



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 27 sierpnia 2019 r.

Dr hab. Jolanta Kochana, prof. UJ
Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 24 18
email: jolanta.kochana@uj.edu.pl

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr Konrada Rudnickiego**

zatytułowanej

„Elektrochemiczne badania wybranych leków weterynaryjnych”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska powstała w Zakładzie Elektroanalizy i Elektrochemii w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Sławomiry Skrzypek. Promotorem pomocniczym pracy był dr Sławomir Domagała.

Praca doktorska dotyczy elektrochemicznych badań nad wybranymi związkami organicznymi, szeroko stosowanymi jako leki weterynaryjne. Prace prowadzono głównie pod kątem możliwości opracowania nowych metod analitycznych służących do oznaczania tych farmaceutyków. Elektrochemiczne metody analizy należą do szybko rozwijających się gałęzi chemii analitycznej. Związane jest to z faktem, iż spełniają one współczesne wymagania stawiane nowym metodom analitycznym. Wymienić tu należy brak konieczności skomplikowanego przygotowania próbki, krótki czas wykonania analizy, wysoką selektywność, niskie granice oznaczalności, łatwość wykonania pomiaru oraz możliwość miniaturyzacji i automatyzacji. Ciągły rozwój cywilizacyjny, w szczególności w obrębie medycyny i przemysłu farmaceutycznego, jest jedną z wielu przyczyn powstawania

nowych zagrożeń związanych z obecnością substancji leczniczych oraz ich metabolitów w różnych elementach środowiska. Szczególnie dużą grupę zanieczyszczeń środowiskowych tworzą antybiotyki, jedne z najczęściej stosowanych farmaceutyków w medycynie oraz hodowli zwierząt. Stanowią one niemal 70% wszystkich preparatów leczniczych używanych w weterynarii, dodatkowo stosowane są jako składniki pasz, nie tylko w celach profilaktycznych, ale również by przyspieszyć wzrost i zwiększyć wydajność hodowli. Występowanie antybiotyków zarówno w produktach odzwierzęcych, jak i w środowisku może wywoływać reakcje alergiczne, tworzenie się nowych szczepów bakterii odpornych na działanie leków, wykazują one również działanie kancerogenne i mutagenne. Pociąga to za sobą konieczność zarówno oznaczania, jak i monitorowania obecności tych związków w różnych elementach środowiska. Biorąc pod uwagę powyższe, tematyka recenzowanej pracy wpisuje się w bardzo aktualny nurt współczesnej elektrochemii analitycznej i analityki środowiskowej, uwzględniając zarówno wybór badanych związków, jak i stosowane techniki badawcze. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż poza stosowanymi często technikami elektrochemicznymi, takimi jak woltamperometria cykliczna czy woltamperometria fali prostokątnej, mgr K. Rudnicki wykorzystał w swojej pracy woltamperometrię przeniesienia jonu (*ITV – Ion Transfer Voltammetry*), badając zjawiska zachodzące na granicy dwóch nie miesających się cieczy (*ITIES – Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions*). Technika ta, zaliczana do niekonwencjonalnych metod elektroanalitycznych, posiada szereg zalet wyróżniających ją spośród innych technik elektroanalitycznych, umożliwia m.in. oznaczanie substancji nie ulegających reakcjom redoksowym na klasycznych elektrodach stałych, posiada również szerokie możliwości miniaturyzacji. Warto zauważyć, że badania zjawisk zachodzących na granicy niemiesających się cieczy pozwalają na wyznaczenie szeregu parametrów ważnych z punktu widzenia procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych.

Recenzowaną pracę otwiera bardzo przydatny spis stosowanych skrótów, po których następują cztery główne części rozprawy: autoreferat, opis sylwetki Autora, publikacje będące podstawą rozprawy oraz oświadczenia współautorów. Autoreferat, napisany na 34 stronach, został podzielony na kilka rozdziałów. Otwiera go wstęp umiejętnie wprowadzający czytelnika w ogólne zagadnienia związane z tematyką pracy oraz uzasadniający celowość podjętych badań. W kolejnym rozdziale Autor szczegółowo przedstawił tematykę badawczą pracy, a następnie opisał farmaceutyki, które stanowiły przedmiot badań. Po krótkim, ale wystarczającym opisie stosowanej aparatury badawczej, w dwóch rozdziałach przedstawiono najważniejsze wyniki przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej badań oraz najistotniejszą część dyskusji. Autoreferat zamyka podsumowanie oraz spis cytowanej literatury, obejmujący 91 pozycji.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest 5 oryginalnych prac naukowych obejmujących spójną tematykę badań elektrochemicznych nad lekami weterynaryjnymi, pod kątem możliwości

opracowania metod analitycznych dedykowanych do oznaczania tych farmaceutyków. Trzy prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie czasopism JCR, w szczególności w *Journal of Electrochemical Chemistry* (IF_{2017/18} 3,218), *Microchemical Journal* (IF_{2017/18} 3,206) oraz *Analytical Chemistry* (IF_{2017/18} 6,350). Kolejne dwie publikacje, wysłane do *Analytica Chimica Acta* (IF_{2017/18} 5,256) oraz *Electroanalysis* (IF_{2017/18} 2,691), a więc czasopism również renomowanych, zostały po recenzjach odesłane Autorom do wprowadzenia niewielkich poprawek, można więc stwierdzić, że znajdują się w końcowym etapie publikacyjnym.

Badania przeprowadzone przez mgr Konrada Rudnickiego można podzielić na dwie części: w pierwszej Doktorant badał trzy leki weterynaryjne wykorzystując klasyczne techniki elektroanalityczne, natomiast przedmiotem badań drugiej części pracy były cztery antybiotyki weterynaryjne z grupy fluorochinolonów, które zostały zbadane elektrochemicznie na granicy dwóch niemieszających się cieczy z wykorzystaniem woltamperometrii przeniesienia jonu.

Pierwsza część badań, opisana w trzech publikacjach, objęła salinomycynę, monenzynę oraz klorsulon. Przemiany elektrochemiczne dwóch pierwszych związków monitorowano z wykorzystaniem elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra, natomiast do oznaczania klorsulonu zastosowano elektrodę z węgla szklanego modyfikowaną powierzchniowo jednościennymi nanorurkami węglowymi. Procedura oznaczania leków opierała się na woltamperometrii fali prostokątnej. Eksperymenty objęły opracowanie sposobu przygotowania elektrod do pracy, dobór elektrolitu podstawowego oraz optymalizację parametrów pomiarowych. Dla każdego z leków wyznaczono parametry walidacyjne: zakres liniowy, granice wykrywalności oraz oznaczalności, precyzję oraz odzysk. Zbadano również wpływ potencjalnych intereferentów na rejestrowane sygnały analityczne. Opracowane procedury zweryfikowano oznaczając leki we wzbogaconych analitami matrycach próbek rzeczywistych, salinomycynę w ekstrakcie z gleby, monenzynę w paszy dla koni, a klorsulon w mleku krowim. Zbadanie kinetyki i mechanizmów procesów elektrodowych przeprowadzono z wykorzystaniem techniki woltamperometrii cyklicznej. W ramach badań zwrócono uwagę na odwracalność reakcji elektrodowych, określono charakter rejestrowanych sygnałów prądowych oraz zaproponowano mechanizmy reakcji elektrodowych badanych związków. Elektrody wykorzystywane podczas badań, srebrną z odnawialnym filmem amalgamatu srebra oraz elektrodę z węgla szklanego modyfikowaną nanorurkami węglowymi, porównano pod względem topograficznym za pomocą mikroskopii sił atomowych, oraz elektrochemicznie w oparciu o pomiary woltamperometrii cyklicznej i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej.

Ta część pracy została wzbogacona dodatkowymi eksperymentami obejmującymi badania korozyjne, których celem było zbadanie wpływu salinomycyny, stosowanej jako dodatek do pasz, na korodowanie stali, z której wykonane są fragmenty urządzeń do karmienia drobiu. W tym celu przeprowadzono pomiary potencjału korozyjnego w obwodzie otwartym, wykorzystano również metodę polaryzacji anodowej. Do oceny rozmiaru i charakteru zmian korozyjnych zastosowano skaningową mikroskopię elektronową.

Druga część rozprawy doktorskiej mgr K. Rudnickiego dotyczy elektrochemicznych badań farmaceutyków weterynaryjnych na granicy dwóch niemieszających się cieczy, które przeprowadzono w układach makro- i mikroskopowych. Do eksperymentów wybrano cztery antybiotyki z grupy fluorochinolonów: marbofloksacynę, cyprofloksacynę, enrofloksacynę i ofloksacynę, które badano techniką woltamperometrii przeniesienia jonu. Do badań w skali mikroskopowej zastosowano mikroplatformy skonstruowane z wykorzystaniem kapilar krzemionkowych o różnych średnicach, zbadano również wpływ powinowactwa kapilar, hydrofilowego lub hydrofobowego, na procesy zachodzące na granicy niemieszających się elektrolitów. Skonstruowane mikroplatformy zobrazowano techniką skaningowej mikroskopii elektronowej. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyznaczenie szeregu parametrów fizykochemicznych, m.in. stałych podziału (K_D) i energii swobodnych Gibbsa (ΔG^0), wykreślono również krzywe podziału jonowego. Dla badanych leków wyznaczono takie parametry analityczne jak granica wykrywalności oraz czułość.

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej na cyklu prac, opublikowanych (lub prawie opublikowanych) w recenzowanych czasopismach, rola recenzenta jest w zasadzie ograniczona. Manuskrypty zostały już zaopiniowane i przeanalizowane przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny, a ewentualne niedociągnięcia wskazane Autorom i przez nich skorygowane. Oryginalność rozwiązania problemu naukowego, w kontekście ukazania się prac w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, nie może budzić wątpliwości. Recenzentowi pozostaje stwierdzenie, jaki był udział Autora w badaniach, ponieważ wszystkie prace zgłoszone do rozprawy są wieloautorskie. Oświadczenia współautorów wyraźnie wskazują na dominujący wkład Doktoranta w realizację projektów, jego udział został oszacowany na poziomie 55 - 60%. We wszystkich publikacjach mgr K. Rudnicki jest pierwszym autorem. Należy podkreślić, iż średnia wartość współczynnika oddziaływania zgłoszonych publikacji wynosi 4,144, co jest wartością ponadprzeciętną, jeżeli chodzi o dorobek publikacyjny zgłaszany jako podstawa rozprawy doktorskiej.

Praca jest napisana przejrzysto, poszczególne rozdziały logicznie wprowadzają czytelnika w prezentowaną tematykę. Treść została zobrazowana bardzo starannymi rysunkami i tabelami. Podsumowanie trafnie uwypukla wszystkie najważniejsze etapy i wyniki badań. Z merytorycznego

punktu widzenia oceniam pracę bardzo wysoko. Doktorant starannie opracował nowe procedury analityczne do oznaczania leków weterynaryjnych z wykorzystaniem konwencjonalnych technik elektroanalitycznych, które zweryfikował analizując próbki rzeczywiste. Na podkreślenie zasługują innowacyjne elektrochemiczne badania farmaceutyków z wykorzystaniem woltamperometrii przeniesienia jonu. Doktorant zaprojektował i wykonał nowatorskie mikroplatformy bazujące na kapilarach krzemionkowych. Przygotowanie mikroplatform jest proste, tanie, szybkie i nie wymaga żadnych zaawansowanych przyrządów ani narzędzi, co jest niezmiernie ważne w kontekście potencjalnego wprowadzania procedury analitycznej do rutynowej praktyki laboratoryjnej. Możliwość prowadzenia analizy w skali mikro- niesie ze sobą szereg korzyści, poza oczywistymi, takimi jak mniejsze zużycie odczynników, wpływa na polepszenie parametrów analitycznych: obniżenie granicy wykrywalności oraz polepszenie czułości oznaczeń. Skonstruowane mikroplatformy stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań nad innowacyjnymi mikroukładami przeznaczonymi do oznaczania szerokiej grupy analitów.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i pytań, o charakterze dyskusyjnym. W najmniejszym stopniu nie wpływają one na bardzo pozytywny odbiór pracy. Chciałabym poprosić Autora o ustosunkowanie się podczas obrony pracy do poniższych kwestii.

1. Opis budowy i regeneracji powierzchni elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra (wraz z rysunkiem) został umieszczony we wstępie pracy. Czy nie lepszym miejscem byłby np. rozdział odnoszący się do aparatury badawczej? Rozumiem, że nie jest to elektroda rutynowo wykorzystywana w elektrochemii, ale w tym kontekście we wstępie pracy należało by również bardziej szczegółowo opisać zagadnienia związane z elektrochemią na granicy dwóch niemieszających się cieczy oraz woltamperometrię przeniesienia jonu, jako niekonwencjonalną technikę elektrochemiczną.
2. W tabeli 2 (str. 26) zamieszczono m.in. wartości parametrów kondycjonowania elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra. Czym można wytłumaczyć różne czasy kondycjonowania w przypadku oznaczania salinomycyny i monenzyny?
3. Na str. 27 w drugim akapicie znajduje się zdanie: „Następnie,..., obliczyłem także powtarzalność pomiarów oraz precyzję i odzysk.” Jak Autor definiuje powtarzalność i precyzję? Które wartości zostały umieszczone w Tabeli 3 jako RSD [%]?
4. Z Tabeli 3 (str. 27) wynika, że dla salinomycyny wyznaczono jeden zakres liniowości, natomiast dla monenzyny dwa. Co może być przyczyną tego zjawiska?
5. Podczas badań elektrochemicznych zjawisk zachodzących na granicy wody i 1,2-dichloroetanu dla antybiotyków fluorochinolonowych wykreślano zależności natężenia prądu od stężenia analitu (np. Rys. 4 w publikacji [61]). Jak odczytywano

wartości natężenia prądu w przypadku pierwszego cyklu pomiarowego (forward scan)? Dla cyklu wstecznego (reversed scan) nie jest to problematyczne, gdyż rejestrowano piki, więc jako sygnał analityczny traktowano zapewne natężenie prądu w maksimum pików.

6. Czy w oparciu o przeprowadzone badania można wyciągnąć wnioski odnośnie powtarzalności i odtwarzalności pomiarów prowadzonych techniką woltamperometrii przeniesienia jonu?

W pracy widać doskonałą znajomość tematyki badawczej oraz wyjątkowe zaangażowanie Doktoranta w prowadzone badania. Potwierdza to np. przeprowadzenie prac badawczych niezwiązanych ściśle z tematyką pracy, a odnoszących się do zjawiska korozji. Duże zróżnicowanie stosowanych technik pomiarowych pozwala wnioskować o szerokiej wiedzy Doktoranta z zakresu technik badawczych i świadczy o jego doskonałym przygotowaniu do dalszej pracy badawczej. Dorobek naukowy mgr Konrada Rudnickiego, jak na młodego naukowca, należy uznać za wyróżniający. Jest on współautorem 7 publikacji o sumarycznym $IF_{2017/18}$ wynoszącym 24,5. Mgr K. Rudnicki wielokrotnie uczestniczył w konferencjach krajowych i zagranicznych. W swoim dorobku ma 15 wystąpień ustnych oraz 13 posterów, ponadto wyniki badań przeprowadzonych z jego udziałem zostały zaprezentowane na konferencjach kilkanaście razy przez współautorów. Doktorant brał udział, jako wykonawca, w realizacji trzech projektów badawczych dla młodych naukowców Uniwersytetu Łódzkiego, a w zeszłym roku zdobył grant NCN w konkursie PRELIUDUIM, uzyskując najwyższą ocenę swojego projektu badawczego w panelu ST4.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona praca doktorska całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Konrada Rudnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z przedstawionych osiągnięć Doktoranta wynika, iż jest on bardzo obiecującym młodym badaczem. Wyniki badań, które przeprowadził w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały (lub zostaną w niedługim czasie) opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych. Zważywszy na szeroki zakres badań i ich wysoką wartość merytoryczną, oraz dorobek naukowy Doktoranta, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Konrada Rudnickiego.**