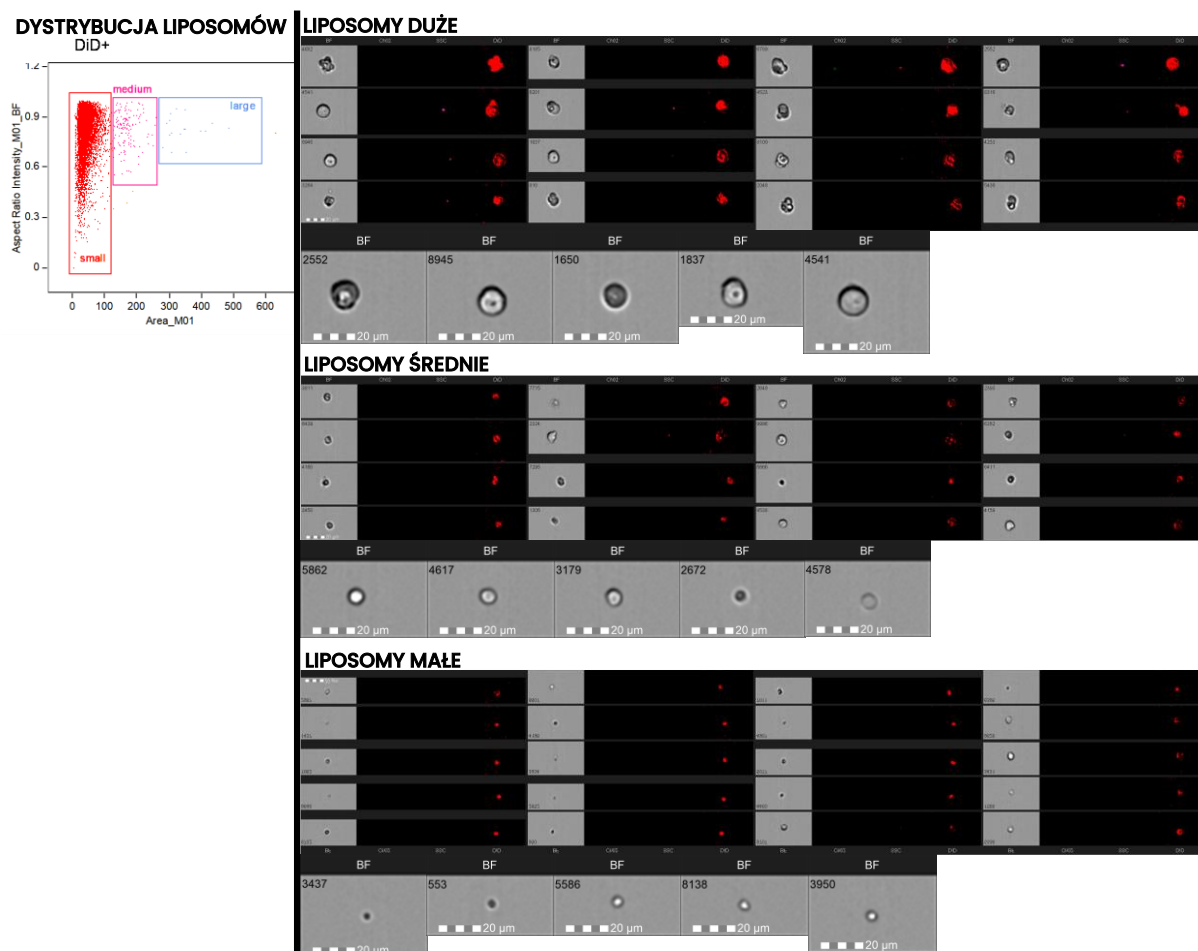
przedstawiają ryciny 1, 2 i 3, odpowiednio dla próbek produktów: Liposomalna kurkumina (kurkumin), Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) i Liposomalna witamina C (C). Ze względu na niewielki udział liposomów dużych (large) w próbce produktu Liposomalna kurkumina (kurkumin) tej populacji nie uwzględniono na rycinie przedstawiającej dystrybucję wielkości cząstek liposomów.



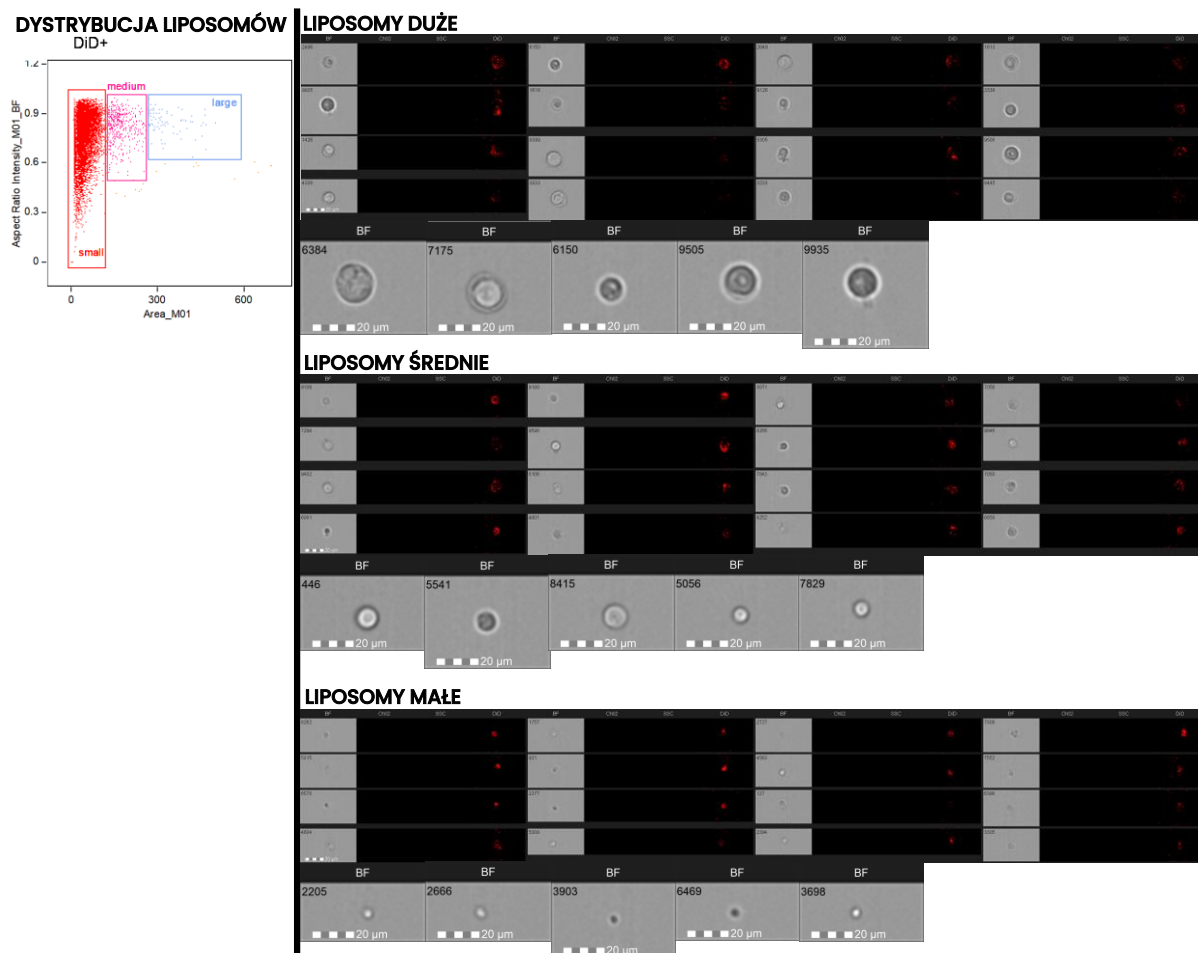
**Rycina 1. Dystrybucja liposomów pod względem grup wielkości z podziałem na liposomy małe (sub-populacja small) i liposomy średnie (sub-populacja medium) w próbce produktu Liposomalna kurkumina (kurkumin).**

Definicja sub-populacji miceli (DiD+) – lewy wykres typu dot plot, została oparta na parametrach: Gradient RMS BF, Aspect ratio Intensity BF oraz Area BF, pochodzące z cyfrowego przetwarzania obrazu komórek w jasnym polu widzenia (kanał BF – BrightField) oraz Intensity SSC z detektora side scatter SSC (kanał SSC) oraz Intensity DiD - intensywność czerwonej fluorescencji (kanał DiD), pochodzącej z lipofilowego barwnika DiD (Thermo Fisher Scientific, Germany) (maksimum emisji = 668nm). Zielona fluorescencja wnętrza cząsteczek liposomów pochodzi z kurkuminy - autofluorescencja (zakres emisji = 500 - 530nm) wzbudzonej światłem niebieskiego lasera 488nm. Wielkości analizowanych obiektów oceniano na podstawie narzędzia mierzącego w postaci skali konwertującej wielkości pixeli na wartości rzeczywiste wyrażane w mikrometrach (1

pixel = 1  $\mu\text{m}$ ). Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometru z obrazowaniem FlowSight (Luminex, USA) i oprogramowania IDEAS (Luminex, USA).



**Rycina 2. Dystrybucja liposomów pod względem grup wielkości z podziałem na liposomy małe (sub-populacja small), liposomy średnie (sub-populacja medium) oraz liposomy duże (sub-populacja large) w próbce produktu Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK).** Definicja sub-populacji miceli (DiD+) – lewy wykres typu dot plot, została oparta na parametrach: Gradient RMS BF, Aspect ratio Intensity BF oraz Area BF, pochodzące z cyfrowego przetwarzania obrazu komórek w jasnym polu widzenia (kanał BF – BrightField) oraz Intensity SSC z detektora side scatter SSC (kanał SSC) oraz Intensity DiD - intensywność czerwonej fluorescencji (kanał DiD), pochodzącej z lipofilowego barwnika DiD (Thermo Fisher Scientific, Germany) (maksimum emisji = 668nm). Wielkości analizowanych obiektów oceniano na podstawie narzędzia mierzącego w postaci skali konwertującej wielkości pixeli na wartości rzeczywiste wyrażane w mikrometrach (1 pixel = 1  $\mu\text{m}$ ). Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometru z obrazowaniem FlowSight (Luminex, USA) i oprogramowania IDEAS (Luminex, USA).



**Rycina 3. Dystrybucja liposomów pod względem grup wielkości z podziałem na liposomy małe (sub-populacja small), liposomy średnie (sub-populacja medium) oraz liposomy duże (sub-populacja large) w próbce produktu Liposomalna witamina C (C).** Definicja sub-populacji miceli (DiD+) – lewy wykres typu dot plot, została oparta na parametrach: Gradient RMS BF, Aspect ratio Intensity BF oraz Area BF, pochodzące z cyfrowego przetwarzania obrazu komórek w jasnym polu widzenia (kanał BF – BrightField) oraz Intensity SSC z detektora side scatter SSC (kanał SSC) oraz Intensity DiD - intensywność czerwonej fluorescencji (kanał DiD), pochodzącej z lipofilowego barwnika DiD (Thermo Fisher Scientific, Germany) (maksimum emisji = 668nm). Wielkości analizowanych obiektów oceniano na podstawie narzędzia mierzącego w postaci skali konwertującej wielkości pixeli na wartości rzeczywiste wyrażane w mikrometrach (1 pixel = 1 µm). Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometru z obrazowaniem FlowSight (Luminex, USA) i oprogramowania IDEAS (Luminex, USA).

Interpretacja wyników eksperymentu polegała na oznaczeniu stężenia (liczba cząstek liposomów na ml) oraz procentowego udziału zdefiniowanych sub-populacji liposomów: i) małych (small), ii) średnich (medium) oraz iii) dużych (large). Wyniki statystyczne prezentujące dystrybucję poszczególnych sub-populacji liposomów prezentuje rycina 4.

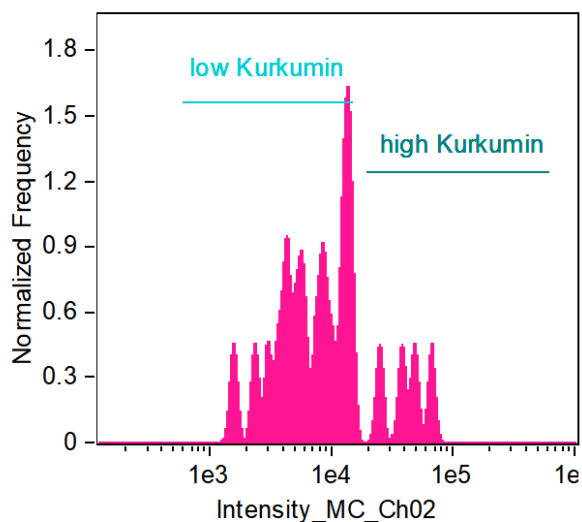
Próbka	liposomy (cząsteczki/ml)	Σ	SD	małe (%)	Σ	SD	średnie (%)	Σ	SD	duże (%)	Σ	SD
ADEK	709734.0	749526.4	28955.8	97.7	97.6	0.2	1.8	2.0	0.1	0.2	0.3	0.1
ADEK	777794.2			97.3			2.2			0.3		
ADEK	761050.9			97.6			2.1			0.2		
C	358590.2	351273.4	7851.7	92.9	92.7	0.2	5.5	5.7	0.1	1.0	0.9	0.1
C	340381.6			92.7			5.7			0.9		
C	354848.4			92.5			5.8			0.8		
Kurkumin	3871729.3	3775985.3	138194.0	99.0	98.2	0.6	1.0	1.8	0.5	0.0	0.1	0.0
Kurkumin	3580562.7			97.8			2.1			0.1		
Kurkumin	3875664.0			97.7			2.2			0.1		

**Rycina 4. Wyniki statystyczne stężenia (cząsteczki liposomów/ml) i procentowego udziału poszczególnych grup liposomów w badanych próbkach produktów: Liposomalna kurkumina (kurkumin), Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) i Liposomalna witamina C (C).**

Wszystkie analizowane próbki: Liposomalna kurkumina (kurkumin), Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) i Liposomalna witamina C (C) charakteryzowały się przewagą sub-populacji małych miceli (small), które stanowiły odpowiednio: 98,2; 97,6 i 92,7 % (przy odchyleniach standardowych (SD) na poziomie odpowiednio: 0,6; 0,2 i 0,2). Sub-populacja średnich miceli stanowiła dla próbek: kurkumin, ADEK i C odpowiednio: 1,8; 2,0 i 5,7 % (przy odchyleniach standardowych (SD) na poziomie odpowiednio: 0,5; 0,1 i 0,1). Próbka kurkumin wykazała zaledwie 0,1 % obiektów (liposomów) zdefiniowanych na podstawie wielkości jako duże (large).

Dodatkowo w próbce produktu Liposomalna kurkumina (kurkumin), w obrębie populacji średnich liposomów zdefiniowano, na podstawie wartości intensywności zielonej fluorescencji (kanał Ch02) pochodzącej z kurkuminy (autofluorescencja), 2 odrębne sub-populacje: liposomów: o niskiej zawartości kurkuminy (low kurkumin) oraz wysokiej zawartości kurkuminy (high kurkumin). Prezentuje to rycina 5. W ten sposób możliwe jest precyzyjne (bazujące na wartościach liczbowych z pomiaru intensywności fluorescencji przez detektory światła instrumentu (kamerę CCD)) określenie stopnia wypełnienia liposomów kurkumina.

## medium



### Intensity\_MC\_Ch02

Population	% Gated	Objects/mL	Median
medium & DiD+ & SSC+ & foc...	100	86563.05	8650.74
high Kurkumin & medium & D...	18.2	15738.74	43107.07
low Kurkumin & medium & Di...	81.8	70824.32	6720.64

Rycina 5. Histogram przedstawiający sub-populacje liposomów z próbki kurkuminy o niskiej zawartości kurkuminy (**low kurkumin**) oraz wysokiej zawartości kurkuminy (**high kurkumin**), wyodrębnione z sub-populacji średnich liposomów na podstawie intensywności zielonej autofluorescencji kurkuminy (wzbudzenie światłem lasera niebieskiego 488nm; autofluorescencja w zakresie 500 – 530nm). Tabela poniżej zawiera wartości stężenia liposomów (obiekty/cząsteczki na ml) oraz wartości median intensywności autofluorescencji kurkuminy.

### Podsumowanie

Zastosowanie nowoczesnej metody analitycznej – cytometrii przepływowej pozwoliło na potwierdzenie obecności form liposomalnych w trzech badanych produktach: Liposomalna kurkumina (kurkumin), Liposomalny kompleks witamin ADEK (ADEK) i Liposomalna witamina C



**Wykonawcy analizy (optymalizacja metody, dobór parametrów analitycznych, przygotowanie prób, wykonanie analizy głównej, selekcja uzyskanych wyników, przygotowanie sprawozdania):**

prof. dr hab. Wojciech Juzwa (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu),

dr inż. Michał Konieczny

**Autoryzacja i interpretacja wyników:**

prof. dr hab. Daria Szymanowska (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)