



**Katedra Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej**  
**Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych**  
**UNIwersytetu Medycznego w Lublinie**  
Collegium Universum, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin  
tel./fax +48 81 448 7080; e-mail: secretary@pharmacognosy.org

---

## **Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych**

*mgr farm. Agnieszki Bodalskiej*

pt.

**„Ocena zawartości i stabilności związków polifenolowych w produktach leczniczych zawierających przetwory z wybranych substancji roślinnych z rodziny Lamiaceae”,**

zrealizowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Leku Roślinnego  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Promotor:** Prof. dr hab. n. farm. Izabela Fecka  
**Promotor pomocniczy:** Dr n. farm. Adam Kowalczyk

### **1. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

#### **1.1. Ogólna problematyka badawcza dysertacji i jej oryginalność naukowa**

Problematyka badawcza przedłożonej do oceny dysertacji na stopień doktora nauk farmaceutycznych, w aspekcie doświadczalnym, dotyczyła analizy fitochemicznej, ukierunkowanej na ocenę profilu jakościowego i ilościowego oraz stabilności składników polifenolowych w 7 produktach leczniczych, wytwarzanych przez różnych producentów, zawierających przetwory etanolowo-wodne z substancji roślinnych (liście mięty pieprzowej, liście szatwii i ziela tymianku), pozyskiwanych z gatunków reprezentujących rodzinę Lamiaceae (jasnotowate). W aspekcie teoretycznym, w pracy przedstawiono krótką charakterystykę fitofarmakologiczną taksonów, z których pozyskuje się ww. substancje roślinne, oraz zasady standaryzacji pojedynczych przetworów i złożonych produktów leczniczych, zawierających wyciągi/nalewki z tych substancji roślinnych w oparciu o wymagania aktualnej Farmakopei Polskiej (FP) i Europejskiej (Ph. Eur.). We wprowadzeniu do dysertacji, Autorka wskazała na potrzebę pogłębiania usystematyzowanych badań fitochemicznych ww. przetworów, dotyczących zarówno składu i zawartości metabolitów polifenolowych: flawonoidów i pochodnych kwasów hydroksycynamonowych (ze względu na ich synergetyczne efekty działania farmakologicznego ze składnikami olejku eterycznego),



jak również oceny stabilności tych składników w oparciu o obowiązujące zalecenia zawarte w zatwierdzonych dokumentach Europejskiej Agencji Leków (EMA). We wskazanym powyżej zakresie, dotyczącym grupy wybranych roślinnych produktów leczniczych, dostępnych na polskim rynku farmaceutycznym, podstawowy zręb przeprowadzonych prac eksperymentalnych wraz z uzyskanymi wynikami, przedstawiony w cyklu 3 publikacji anglojęzycznych (D1-D3), posiada charakter oryginalny i stanowi wkład Autorki w poszerzenie aktualnego stanu wiedzy w obszarze analizy fitochemicznej oraz rozwoju badań na lekiem roślinnym.

## 1.2. Ocena kluczowych rezultatów badań i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Główne wyniki badań, zaprezentowane w rozdziale 4.1. dysertacji, odnoszą się do analizy fitochemicznej profilu jakościowego i zawartości związków polifenolowych w 7 roślinnych produktach leczniczych (wytwarzanych w Polsce przez kilku producentów) z wykorzystaniem zaawansowanych metod chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych.

Analiza polifenoli w 23 komercyjnie dostępnych preparatach, zawierających nalewkę miętową z olejkami eterycznymi miętowymi (*Menthae piperitae tinctura cum Menthae piperitae aetheroleo*) została szczegółowo przedstawiona w publikacji D1. Badania prowadzone z wykorzystaniem metody LC/MS zaowocowały łączną identyfikacją 33 związków polifenolowych, w tym 12 pochodnych kwasów hydroksycynamonowych, 20 składników flawonoidowych (w tym: 12 flawonów i 8 flawanonów) oraz 1 lignanu, a także, odrębnych strukturalnie, 2 pochodnych kwasu jasmonowego z grupy kwasów okso-cyklopentylo-monokarboksylowych. Na podkreślenie zasługuje fakt potwierdzenia, poza kwasem rozmarynowym, obecności innych, biologicznie aktywnych di- i oligomerycznych form kwasów hydroksycynamonowych (HCA), w tym kwasów litospermowych A i B (oraz ich izomerów) oraz kwasu didehydrosalwianolowego B, które zostały wcześniej opisane przez innych autorów w naparach i wyciągach alkoholowo-wodnych z liścia mięty pieprzowej. W obrębie ww. grupy chemicznej, Autorka dysertacji wykazała po raz pierwszy obecność kwasu salwianolowego C w nalewce z liścia mięty pieprzowej, który został wcześniej zidentyfikowany przez hiszpańskich naukowców w ziele *Mentha pulegium* L. Istotne wyniki badań z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR-MS/MS) oraz zgromadzonych danych literaturowych zaowocowały przedstawioną tabelarycznie analizą szlaków fragmentacji jonów prekursorowych tri- i tetramerycznych form HCA oraz interpretacją powstałych produktów fragmentacji, w tym dla jednego z oligomerów HCA - kwasu salwianolowego E.

Spośród zidentyfikowanych polifenoli, 10 głównych składników poddano analizie ilościowej z wykorzystaniem rewalidowanej metody badawczej opartej na wysokosprawnej chromatografii cieczowej z użyciem detektora z matrycą fotodiodową (LC/PDA). Zarówno w grupie badanych polifenoli, jak i oznaczanych składników flawonoidowych, najwyższą średnią zawartość wykazano dla eriocytryny (7-O- $\beta$ -rutynozydu eriodykcjolu), co potwierdziło doniesienia innych autorów na temat dominującej koncentracji tego flawanonu w liściu mięty pieprzowej i jego przetworach. Około trzykrotnie niższą średnią



zawartość (0,27 mg/mL) oznaczono dla glikozydu flawonowego: 7-*O*- $\beta$ -rutynozydu luteoliny. W grupie składników flawonoidowych, o stężeniu przekraczającym wartość granicy oznaczalności (LOQ), znalazły się dodatkowo: 7-*O*- $\beta$ -glukuronid i 7-*O*- $\beta$ -glukozyd luteoliny (oznaczone łącznie), 7-*O*- $\beta$ -rutynozyd naryngeniny, a także hesperydyna i diosmina (oznaczone łącznie). Najwyższą zawartość w grupie związków klasyfikowanych jako kwasy hydroksycynamonowe udokumentowano dla kwasu rozmarynowego, którego średnie stężenie w badanych preparatach wynosiło 0,14 mg/mL. Niestety, pozostałe di- i oligomeryczne pochodne HCA (w tym kwasy litospermowe i salwianolowe) nie zostały oznaczone ilościowo ze względu na niskie poziomy zawartości (poniżej ustalonej wartości LOQ).

Analiza składu i zawartości bioaktywnych polifenoli stanowiła także wiodącą tematykę badań przedstawionych w publikacji D2. Ocenie poddano 6 typów roślinnych produktów leczniczych (5 płynów do stosowania zewnętrznego i wewnętrznego i 1 syrop), zawierających wyciągi alkoholowo-wodne z liścia szalwii i/lub ziela tymianku, które nabyto w obrocie aptecznym w latach 2017-2020 w łącznej liczbie 38 preparatów. W analizie jakościowej i ilościowej polifenoli zastosowano analogiczne metody badawcze (LC/PDA i LC/MS) jak dla produktów, zawierających przetwory z liścia mięty pieprzowej, które opisano w publikacji D1. Efektem przeprowadzonej analizy jakościowej było zidentyfikowanie 65 i 57 składników polifenolowych, odpowiednio, w produktach zawierających przetwory z liścia szalwii i ziela tymianku, spośród których 8 związków z grupy HCA i flawonoidów wytypowano do dalszej analizy ilościowej. O profilu jakościowym i realnej zawartości ww. składników w odniesieniu do pierwotnych substancji roślinnych z rodziny Lamiaceae, z których otrzymano przetwory, można jednakże wnioskować jedynie w odniesieniu do preparatów, zawierających pojedyncze ekstrakty roślinne, takich jak: nalewka z szalwii oraz syrop tymiankowy, w których jako dominujące składniki w grupie polifenoli zidentyfikowano kwas rozmarynowy i 7-*O*- $\beta$ -glukuronid luteoliny. W pozostałych czterech złożonych produktach leczniczych profil jakościowy i ilościowy stanowił wypadkową składu i zawartości polifenoli nie tylko występujących w wyciągach z ziela tymianku i liścia szalwii, ale także ekstraktach z innych substancji roślinnych, w tym m.in. liścia mięty pieprzowej czy ziela hyzopu, pozyskiwanych z gatunków należących do rodziny jasnotowatych. W związku z tym, ponieważ zarówno w załączonej publikacji D2, jak i omówieniu wyników nie przedstawiono chromatogramów z przeprowadzonych analiz ww. produktów, kieruję moje pytanie do Doktorantki:

- Czy wieloskładnikowe matryce roślinne, zawarte w preparatach PEX1, PEX2, PEX3 oraz PIN1, nie wymagały rewalidacji metody badawczej LC/PDA ze względu na nakładanie się pasm chromatograficznych (pików) i trudności w uzyskaniu właściwego współczynnika rozdzielania dla oznaczanych związków polifenolowych?
- Proszę również Autorkę dysertacji o odniesienie się do problemu bardzo wysokich różnic (zmienności) w wynikach oznaczeń zawartości polifenoli, otrzymanych nie tylko dla tych samych typów preparatów, pochodzących od różnych producentów, ale i różnych serii



tego samego produktu leczniczego. Według moich szacunkowych obliczeń wartość parametru CV przekraczała bowiem (w niektórych przypadkach) nawet 85%!

Najbardziej cenną, w cyklu prac zgłoszonych do oceny recenzenckiej, zarówno pod względem oryginalności tematyki badawczej i uzyskanych wyników, jak i praktycznego znaczenia w obszarze badań nad jakością leku roślinnego, jest dla mnie publikacja D3. Zaprezentowano w niej szczegółowe i bardzo dobrze udokumentowane badania dotyczące, oceny stabilności dominujących składników polifenolowych - kwasu rozmarynowego, 7-O- $\beta$ -glukuronidu luteoliny oraz eriocytryny w wybranych produktach leczniczych, zawierających wyciągi etanolowo-wodne z ziela tymianku, liścia szafwii i liścia mięty pieprzowej, po przechowywaniu tych preparatów w warunkach i czasie zgodnym z wytycznymi ICH dla testów stabilności: długoterminowego, pośredniego i przyspieszonego. Wyniki badań wykazały m.in. najwyższą stabilność kwasu rozmarynowego w preparatach monoskładnikowych (nalewce z szafwii), zawierających wyciągi etanolowo-wodne z substancji roślinnej. Wyższą stabilność odnotowano także dla 7-O- $\beta$ -glukuronidu luteoliny, obecnego w preparacie dwuskładnikowym, stanowiąc mieszaninę ekstraktów etanolowo-wodnych z liścia szafwii i ziela tymianku. Autorka dysertacji, w omówieniu wyników badań z tej części prac eksperymentalnych (Rycina 2), przedstawiła interesujące zestawienie okresów ważności poszczególnych polifenoli, oszacowanych na podstawie badań stabilności, oraz deklarowanych przez producentów, które (niestety) potwierdziło niską stabilność badanych składników polifenolowych, zwłaszcza w produktach o obniżonej zawartości etanolu (*Thymi sirupus compositus*). W tym miejscu, chciałabym odnieść się do ogólnych wniosków końcowych (Rozdz. 6) przedstawionych przez Autorkę dysertacji. W mojej ocenie, stwierdzenie (zawarte w trzecim wniosku), iż, Cyt. „dla zapewnienia stałej i powtarzalnej jakości produktów leczniczych, zawierających wyciągi płynne z liścia mięty pieprzowej, liścia szafwii i ziela tymianku niezbędna jest rewizja dotychczasowego podejścia analitycznego w odniesieniu do materiału wyjściowego, jak i gotowego produktu leczniczego... oraz poszerzenie wymagań o standaryzację zawartości kwasu rozmarynowego i/lub flawonoidów”, jest tylko po części uprawnione. Należy zwrócić uwagę, że część z produktów, stanowiących materiał do badań w niniejszej dysertacji to produkty farmakopealne. Przykładowo, badany produkt: nalewka miętową z olejkim eterycznym miętowym, znany na polskim rynku farmaceutycznym pod synonimową nazwą „krople miętowe”, posiada monografię narodową w FP. Ponieważ, zgodnie z recepturą farmakopealną, nalewkę otrzymuje się za pomocą ekstrakcji liścia mięty pieprzowej etanolem (90% V/V), a następnie do otrzymanego przetworu (95 cz.) dodaje się 5 cz. olejku eterycznego miętowego, jest uzasadnione, że dla tego produktu ustalono wymagania jakościowe, dotyczące zawartości olejku eterycznego. Kontrolę tożsamości ww. przetworu (wg FP) prowadzi się metodą TLC z wykorzystaniem roztworu porównawczego, także zawierającego składniki olejku eterycznego miętowego (mentol, octan mentylu, cyneol) oraz dodatkowego markera chemicznego: tymolu. Podobne kryteria oceny jakościowej stosuje się dla wyciągu tymiankowego płynnego (*Thymi extractum fluidum*), posiadającego monografię narodową w FP, który otrzymuje się metodą wytrawiania ziela tymianku z użyciem mieszaniny



rozpuszczalników, zawierającej wodorotlenek amonowy 10%, glicerol 85%, etanol 90-96% (V/V) i wodę oczyszczoną. Wymagania jakościowe dla tego preparatu, dotyczą zawartości tymolu, jako głównego, biologicznie aktywnego składnika fenolowego olejku eterycznego, występującego w ziele tymianku. Analogiczne kryterium jakościowe, dotyczące zawartości tymolu, zawarto w monografii narodowej FP dla syropu tymiankowego złożonego (*Thymi sirupus compositus*), który *de facto* jest kompozycją trójskładnikową, złożoną z płynnego wyciągu tymiankowego, tymolu i wodorotlenku amonowego 10% w bazie syropu prostego (*Sirupus simplex*). W przypadku innych przetworów roślinnych, stanowiących składniki produktów leczniczych, objętych badaniami w niniejszej dysertacji, ich opisy w monografiach FP są zbliżone. Przykładowo, nalewka z szałwii (występująca w preparatach oznaczonych jako PEX1, PEX4) ze względu na jej otrzymywanie z liścia szałwii za pomocą 70% (V/V) etanolu posiada również zdefiniowane wymagania zawartości, dotyczące olejku eterycznego.

Receptury preparatów roślinnych, opracowanych na bazie wyciągów etanolowo-wodnych, zostały w odpowiednim czasie zgłoszone do Europejskiej Agencji Leków (EMA) m.in. przez polskich ekspertów w procesie gromadzenia danych naukowych z badań oraz dokumentacji wytwórczej, niezbędnych do opracowania monografii EMA oraz raportów oceniających (*Assessment report*) dla ziela tymianku, liścia mięty pieprzowej czy liścia szałwii. Następnie, poddano je ocenie i wskazano kryteria dotyczące standaryzacji jakościowej, które ostatecznie zostały zaakceptowane przez grono specjalistów, skupionych w Komitecie ds. Roślinnych Produktów Leczniczych (*Committee on Herbal Medicinal Products - HMPC*) EMA, odpowiedzialnym za wspieranie procesu harmonizacji i jakość leków roślinnych, podlegających dystrybucji na rynku europejskim. Decyzje te podjęto zarówno ze względu na istotny udział składników olejku eterycznego w działaniu farmakologicznym tych produktów, ale także udokumentowaną stabilność składników olejku eterycznego w deklarowanym okresie ich przechowywania, która jest niezbędna do akceptacji danego fitoskładnika w procesie standaryzacji, jako markera aktywnego lub chemicznego. Należy zauważyć, że powyższe stanowisko HMPC nie dotyczyło na przykład wyciągów suchych z liścia mięty pieprzowej czy liścia melisy, które, zgodnie z monografiemi Ph.Eur. i FP, standaryzuje się na zawartość kwasu rozmarynowego, ponieważ w ekstraktach suchych składnik ten nie podlega działaniu czynników hydrolitycznych i zachowuje odpowiednią stabilność w okresie długoterminowym. Ponadto, zarówno kwas rozmarynowy (i inne HCA), jak i określone związki flawonoidowe, stanowią składniki roztworów porównawczych, wykorzystywanych w badaniach jakościowych (Tożsamość C) prowadzonych metodą chromatografii cienkowsarstwowej, opisanych w monografiach FP dla znanych substancji roślinnych z rodziny jasnotowatych: liścia mięty pieprzowej, liścia rozmarynu, ziela tymianku, ziela macierzanki czy korzenia i kłączy szałwii czerwonokorzeniowej (kwas salwianolowy B). Tak więc, nie dyskredytując dobrych intencji Autorów badań odnośnie potrzeby polepszania jakości produktów leczniczych, opisanych w publikacjach D1-D3, poprzez rozszerzenie wymagań jakościowych, polegające na dodatkowej ocenie zawartości składników polifenolowych, należy uwzględnić, że obecne wymagania farmakopealne są właśnie efektem wypracowanego kompromisu, opartego na analizie wyników



wieloośrodkowych badań naukowych, a także uwzględniają potrzebę zmniejszenia wysokich kosztów rutynowej kontroli jakości tych produktów, zgłaszaną przez europejskich wytwórców leków roślinnych.

### 1.3. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

W uzasadnieniu podjętej tematyki badawczej oraz prezentacji wyników badań, Autorka dysertacji nie ustrzegła się błędów i nieuprawnionych uproszczeń składniowych, świadczących o nie do końca opanowanej przez Nią polskiej terminologii naukowej, stosowanej zwłaszcza w opisie badań analitycznych, prowadzonych z wykorzystaniem technik chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych.

Z obowiązku recenzenta, chciałabym odnieść się poniżej do głównych nieścisłości formalno-językowych, stylistycznych i interpunkcyjnych, jakie zauważyłam w opisie zagadnień teoretycznych i doświadczalnych oraz wyników badań, przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej:

- **str. 8** – *jest*: „Za aktywność leczniczą liścia mięty pieprzowej – *Menthae piperitae folium*, odpowiedzialny jest olejek eteryczny” – *powinno być*: „Za aktywność leczniczą liścia mięty pieprzowej – *Menthae piperitae folium*, odpowiedzialne są określone składniki olejku eterycznego”;
- na **str. 8** (i kolejnych stronach dysertacji) zastosowano przestarzałe nazewnictwo: „kwas fenolowe (= fenolokwasy) pochodne kwasu kawowego”, które powinno być zastąpione terminem: „kwas hydroksycynamonowy” stosowanym dla tej grupy związków w aktualnych edycjach Farmakopei Europejskiej (Ph.Eur.) i Farmakopei Polskiej (FP) oraz najnowszych publikacjach naukowych;
- **str. 8** – *jest*: „Według aktualnych edycji Farmakopei Europejskiej (Ph.Eur.) i Farmakopei Polskiej (FP) w liściu mięty pieprzowej olejek eteryczny powinien występować w ilości nie mniejszej niż 12 mL/kg w nierozdrobnionej lub 9 mL/kg w pociętej substancji roślinnej...” – *powinno być*: „Zgodnie z monografią liścia mięty pieprzowej, zamieszczoną w aktualnym wydaniu Farmakopei Europejskiej (Ph.Eur.) i odpowiadającym mu wydaniu Farmakopei Polskiej (FP), zawartość olejku eterycznego w całej i rozdrobnionej substancji roślinnej powinna wynosić, odpowiednio, nie mniej niż 12 i 9 mL/kg w przeliczeniu na bezwodną substancję roślinną”; ponadto, w monografii FP liścia mięty pieprzowej nie zawarto (jak to opisała Autorka) wymagań dotyczących wartości granicznych zawartości dla mentolu oraz mentonu, które zamieszczono w monografii FP olejku eterycznego miętowego (*Menthae piperitae aetheroleum*);
- **str. 8** – *jest*: „składów nielotnych” – *powinno być*: „składników nielotnych”;
- **str. 9** – *jest*: „standaryzowane na kwas rozmarynowy” – *powinno być*: „standaryzowane na zawartość kwasu rozmarynowego”;
- **str. 9** – *jest*: „zawartość pochodnych kwasów orto-dihydroksycynamonowego lub hydroksycynamonowego” – *powinno być*: „zawartość sumy pochodnych kwasu orto-dihydroksycynamonowego, w przeliczeniu na akteozyd lub sumy pochodnych hydroksycynamonowych, w przeliczeniu na kwas rozmarynowy”;



- **str. 10** – *jest:* „badanie ich stabilność” – *powinno być:* „badanie ich stabilności”;
- **str. 11** – *jest:* „z zastosowaniem współczesnych technik chromatograficznych” – *powinno być:* „z zastosowaniem współczesnych technik chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych”;
- str. 11** – *jest:* „o różnych numerach seryjnych” – *powinno być:* „o różnych numerach serii”;
- str. 11** – *jest:* „w produktach leczniczych zawierających wyciągi z roślin będących tematem rozprawy” – *powinno być:* „w produktach leczniczych, zawierających przetwory wodno-etanolowe z zieleń tyminianku, liście szafalii i liście mięty pieprzowej”;
- str. 12** – w Tabeli 1 (kolumna: Składniki roślinne) nieprawidłowo podano nomenklaturę łacińską składników recepturowych, wchodzących w skład poszczególnych produktów leczniczych. Przykładowo - *jest:* „Wyciąg płynny tymiankowy (*Thymus vulgaris* L.)” – *powinno być:* „Wyciąg płynny tymiankowy (*Thymi herbae extractum fluidum*)”; *jest:* „Nalewka z liście szafalii (*Salvia officinalis* L.)” – *powinno być:* „Nalewka z szafalii (*Salviae tinctura*)”, itd.;
- str. 12** – w Tabeli 1, w składzie recepturowym produktu leczniczego oznaczonego symbolem PEX2 (Salviasept, Herbapol-Lublin STR.A.), nie wymieniono 2 komponentów terpenowych olejków eterycznych: mentolu i cyneolu, występujących odrębnie w tym preparacie;
- str. 12** – w Tabeli 1 (kolumna: Składniki roślinne), dla opisu wyciągów płynnych, wchodzących w skład złożonych produktów, oznaczonych symbolem PEX2, PEX3, PIN1, powinno stosować się zapis formalny: Wyciągi płynne z... (ziela tymianku, liście mięty pieprzowej, ziela hyzopu, itp.);
- **str. 13** – *jest:* „Otrzymane próbki rozcieńczono do stężeń.....za pomocą 50% wodnego roztworu metanolu (v/v)” – *powinno być:* „Sporządzono serię rozcieńczeń roztworów podstawowych substancji wzorcowych z użyciem 50% (V/V) metanolu w zakresie stężeń od... do...”;
- **str. 13** – *jest:* „detektora diodowego DAD-3000 oraz detektora ESI-qTOF” – *powinno być:* „detektora z matrycą fotodiodową DAD-3000 oraz analizatora mas ESI-qTOF”;
- **str. 13** – *jest:* „jako eluenty zastosowano 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) i 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v)” – *powinno być:* „jako składniki fazy ruchomej użyto 0,1% (V/V) kwas mrówkowy i 0,1% (V/V) roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu”;
- **str. 14** – *jest:* „próbki analizowano w trzech długościach światła UV” – *powinno być:* „detekcję składników polifenolowych w badanych próbach prowadzono w zakresie promieniowania UV przy trzech długościach fali”;
- **str. 14** – *jest:* „5% Wodny roztwór kwasu mrówkowego (v/v) i 5% acetonitrylowy roztwór kwasu mrówkowego (v/v) zostały użyte jako eluent” – *powinno być:* „jako składniki fazy ruchomej użyto 5% (V/V) kwas mrówkowy i 5% (V/V) roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu”;
- **str. 15** – *jest:* „testem Browna-Forsythea” – *powinno być:* „z użyciem testu Browna-Forsythe’a”;
- **str. 15** – *jest:* „Otrzymane w publikacji D3 wyniki zostały poddane analizie regresji w celu oszacowania stabilności badanych produktów leczniczych” – *powinno być:* „Wyniki oznaczeń



ilościowych, otrzymane w badaniach produktów leczniczych, opisanych w publikacji D3, zostały poddane analizie regresji liniowej w celu oszacowania stabilności poszczególnych składników polifenolowych, zawartych w tych preparatach”;

- **str. 15** – *jest*: „dane zostały przeliczone na procent początkowej zawartości, następnie zlogarytmowane i poddane testowi F dla wykazania jednorodności wariancji” – *powinno być*: „Uzyskane wyniki oznaczeń ilościowych poddano rekalkulacji i wyrażono w postaci procentowego udziału, odniesionego do początkowej zawartości polifenoli w badanych preparatach. Następnie, uzyskane wartości procentowe zlogarytmowano i poddano analizie z użyciem testu-F w celu oszacowania jednorodności wariancji w badanych szeregach statystycznych”;

- **str. 15** i na kolejnych stronach – *jest*: „wykryto obecność 35 związków” – *powinno być*: „zidentyfikowano 35 związków”;

- **str. 15** – *jest*: „Głównym składnikiem była eriocytryna (flawanon) z maksymalnym stężeniem 1,77 mg/mL, minimalnym 0,09 mg/mL i średnią 0,81 mg/mL” – *powinno być*: „Głównym składnikiem była eriocytryna (flawanon), dla której wyznaczone wartości maksymalnego, minimalnego i średniego stężenia wynosiły odpowiednio: 1,77; 0,09 i 0,81 mg/mL”;

- **str. 15** i podobne sformułowania na kolejnych stronach – *jest*: „(średnia 0,14 mg/mL)” – *powinno być*: „(średnia wartość: 0,14 mg/mL)”;

- **str. 16, 17 i 19** – *jest*: „*Thymi sirupus compositum*” – *powinno być*: „*Thymi sirupus compositus*”;

- **str. 16** – *jest*: „Najważniejsze flawonoidy oznaczone w tych płynnych preparatach do stosowania zewnętrznego to” – *powinno być*: „Związki flawonoidowe, występujące w najwyższym stężeniu w płynnych preparatach do stosowania zewnętrznego to...”;

- **str. 17** – *jest*: „Rycina 1. Zestawienie zawartość związków polifenolowych, fenolokwasów i flawonoidów w analizowanych płynnych lekach roślinnych, oznaczonych metodą HPLC-DAD” – *powinno być*: „Rycina 1. Zestawienie średnich sumarycznych wartości stężeń fenolokwasów i flawonoidów oraz łącznej koncentracji obu grup polifenoli w 7 produktach leczniczych poddanych badaniom z wykorzystaniem metody LC/DAD”;

- **str. 17** (legenda do Ryc. 1) – *jest*: „PEX1 (STE) – wyciąg płynny z szafwii i tymianku do stosowania wewnętrznego” – *powinno być*: „PEX1 (STE) – wyciąg płynny z szafwii i tymianku do stosowania zewnętrznego”;

- **str. 18** – *jest*: „Nie udało się oszacować stabilności tego związku w preparacie wodnym – syropie tymiankowym złożonym (TS)” – *powinno być*: „Nie udało się oszacować stabilności tego związku w syropie tymiankowym złożonym (TS), jako preparacie zawierającym w składzie hydrofilowe substancje pomocnicze, w tym: wodorotlenek amonowy 10%, glicerol 85% i wodę oczyszczoną”;

- **str. 18** – *jest*: „Amoniak wchodzący w skład syropu tymiankowego...” – *powinno być*: „Wodorotlenek amonowy 10%, wchodzący w skład syropu tymiankowego”;

- **str. 18** – *jest*: „w 18 i 24 miesiącu badania” – *powinno być*: „w 18. i 24. miesiącu badań”;



- **str. 18** – *jest:* „Oszacowane na podstawie badań stabilności indywidualnych polifenoli (słupki wyróżnione kolorem) oraz deklarowane przez producenta daty ważności (słupki szare) przedstawiono na Rycinie 2” – *powinno być:* „Na Rycinie 2 przedstawiono okresy ważności poszczególnych polifenoli (słupki wyróżnione kolorem), oszacowane na podstawie badań stabilności oraz deklarowane przez producentów (słupki szare)”;
- **str. 19** – *jest:* „W badaniach własnych przy wykorzystaniu metod chromatograficznych i detektora mas...” – *powinno być:* „W badaniach własnych przy wykorzystaniu metod chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrii mas...”;

Wszystkie powyższe uwagi, odnoszące się zarówno do warstwy edytorskiej, jak i merytorycznej tekstu dysertacji, należałoby uwzględnić w przypadku planowania dalszych, polskojęzycznych opracowań zagadnień, stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej. Uwagi te nie umniejszają jednakże mojej wysokiej oceny w odniesieniu do opisu metodologii i dyskusji wyników badań, zawartych w anglojęzycznych publikacjach D1-D3, załączonych w dysertacji.

## **2. Ocena metodologiczna rozprawy doktorskiej**

### **2.1. Dobór piśmiennictwa, umiejętność wykorzystania źródeł**

Dobór piśmiennictwa naukowego w publikacjach D1-D3, zamieszczonych w cyklu zgłoszonym do oceny recenzenckiej, jest bogaty i został właściwie wykorzystany w omówieniu i dyskusji wyników, zawartych w ww. pracach. Niestety, umiejętność użycia tych samych źródeł w polskojęzycznym wprowadzeniu do dysertacji, a zwłaszcza prezentacji głównych wyników badań i ich podsumowaniu pozostawia pewien niedosyt. Na str. 23-24, Doktorantka zamieściła co prawda 19 pozycji piśmiennictwa naukowego, jednakże zostały one wykorzystane w rozprawie prawie wyłącznie do opisu znanych właściwości farmakologicznych składników substancji roślinnych (lub ich przetworów), wchodzących w skład badanych produktów, lub są to rekomendacje i ogólne kryteria oceny jakości zawarte w monografiach FP i Ph.Eur. oraz dokumentach końcowych EMA i ICH, odnoszących się do tych produktów leczniczych. W tym miejscu oraz we wcześniejszych rozdziałach dysertacji, bardziej wskazane byłoby wykorzystanie treści i zacytowanie prac, które umożliwiłyby zwięźłą (a zarazem krytyczną) prezentację wyników własnych badań doświadczalnych na tle rezultatów opublikowanych przez innych autorów.

### **2.2. Poprawność formułowania celów i hipotez badawczych**

Jako wiodący cel prowadzonych badań doświadczalnych, przedstawiony w rozdziale 2, Autorka dysertacji wskazała ocenę (weryfikację) profilu jakościowego i ilościowego składników nietlotnych z grupy polifenoli w 7 roślinnych produktach leczniczych (pochodzących od różnych producentów), które zawierały przetwory z liścia mięty pieprzowej, liścia szafwii oraz ziela tymianku, jak również badania stabilności wybranych związków polifenolowych w ww. preparatach leczniczych. W rozdziale tym zabrakło, w mojej ocenie, sformułowania wstępnych hipotez badawczych (odnoszących się m.in. do zasadności rozszerzania kryteriów oceny zawartości składników badanych preparatów o grupę



pochodnych HCA i/lub flawonoidów), które należało weryfikować w trakcie, a zwłaszcza po uzyskaniu wyników prac eksperymentalnych, odnosząc je do zgromadzonych danych literaturowych i doświadczeń innych badaczy. Wspomniana wyżej problematyka została bowiem tylko w pewnym zakresie omówiona we wprowadzeniu oraz dyskusji wyników, zawartych w publikacjach D1-D3, ze względu na zakres prezentowanych w nich częściowych badań analitycznych, oceniających poszczególne aspekty związane z oceną zawartości lub stabilności bioaktywnych polifenoli w badanych produktach leczniczych.

### **2.3. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania**

Dobór właściwej metodyki i narzędzi badawczych, zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Agnieszki Bodalskiej niewątpliwie stanowi pochodną kilkunastoletnich badań naukowych, prowadzonych pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej w ośrodku wrocławskiej Farmakognozi. Dotyczyły one różnorodnych składników biologicznie aktywnych w przetworach, otrzymywanych z substancji roślinnych, których źródło pozyskiwania stanowią gatunki reprezentujące rodzinę jasnotowatych (Lamiaceae). Efektem tego są m.in. opracowane wcześniej metody badawcze, obejmujące analizę jakościową i ilościową składników polifenolowych z grupy HCA i flawonoidów z wykorzystaniem sprzężonych wysokosprawnych technik chromatograficznych i spektroskopii UV oraz wysokorozdzielczych technik spektrometrycznych. W pracach eksperymentalnych, prowadzonych w ramach realizacji niniejszej dysertacji, Doktorantka umiejętnie zastosowała zrewalidowaną procedurę analityczną (LC/PDA), w ocenie zawartości polifenoli oraz stabilności kwasu rozmarynowego i wybranych związków flawonoidowych w badanych produktach leczniczych. W odniesieniu do trafności doboru metod i narzędzi badawczych, na pochwałę w niniejszej dysertacji zasługuje istotne wsparcie obróbki danych eksperymentalnych poprzez zastosowanie odpowiednich testów statystycznych, oferowanych w programie STATISTICA 13.3 (publikacja D2 i D3), co m.in. umożliwiło prawidłową ocenę istotności uzyskanych wyników oznaczeń ilościowych.

W nawiązaniu do zrealizowanych badań analitycznych z wykorzystaniem metody LC/PDA, prosiłabym Autorkę dysertacji o ustosunkowanie się do następujących pytań/zagadnień:

- W jakim zakresie pierwotna metoda badawcza LC/PDA (opracowana przez Panią profesor Izabelą Fecką i doktora Sebastiana Turka i opublikowana w 2008 r. w czasopiśmie *Food Chemistry*) była rewalidowana w związku z procesem analizy jakościowej i ilościowej składników polifenolowych produktów leczniczych, będących przedmiotem badań w niniejszej dysertacji?
- Czy w ramach rewalidacji ww. metody analitycznej podjęto np. próbę jej optymalizacji i zwiększenia rozdzielczości pików niektórych składników polifenolowych, np. 7-O- $\beta$ -glukuronidu i 7-O- $\beta$ -glukozydu luteoliny oraz hesperydyny i diosminy (obecnych w preparatach zawierających nalewkę miętową), które w badaniach, przedstawionych w publikacjach D1 i D2, oznaczano łącznie?



- Ponieważ w tytule publikacji D3 zawarto sformułowanie „A Preliminary Study” – proszę przedstawić, jakie dodatkowe badania stabilności tych produktów będą (lub są obecnie) prowadzone.

#### **2.4. Poprawność układu pracy doktorskiej i struktury podziału treści**

Rozprawa doktorska liczy 90 stron i charakteryzuje się dobrze zaplanowaną, przejrzystą strukturą, odpowiednią dla tego typu opracowań. Główny zrąb pracy poprzedzony jest streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem danych bibliograficznych 3 artykułów naukowych, stanowiących podstawę dysertacji na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Kluczowe rozdziały rozprawy doktorskiej obejmują: wprowadzenie, cel podjętych badań, materiały i metody (ta część zawiera m.in. tabelaryczną prezentację 7 grup produktów leczniczych, objętych badaniami doświadczalnymi oraz charakterystykę przeprowadzonych testów stabilności), najważniejsze wyniki i ich podsumowanie, wnioski oraz piśmiennictwo. Zgodnie z wymaganiami dla rozpraw doktorskich, stanowiących cykl opublikowanych prac naukowych, załączono oświadczenia określające indywidualny wkład wszystkich współautorów. Autorka dysertacji przedstawiła także (potwierdzony przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu) opis bibliograficzny swojego dorobku naukowego, obejmującego współautorstwo artykułów w czasopismach naukowych z IF (8 pozycji) i nieposiadających IF (3 pozycje), oraz streszczeń zjazdowych (21 pozycji), o łącznej wartości współczynnika wpływu IF = 17,617 oraz punktacji MEiN = 645. Ponadto, zaprezentowała swoje osiągnięcia związane z nabywaniem kompetencji naukowych (studia, staże, szkolenia, projekty badawcze), działalnością dydaktyczną, organizacyjną i popularyzującą naukę.

Układ pracy doktorskiej i struktura podziału treści są prawidłowe i nie budzą moich zastrzeżeń.

### **3. Podsumowanie i wnioski końcowe**

W podsumowaniu oceny recenzenckiej niniejszej rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych, pragnę podkreślić, iż przedstawiona dokumentacja, obejmująca 3 prace oryginalne w anglojęzycznych czasopismach naukowych: *Molecules*, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* oraz *Pharmaceuticals*, o łącznym współczynniku wpływu IF = 10,604 (340 pkt MEiN), a także załączona w opisie bibliograficznym lista 5 dodatkowych, pełnotekstowych publikacji (o sumarycznym IF = 7,013), 3 prac poglądowych oraz 21 komunikatów zjazdowych, których Pani mgr farm. Agnieszka Bodalska jest współautorką, świadczą o Jej zaangażowaniu i umiejętności prowadzenia i dokumentowania wyników nowoczesnych i wielopłaszczyznowych badań eksperymentalnych, prowadzonych pod kierunkiem doświadczonych naukowców Katedry i Zakładu Farmakognozji i Leku Roślinnego UM we Wrocławiu.

Odnosząc się do całokształtu dokonań naukowych, zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, stwierdzam, iż przedłożona do oceny dokumentacja spełnia warunki określone w art. 13, ust. 1 ustawy z dn. 14. marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule

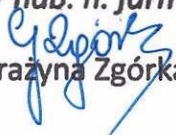


naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.), zawierając oryginalne rozwiązania problemów naukowych. Zostało to również potwierdzone przez recenzentów w procesie wydawniczym 3 anglojęzycznych publikacji, zawartych w cyklu stanowiącym podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

W związku z powyższym, składam wniosek końcowy o dopuszczenie Pani mgr farm. Agnieszki Bodalskiej do dalszych etapów postępowania, dotyczącego nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom naukowy prowadzonych prac eksperymentalnych, przedstawionych w niniejszej dysertacji, jak również istotny aspekt praktyczny uzyskanych wyników, w obszarze dotyczącym badań nad jakością leku roślinnego, zwracam się z prośbą o przyjęcie mojego wniosku o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Agnieszki Bodalskiej.**

Lublin, 02. września 2022 r.

*dr hab. n. farm.*  
  
Grażyna Zgórska