

Wrocław, 2023-09-08

prof. dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

piotr.stefanowicz@uwr.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Klary Nestorowicz

pt. „Analysis of Secondary Organic Aerosol from Isoprene and Butadiene with Hyphenated Mass Spectrometry”

Pani mgr Klara Nestorowicz wykonała pracę doktorską zatytułowaną: **„Analysis of Secondary Organic Aerosol from Isoprene and Butadiene with Hyphenated Mass Spectrometry”** pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Rafała Szmigielskiego w Instytucie Chemii Fizycznej PAN.

Praca doktorska będąca przedmiotem tej recenzji dotyczy aktualnego problemu identyfikacji substancji organicznych będących składnikami aerozoli, które powstają w wyniku zachodzących w atmosferze reakcji fotochemicznych butadienu i izoprenu. Aerozole są obecnie intensywnie badane ze względu na ich udział w kształtowaniu pogody i klimatu, a także niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka. Cząstki aerozolu, zwłaszcza frakcja $PM_{2,5}$ skutecznie wnikają do układu oddechowego a następnie mogą przekraczać ścianki naczyń krwionośnych, co prowadzi do różnorodnych, niekorzystnych efektów fizjologicznych, takich jak powstawanie chorób układu sercowo-naczyniowego, układu oddechowego, chorób alergicznych i innych. Z tego względu badanie cząstek $PM_{2,5}$ może mieć duże znaczenie w chemii środowiska. Okazuje się, że znaczącą część cząstek $PM_{2,5}$ stanowią aerozole organiczne tworzące się w wyniku fotochemicznych przekształceń węglowodorów. Jednak pomimo zainteresowania składem chemicznym aerozoli, zidentyfikowana została tylko nieznacząca część składników organicznych wchodzących w ich skład. Przyczynami

tego stanu wiedzy jest duża z złożoność badanych układów oraz ograniczona dostępność badanych substancji. Ogranicza to możliwość stosowania takich technik jak NMR i rentgenografia i wymusza zastosowanie technik sprzężonych, głównie LC-MS. Chociaż techniki MS i MS/MS dostarczają wielu informacji dotyczących struktury badanego związku to jednak uzyskany wynik ma charakter bardziej lub mniej prawdopodobnej hipotezy i wymaga potwierdzenia innymi technikami analitycznymi. Jest to sytuacja podobna do występującej w badaniach metabolomicznych, kiedy wykryte substancje zostają na początkowym etapie badań scharakteryzowane jedynie na podstawie ich masy cząsteczkowej i parametrów chromatograficznych. Identyfikacje z wykorzystaniem HRMS i technik fragmentacyjnych oraz baz danych pozwala zaproponować określone struktury, jednak w celu potwierdzenia identyfikacji konieczne są dodatkowe badania z wykorzystaniem odpowiednich wzorców. Gdy te nie są dostępne handlowo jedyną możliwością jest przeprowadzenie ich chemicznej syntezy. Ta sytuacja wystąpiła w pracy doktorskiej pani Klary Nestorowicz. Chociaż znaczna część wykrytych przez nią substancji była znana i dostępna handlowo (np. kwas winowy, kwas jabłkowy czy też kwas treonowy). Jednak w prowadzonych badaniach udało się jej odkryć nowe składniki występujące w aerozolach organicznych powstających w wyniku fotoutleniania butadienu i izoprenu. Niektóre z tych substancji (kwas 2-metylowinowy, kwas 2-metylotreonowy i kwas 3-metylotreonowy) nie zostały wcześniej opisane w literaturze chemicznej i wymagały opracowania oryginalnych syntez.

Posiadanie próbek o jednoznacznie potwierdzonej strukturze umożliwiło zweryfikowanie wstępnej identyfikacji nowoodkrytych substancji przez porównanie czasów retencji i widm fragmentacyjnych. Na wstępnym etapie badań autorka skoncentrowała się na badaniach modelowych prowadzonych w komorze aerozolowej. Ta technika badawcza umożliwiła prowadzenie eksperymentów w kontrolowanych warunkach, co pozwoliło na zbadanie efektu powodowanego przez różną zawartość pary wodnej w reagujących układach a także wpływu dodanego do środowiska reakcji kwasu (H_2SO_4). To narzędzie badawcze pozwoliło też na precyzyjną kontrolę stężenia gazów (izopren, butadien, NO), które znajdowały się w reaktorze. Reagująca mieszanina była poddawana naświetlaniu promieniami UV o kontrolowanym natężeniu. W warunkach eksperymentu było możliwe ciągle monitorowanie stężeń kluczowych reagentów a

także powstającego w reaktorze ozonu. Eksperymenty te pozwoliły na wykrycie licznej grupy produktów powstających zarówno z butadienu jak i z izoprenu. Są to w większości kwasy organiczne, zawierające liczne grupy hydroksylowe, a także ich pochodne (estry kwasu siarkowego, laktony estry kwasu azotowego). Eksperymenty modelowe umożliwiają ustalenie jakie produkty mogą powstawać z butadienu, stanowiącego zanieczyszczenie antropogenne a jakie z izoprenu, który jest najprostszym terpenoidem (hemiiterpenem) powstającym w naturalnych procesach zachodzących w przyrodzie. Związki wykryte w modelowych eksperymentach zostały następnie potwierdzone w próbkach aerozoli zebranych w stacjach badawczych w Godowie, Diablej Górze, Zielonce i miejskim parku Kaskada znajdującym się na terenie Warszawy. Analiza naturalnych próbek aerozoli wykazała, że większość substancji wykrytych w warunkach modelowych została znaleziona w próbkach pochodzenia naturalnego. Na podstawie znajomości głównych produktów powstających z butadienu i izoprenu, znalezione zostały markery, które umożliwiają określenie, czy w danej próbce aerozoli przeważały produkty pochodzenia antropogenne, czy też powstające w wyniku naturalnych procesów. Wyniki te były korelowane z trajektoriami mas powietrza uzyskanymi za pomocą oprogramowania analizującego dane meteorologiczne.

Z punktu widzenia chemii najpoważniejsze wyzwania w realizowanych badaniach stanowiły:

1. Przeprowadzenie wstępnej identyfikacji związków powstających w komorze aerozolowej. Dokładny pomiar mas cząsteczkowych umożliwił wyznaczenie wzoru sumarycznego. W większości przypadków badany układ zachowywał liczbę atomów węgla (z izoprenu powstawały pochodne C₅ z butadienu C₄). W niektórych przypadkach następowała oksydacyjna degradacja, prowadząca do utraty atomów węgla. Proces ten zachodził w większym stopniu dla butadienu. Dodatkowych informacji dostarczała fragmentacja. Zaproponowanie struktury dodatkowo ułatwiały dane literaturowe dotyczące mechanizmów fotooksydacji (Surrat 2010, Lin 2013, Claes and Meenhaut 2021, Riva 2017, D'Ambro 2017). Połączenie tych informacji umożliwiło zaproponowanie racjonalnych struktur dla wykrytych substancji. Po zidentyfikowaniu prawdopodobnego produktu, przeprowadzono porównanie jego czasu retencji

i widma MS/MS ze standardem. Zaprezentowane wyniki jednoznacznie potwierdzają proponowane struktury

2. Zaproponowanie ścieżek fragmentacji zidentyfikowanych substancji.

Do prezentowanych widm MS/MS autorka dołącza hipotetyczne schematy fragmentacji. Identyfikacja neutralnych cząsteczek, powstających w wyniku rozpadu jonów nie budzi wątpliwości, ponieważ przy tak niewielkich masach cząsteczkowych można im przypisać jednoznaczne wzory sumaryczne. Ponieważ powstające fragmenty są wystarczająco złożone, aby mogły występować w formie kilku izomerów, przedstawione schematy fragmentacji nie są jedynymi możliwymi. Są one w większości przypadków rozsądne i prawdopodobne, jednak (zgodnie zresztą z opisem odpowiednich schematów) są propozycjami dróg fragmentacji. Jakie dodatkowe metody i techniki badawcze byłyby użyteczne do weryfikacji proponowanych dróg fragmentacji?

3. Przeprowadzenie oznaczeń ilościowych wybranych produktów utlenienia butadienu i izoprenu.

Ponieważ w wielu przypadkach dostępne były wzorce (konieczne na etapie potwierdzenia struktury) możliwe było przeprowadzenia analizy ilościowej. Autorka prowadziła kalibrację systemu LC-MS uzyskując liniową odpowiedź detektora masowego w całym zakresie kalibracji. Współczynniki korelacji we wszystkich przypadkach przekraczały 0,99. Jednak, pewne wątpliwości budzi wpływ bardzo złożonej matrycy na wynik analizy rzeczywistych próbek środowiskowych. Czy było rozważane zastosowanie metody rozcieńczeń izotopowych? W przypadku kwasów karboksylowych otrzymanie wzorców znakowanych izotopem ^{18}O jest stosunkowo proste i niezbyt kosztowne.

Podczas lektury pracy nasuwa się pytanie dotyczące znaczenia biologicznego uzyskanych wyników. Powszechnie znany jest negatywny wpływ cząstek $\text{PM}_{2,5}$ na zdrowie człowieka. Wiele z cząsteczek wykrytych przez autorkę wydaje się mieć niewielką aktywność biologiczną jednak np. estry kwasu siarkowego, mogą działać jako odczynniki alkilujące i potencjalnie oddziaływać z białkami i kwasami nukleinowymi. Czy istnieją jakiegokolwiek dane na temat toksyczności/mutagenności substancji zidentyfikowanych w trakcie badań albo ich działania alergennego?

Praca liczy 178 stron i napisana jest jasno i zwięźle. Terminologia dotycząca spektrometrii mas nie budzi moich zastrzeżeń. Przegląd literaturowy (42 strony) jest dość zwięzły, jednak wyczerpująco przedstawia stan wiedzy dotyczącej znaczenia aerozoli atmosferycznych w chemii atmosfery, ich składu oraz mechanizmów powstawania. W tej części znalazł się też opis metod stosowanych do badania składu aerozoli atmosferycznych. W części literaturowej nie występują zbędne elementy. Wszystkie informacje zawarte tej części są celowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia rozprawy. Część eksperymentalna napisana jest szczegółowo i zawiera wszystkie dane niezbędne do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Bibliografia (398 pozycji) jest aktualna i oddaje aktualny stan wiedzy. Uwzględnione zostały w niej najnowsze publikacje zaś duża część prac uwzględnionych w bibliografii powstała po roku 2000. Spis literatury został starannie zredagowany z zachowaniem jednolitego formatu odnośników. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są właściwe a całość napisana jest poprawnym językiem. Praca jest starannie zredagowana i dobrze przygotowana pod względem graficznym. Dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje łącznie 7 prac opublikowanych w dobrych czasopismach. W jednej z tych prac pani Klara Nastorowicz jest pierwszą autorką. Dodatkowo doktorantka jest współautorką czterech ustnych wystąpień na konferencjach naukowych i trzech plakatów.

Podsumowując, stwierdzam, że badania przeprowadzone przez Doktorantkę odpowiadają na pytania postawione w celu pracy zaś eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Mają też niewątpliwy element nowości naukowej i poszerzają dostępną wiedzę dotyczącą składu i powstawania aerozoli atmosferycznych. Cytowana literatura jest aktualna. Wykonana przez panią mgr Klarę Nestorowicz i przedłożona mi do recenzji praca pt. **„Analysis of Secondary Organic Aerosol from Isoprene and Butadiene with Hyphenated Mass Spectrometry”** w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie autorki do publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie ze względu na znaczny dorobek naukowy doktorantki

obejmujący siedem oryginalnych publikacji naukowych, wysoki poziom przeprowadzonych badań i ich potencjalne znaczenie praktyczne zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Mgr Klary Nestorowicz .

prof. dr hab. Piotr Stefanowicz

Piotr Stefanowicz