

dr hab. inż. Katarzyna Pawlak
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Wach

pt. „Chemical characterization of isoprene secondary organic aerosol in the atmosphere using LC-MS/MS approaches”

„Chemiczna charakteryzacja wtórnego aerozolu organicznego z izoprenu w atmosferze z wykorzystaniem metod LC-MS/MS”

wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem naukowym **prof. dr hab. inż. Rafała Szmigielskiego**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawę prawną wykonania niniejszej recenzji stanowią:

- 1.1. pismo z-cy Dyrektora ds. naukowych Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk dr hab. Jacka Gregorowicza, profesora instytutu z dnia 19 czerwca 2023 roku
- 1.2. uchwała Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN z dnia 25 lutego 2019 roku
- 1.3. rozprawa doktorska mgr Pauliny Wach
- 1.4. Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65. Poz. 595, art. 13.1 z późn. zm.).

Niniejsza recenzja dotyczy merytorycznej oceny rozprawy doktorskiej (kryteria formalne są poza oceną niniejszej recenzji). Powinna ona stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzić ogólnej wiedzy teoretycznej doktoranta w zakresie nauk ścisłych i przyrodniczych, a także umiejętności prowadzenia samodzielnie pracy naukowej. Powyższe kryteria będą brane pod uwagę podczas oceny rozprawy Pani mgr Pauliny Wach.

2. Podstawa faktyczna recenzji

Recenzja sporządzona została na podstawie oceny rozprawy doktorskiej w postaci przedłożonej przez wnioskodawczynię monografii. Anglojęzyczna praca liczy 140 stron, w tym spis treści i rysunków, streszczenie w języku polskim i angielskim, cel pracy, bibliografia (210 pozycji) oraz wykaz dorobku Autorki w postaci ośmiu publikacji (w tym cztery związane z dysertacją), rozdziału w monografii, dwóch patentów, dwóch prezentacji ustnych i jedenastu wystąpień w postaci plakatów.

3. Cel rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska winna zmierzać w kierunku udowodnienia postawionej tezy lub weryfikować trafność hipotezy badawczej. Pani mgr P. Wach nakreśliła hipotezę badawczą pośrednio poprzez zdefiniowanie celu badawczego, którym jest zbadanie składu wtórnego aerozolu organicznego i opis struktur związków w nim występujących za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz i oddziaływań hydrofilowych połączonych z wysokorozdzielczym spektrometrem mas. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa Doktorantka postuluje, że cząsteczki izoprenu emitowane do atmosfery przez rośliny, pomimo dużej lotności i ograniczonej rozpuszczalności w roztworach

wodnych, na skutek reakcji z rodnikami siarczanowymi oraz reakcji utleniania, ulegają przemianom do organosiarczanów mających istotny wpływ na procesy zachodzące w układach wielofazowych występujących w atmosferze.

Na podstawie wyników przedstawionych w dysertacji mogę stanowczo stwierdzić, że cel pracy został osiągnięty i pośrednio potwierdzona została także użyteczność chromatografii cieczowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas w badaniach składu wtórnych aerozoli uzyskanych w warunkach laboratoryjnych, ale także w przypadku próbek pyłu, wody opadowej, czy gradu.

Na podstawie opisanego powyżej celu i proponowanych metod do jego osiągnięcia można stwierdzić, że temat pracy jest zgodny z jej treścią.

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

4.1. Ocena wyboru tematu i zakresu pracy

Aerozole definiowane jako układy koloidalne substancji ciekłych lub stałych, stanowią szeroką grupę niejednorodnych składników atmosfery ziemskiej o niejednoznacznej funkcji. Aerozole na silnie zurbanizowanych terenach, w sprzyjających warunkach atmosferycznych, tworzą smog. Wiadomo, że największe zagrożenie dla człowieka stanowią ziarna aerozolu o średnicy mniejszej niż $2,5 \mu\text{m}$. Penetrują one układ oddechowy, a znajdujące się w nim toksyczne związki chemiczne przedostają się do krwi. Potwierdzone zostało powiązanie pomiędzy gorszą jakością powietrza a zwiększoną liczbą przypadków niewydolności pracy serca i raka płuc. Podczas występowania smogu, zwiększa się liczba przypadków śmiertelnych na skutek ataku serca lub niewydolności płuc. Nic dziwnego, że aerozole stały się przedmiotem ogromnego zainteresowania środowiska naukowego.

Wiadomo już także, że aerozole rozproszone w atmosferze mogą w różnorodny sposób wpływać na klimat. Popioły zawierające cząsteczki sadzy pochłaniają promieniowanie słoneczne, natomiast ziarna aerozolu (np. soli morskiej) odbijają/rozpraszają je chłodząc atmosferę. Ponadto aerozole są również zarodkami kondensacji i wpływają na proces tworzenia się chmur. Im ich więcej tym mniej promieniowania słonecznego dociera do powierzchni ziemi.

Procesy te są bardzo skomplikowane oraz trudne do zbadania i opisanie. Jednym z większych problemów jest chociażby oszacowanie ilości powstającego aerozolu, kolejnym jest określenie wielkości ziaren ze względu na ich zróżnicowany kształt. Badanie składu aerozolu jest już w takim przypadku wyczynem niezwykle karkołomnym i ambitnym. Jest to bowiem układ niejednorodny nie tylko pod względem fizycznym (wielofazowy), ale także chemicznym (związki organiczne i nieorganiczne). Szczególne zainteresowanie Doktorantki wzbudził, dominujący w atmosferze, wtórny aerozol organiczny (SOA) składający się z mało lotnych związków organicznych. Powstają one na skutek utleniania biogennych lotnych związków organicznych (BVOC) emitowanych przez rośliny (w tym wybranego przez Doktorantkę izoprenu), czemu towarzyszy ich przejście z fazy gazowej do ciekłej. W dysertacji, podczas przebiegu reakcji utleniania izoprenu, badany jest wpływ promieniowania słonecznego oraz ważnych z punktu widzenia chemii atmosfery, czynników utleniających takich jak rodniki hydroksylowe, ozon czy rodniki $\text{SO}_4\cdot$.

Powstałe w warunkach laboratoryjnych produkty reakcji utleniania izoprenu w obecności rodników siarczanowych poddawano rozdzielaniu za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz i oddziaływań hydrofilowych. Biorąc pod uwagę małą rozpuszczalność izoprenu i jego produktów utleniania w wodzie, zastosowanie obu metod rozdzielania w połączeniu z roztworem fazy ruchomej, zawierającej oprócz wody, polarny rozpuszczalnik organiczny (metanol w przypadku RPLC i acetonitryl w przypadku HILIC) jest wyborem prawidłowym. Obie fazy stacjonarne (hydrofobowa C18 oraz hydrofilowa z grupą amidową) zawierają odpowiednie ugrupowania zapewniające oddziaływania z badanymi związkami (indukowany dipol – dipol) oraz (dipol – jon), co pozwoliło na ich skuteczne rozdzielanie. Obecność polarnego rozpuszczalnika organicznego zapewniła odpowiednią

rozpuszczalność związków w roztworze fazy ruchomej. Istotne było także zastosowanie ultraszybkiej chromatografii ciekowej (UPLC) ze względu na dwa podstawowe czynniki: trwałość badanych związków oraz ich ultraśladowa ilość. UPLC jest techniką zapewniającą zwiększoną sprawność chromatograficzną, a co za tym idzie zwiększoną wysokość pików/sygnaliów w detektorze. Miało to ogromne znaczenie w przypadku określania struktury związków, ponieważ wysoki pik chromatograficzny pozwalał uzyskać także odpowiednio wysoki pik w spektrometrze mas pochodzący od jonu pseudocząsteczkowego, a tym samym bogate i czyste (wysoki stosunek sygnału do szumu) widmo fragmentacyjne o dokładnie zdefiniowanych wartościach m/z. W efekcie uzyskane wartości m/z pozwoliły określić wzór sumaryczny badanych cząsteczek oraz zaproponować ich strukturę. Niebagatelne było także zastosowanie wysokorozdzielczego spektrometru mas umożliwiającego, nie tylko wyznaczenie masy monoizotopowej związków z błędem $\leq 0,3$ mDa, ale także odpowiednio szybkie skanowanie jonów transportowanych do spektrometru mas w postaci wąskiego pasma w czasie krótszym niż 100 ms. Prawidłowo także zostały dobrane warunki detekcji organosiarczanów, które obserwowano w trybie jonów ujemnych w warunkach wspomagających powstawanie anionów (roztwór octanu amonu o pH równym 9), co niewątpliwie poprawiło czułość metody.

Ciekawym rozwiązaniem było badanie procesu utleniania izoprenu z użyciem cząsteczek tlenu wzbogacanego izotopowo. Porównanie widm uzyskanych dla $^{16}\text{O}_2$ i $^{18}\text{O}_2$ pozwoliło opisać nie tylko przebieg procesu utleniania izoprenu, ale także proces degradacji powstałych organosiarczanów.

W efekcie końcowym, Pani Paulina Wach zaproponowała struktury dla wybranej grupy związków powstałych z izoprenu, opracowała warunki ich rozdzielania i detekcji za pomocą spektrometru mas. Użyteczność zaproponowanej metody została zweryfikowana poprzez wykrycie części z otrzymanych w warunkach laboratoryjnych związków, w próbkach pobranej wody deszczowej, pyłu i gradu.

Stąd też, wybrany przez Doktorantkę izopren, przeprowadzenie procesu jego utleniania oraz rozdzielanie i detekcję produktów reakcji z użyciem LC-MS uważam za trafne i dobrze wpisujące się w nurt badań z zakresu badania chemii aerozoli.

4.2. Struktura rozprawy doktorskiej

Struktura recenzowanej rozprawy jest co do zasady prawidłowa. Składa się ona z części literaturowej zawierającej opis składu i znaczenia wtórnych organicznych aerozoli, uzasadnienie wyboru izoprenu jako substratu do syntezy organosiarczanów, opis metod przeprowadzania reakcji w warunkach laboratoryjnych naśladujących warunki środowiskowe oraz stosowanych technik instrumentalnych do badania powstałych produktów (chromatografii ciekowej i spektrometrii mas). Szczególną uwagę poświęcono technikom jonizacji ze względu na właściwości badanych związków. Po części literaturowej przedstawiony jest cel pracy, po którym omówione są wyniki uzyskane podczas charakteryzacji organosiarczanów otrzymanych z izoprenu, produktów ich fotolizy i badania próbek środowiskowych. Na koniec zamieszczono stosowne podsumowanie.

4.3. Ocena merytoryczna pracy

Praca napisana jest w sposób świadomy i uporządkowany. Przegląd literaturowy i część doświadczalna stanowią spójną całość przedstawiając:

- skład aerozoli atmosferycznych oraz przemiany chemiczne, którym ulegają lotne związki organiczne w atmosferze ze szczególnym uwzględnieniem powstawania organosiarczanów
- techniki jonizacji związków stosowanych w spektrometrii mas do badania lotnych i nielotnych składników aerozoli oraz metody ich rejestracji
- metody kolekcjonowania i przygotowania próbek do analizy i syntezy organosiarczanów z izoprenu w komorze smogowej

- interpretację widm organosiarczanów uzyskanych za pomocą techniki LC-MS uwzględniając rozróżnianie izomerów oraz propozycje ścieżek ich fragmentacji wsparte metodami obliczeniowymi gęstości elektronowej (DFT), które są niezwykle cenne także z punktu widzenia rozwoju spektrometrii mas i zastosowania do identyfikacji związków małowcząsteczkowych

- szczegółową interpretację widm masowych produktów utleniania izoprenu z użyciem cząsteczek tlenu wzbogacanego izotopowo, co umożliwiło wskazanie usytuowania polarnych grup w otrzymanych związkach

- wyniki uzyskane dla próbek środowiskowych (pyłu, deszczu i gradu) weryfikujące użyteczność laboratoryjnych metod syntezy organosiarczanów w warunkach naśladujących środowiskowe i potwierdzających hipotezę badawczą zakładającą, że izopren jest kluczowym substratem wpływającym na skład wtórnych aerozoli atmosferycznych.

Otrzymane wyniki dyskutowane są ostrożnie i krytycznie. Autorka rozważa różne możliwości lokalizacji przestrzennej polarnych grup w wybranych organosiarczanach i weryfikuje je poprzez porównanie wyników uzyskanych za pomocą różnych metod z użyciem MS jak i obliczeniowych.

Jakość prowadzonych prac badawczych potwierdzają także publikacje z udziałem Wnioskodawczyni w recenzowanych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports (JCR)* o sumarycznym współczynniku $IF > 35$ potwierdzające wysoki poziom warsztatu naukowego:

1. Spolnik, G., Wach, P., Rudziński, K.J., Szmigielski, R., Danikiewicz, W., Tracing the biogenic secondary organic aerosol markers in rain, snow and hail, *Chemosphere*, 2020, 251, 126439
2. Wach, P., Spólnik, G., Surratt, J.D., Claeys, M., Szmigielski, R. Structural Characterization of Lactone-Containing MW 212 Organosulfates Originating from Isoprene Oxidation in Ambient Fine Aerosol, *Environmental Science and Technology*, 2020, 54(3), pp. 1415–1424
3. Wach, P., Spólnik, G., Rudziński, K.J., Danikiewicz, W., Szmigielski, R. Radical oxidation of methyl vinyl ketone and methacrolein in aqueous droplets: Characterization of organosulfates and atmospheric implications, *Chemosphere*, 2019, 214, pp. 1–9
4. Spolnik, G., Wach, P., Rudziński, K.J., Danikiewicz, W., Szmigielski, R., Improved UHPLC-MS/MS Methods for Analysis of Isoprene-Derived Organosulfates, *Analytical Chemistry*, 2018, 90(5), pp. 3416–3423

Przygotowaną przez Doktorankę rozprawę doktorską kończy rozdział podsumowanie, który w sposób syntetyczny przedstawia dokonania dotyczące badanych organosiarczanów powstałych z izoprenu za pomocą metod z użyciem MS (określono kolejność chromatograficzną powstałych izomerów, poddano interpretacji otrzymane widma i zaproponowano ścieżki fragmentacji dla zidentyfikowanych związków). Warto było mocniej podkreślić znaczenie metod chromatograficznych w oparciu o ultraszybką chromatografię zmniejszając ryzyko wpływu degradacji związków podczas analizy.

W dyskusji i podsumowaniu odniesiono się do bogatego warsztatu związanego ze stosowaniem różnych metod z użyciem spektrofotometrii czy spektrometrii mas związków znakowanych izotopowo do badania przemian izoprenu w warunkach podobnych do środowiskowych. Uzyskane wyniki w załączonych pracach pokazują, że nowoczesne spektrometry mas w rękach specjalisty potrafią być potężnym narzędziem dostarczającym wiele istotnych danych w badaniach podstawowych.

Z obowiązku recenzenta chciałabym jednak zwrócić uwagę na pewne błędy natury redakcyjnej, ale i nieścisłości dostrzeżone w przedstawionym maszynopisie:

- Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem podanym na str. 10, że praca grupy Magdy Clays (2004 rok) wskazała izopren i jego produkty utleniania jako kluczowe w przypadku powstawania wtórnych aerozoli organicznych i rozpoczęła globalną dyskusję. Dyskusja trwa co najmniej już od roku 1995 (A. Guenther i inni, <https://doi.org/10.1029/94JD02950>, ponad 3000 cytowań) pracą, w której wykazano, że udział izoprenu w grupie lotnych związków organicznych

emitowanych przez rośliny jako substratu kluczowego dla wtórnych aerozoli organicznych może osiągać do 44%.

- Rysunki 1.2 i 1.3, Schemat 1.2, Tabela 1-III są inspirowane opisami i rysunkami innych naukowców, warto w tytule rysunku wyróżnić kluczowe odniesienia literaturowe na podstawie których rysunki powstały.
- Sposób numeracji rysunków, schematów, wykresów i tabel z podziałem na rozdziały nie jest wygodny dla czytelnika. Być może jest to subiektywna ocena recenzenta, ale przy numeracji ciągłej obiekty prościej znaleźć, a sposób numeracji jest jednorodny.
- Podział obiektów rysunkowych na kategorie jest zbyt szczegółowy. Autorka sama już miała kłopot jak należy sklasyfikować rysunek 96 (wykres) pomimo podobieństwa do rysunku na stronie 106 (rysunek).
- W celu lepszej przejrzystości warto w pracy zamieścić schemat ogólny badania(ń)
- Na stronach 6 i 7 znajduje się 5 akapitów opisujących stan wiedzy dotyczących naturalnych źródeł aerozoli, które nie zawierają odniesień do źródeł literaturowych.
- Tabela 1-VI, str 41 zawiera akronimy niewyjaśnione „PTR” jak i nieodpowiadające technice jonizacji, czy detekcji jonów, np.: wskazano w technikach: „CIT” – *California Institute of Technology*.
- Stopień utlenienia zapisujemy łącznie nie tylko w przypadku nazw/symboli niemetali, ale i metali (strony 64 i 65).
- Rysunki 5.1 i 5.14 na stronach 96-97 nie mają opisanych osi. Co prawda w przypadku rysunku 5.1 rozszerzono tytuł rysunku, ale nie zmienia to faktu, że osie powinny zawierać stosowny opis. Ponadto w rysunku 5.1 legenda nie zawiera opisu względem wszystkich krzywych pokazanych na wykresie, które trudno zweryfikować. Być może należało wykonać dwa rysunki i pokazać zmiany absorbancji w czasie.
- Rysunek 5.14 powinien zawierać także chromatogramy odniesienia ekstrahowane dla m/z 211 i 221 uzyskane odpowiednio dla związków wzbogacanych izotopowo i pochodzących z eksperymentu podstawowego. W ten sposób możliwe byłoby wskazanie części sygnałów interferujących w celu wykluczenia ich z dyskusji.
- Na chromatogramach warto umieszczać znacznik czasu martwego, co pokazuje jednoznacznie na retencji związku na skutek oddziaływania z fazą stacjonarną wymywanego po tym czasie.

Błędy te w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą ogólnie oceniam bardzo wysoko i uważam, że doskonale odzwierciedla dojrzałość naukową Wnioskodawczynie. W mojej ocenie większość błędów wynika z wyboru języka angielskiego do napisania pracy. Z jednej strony można uniknąć anglicyzmów, z drugiej zwiększa poziom trudności, co utrudnia wykrywanie nieścisłości w przypadku większej objętościowo pracy. Należy zaznaczyć, że Wnioskodawczynie bardzo dokładnie opisała sposób interpretacji widm i zaproponowała ścieżki fragmentacyjne związków, które są zazwyczaj pomijane zarówno w dysertacjach, monografiach i artykułach w recenzowanych czasopismach naukowych (tożsamość związków określana jest bowiem najczęściej na podstawie porównania widm doświadczalnych z wyznaczonymi *in silico* lub dla substancji wzorcowych), co czyni pracę w moich oczach szczególnie wartościową.

Odnosząc się do przeprowadzonych przez Panią mgr Paulinę Wach badań, ciekawych wyników własnych i doświadczenia w badaniach określania struktury izomerów, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

1. Opis warunków rozdzielania chromatograficznego na stronach 67-69 jest dość niejasny i trudny do śledzenia. Warto przedstawić warunki rozdzielania w postaci ujednoczonej tabeli lub schematu ze wskazaniem zmian w metodzie. Proszę o uwzględnienie tej uwagi w prezentacji.
2. Czy interpretacji danych LC-MS dokonywano także w oparciu o parametry fizykochemiczne powiązane z rozpuszczalnością związków (np. logP)?

3. Proszę o opis powtarzalności czasów retencji dla badanych próbek/mieszanin (np. tabela 5-I-III na stronie 74), ponieważ w kolejnych rozdziałach dyskusja prowadząca do określenia tożsamości związków prowadzona jest w oparciu o czasy retencji różniące się od siebie o wartość mniejszą niż 0,1 min. Nie wiadomo jednak jak istotne są o różnice.
4. W jaki sposób kontrolowano pH roztworów fazy ruchomej zawierających octan amonu podczas ich przygotowywania i realizacji analiz z użyciem chromatografii cieczowej? Czy uwzględniano wpływ rozpuszczalnika organicznego na pomiar pH?
5. Biorąc pod uwagę, że rozprawa dotyczy identyfikacji związków w ilościach śladowych, a nawet ultra-śladowych nasuwa się pytanie w jaki sposób prowadzona była kontrola czystości aparatu i kolumny chromatograficznej w celu zapobiegania przeniesienia związków z jednej próbki do drugiej?
6. Podczas badania procesu fotolizy oznaczono natężenie światła w jednostce mW/cm². Jak wyznaczone wartości mają się do naturalnego natężenia światła wpływającego na skład SOA?
7. Jaki byłby spektrometryczny zestaw marzeń do badania SOA? Proszę odnieść się także do Tabeli 1-V opisującej zastosowane dotychczas techniki jonizacji.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

5.1. Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Pauliny Wach wpisuje się w nurt badań podstawowych dotyczących przemian lotnych związków organicznych w atmosferze i ich wpływu na skład wtórnych organicznych aerozoli występujących w atmosferze. Podjęty problem badawczy ma duże znaczenie w wymiarze poznawczym wyjaśniając mechanizmy związane z opisem procesu powstawania organosiarczanów i ich trwałości w aerozolach atmosferycznych. Jest to obszar nowy, który wymaga nowych narzędzi, dalszych wnikliwych badań i poszukiwania związków przyczynowo-skutkowych między emitowanymi do atmosfery lotnymi związkami organicznymi i nieorganicznymi a stanem zdrowia człowieka.

Z analizy przedłożonej dysertacji wynika, że mgr Paulina Wach uzyskała efekty kształcenia przewidziane wg Polskich Ram Kwalifikacji dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia, tj. posiada umiejętność opracowania koncepcji badań z użyciem spektrometru mas, zdolność do planowania i wykonywania eksperymentów badawczych z udziałem ludzi, a także opracowywania wyników z użyciem złożonych i specjalistycznych metod obliczeniowych.

5.2. Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Pauliny Wach pt. „*Chemical characterization of isoprene secondary organic aerosol in the atmosphere using LC-MS/MS approaches*” czyli „*Chemiczna charakteryzacja wtórnego aerozolu organicznego z izoprenu w atmosferze z wykorzystaniem metod LC-MS/MS*” zrealizowana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Rafała Szmigielskiego w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami. Doktorantka wykazała się znakomitą znajomością tematu, zrealizowała postawione sobie cele badawcze oraz zinterpretowała uzyskane wyniki wnosząc nowe dane w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Państwowej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Wach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Muszę także zaznaczyć, że praca, ze względu na poziom realizowanych badań, jakość uzyskanych wyników pomimo ultra-śladowych ilości badanych związków oraz ich interpretację, zasługuje na wyróżnienie.

Katarzyna Pawlak