UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Chemii

Prof. dr hab. Stefan Lis
Zakład Ziem Rzadkich
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
tel. (+48-61) 829 1345

Poznań, 31.10.2015

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Ernesta Pujszo pt.: „Analiza niskorozdzielczych widm mas związków metaloorganicznych metodami chemometrycznymi", wykonanej na Wydziale Technologii Chemicznej, Politechniki Poznańskiej pod kierownictwem promotora dr hab. Jacka A. Szymury, prof. nadzw. UTP

Tematyka pracy doktorskiej mgr. inż. Ernesta Pujszo dotyczy spektrometrii mas, MS, jako metody analitycznej, w aspekcie działań zmierzających do zwiększenia jej informatywności związanej z identyfikacją związków chemicznych oraz wyjaśnieniem ich struktury. Metoda MS, ze względu na bardzo wysoką czułość przyrządu (pg), jest powszechnie wykorzystywana do wykrywania obecności ultraśladowych ilości związków chemicznych. Do licznych zastosowań MS należą badania identyfikacji związków chemicznych, ustalenia ich struktury, składu pierwiastkowego lub izotopowego. Ponadto, należy wskazać takie obszary zastosowań jak: proteomika, kontrola jakości żywności, badania w zakresie toksykologii i ochrony środowiska oraz badania antydopingowe.

Zgromadzone widma mas dla wybranych klas związków organicznych umożliwiły poznanie ogólnych praw fragmentacji jonów i sformułowanie (McLafferty, 1963) reguł rozpadu, co znacząco przyczyniło się do wyjaśniania struktury wielu związków chemicznych, głównie organicznych. Rozwój komputerów i szybkie powiększanie ich pamięci i zdolności obliczeniowych oraz związane z tym możliwości zapisu i gromadzenia ogromnej ilości danych, zastąpiły ręczne procedury analizy widm i spowodowały wyraźny wzrost wykorzystania cyfrowych bibliotek, w których zgromadzono ogromną ilość (kilkaset tysięcy) referencyjnych widm mas. Większość z tych kolekcji zawiera widma niskiej rozdzielczości (LR - *low resolution*) wykonane techniką jonizacji strumieniem elektronów (EI - *electron ionization*). Służą one jako wzorce, z którymi porównuje się widma mas substancji nieznanych celem ich identyfikacji. Ponadto, co należy podkreślić, stanowią one cenne zbiory danych dla wielu metod chemometrycznych, których wykorzystanie umożliwia ustalenie budowy związku chemicznego

w oparciu o rozpoznane w nim fragmenty struktury, tj. podstruktury, które nie zawsze oznaczają grupy funkcyjne. Metody te są szczególnie pomocne wówczas, gdy widmo badanego związku nie występuje w dostępnych bibliotekach danych.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr. inż. Ernesta Pujszo jest analiza niskorozdzielczych widm mas, wykonanych techniką jonizacji strumieniem elektronów (EI), za pomocą połączonych metod chemometrycznych i obejmuje organiczne pochodne trzech wieloizotopowych metali Sn, Fe oraz Ni. Autora rozprawy dokonując wyboru do analizy chemometrycznej widm mas związków organicznych tych trzech metali kierował w głównej mierze zróżnicowaniem ich profili izotopowych. Mianowicie cyna wykazuje najbogatszy profil z 10 trwałymi izotopami, żelazo ma ubogi profil, tzn. (4 trwałe izotopy) przypominający węgiel, podczas gdy nikiel – średnio liczny profil z 5 trwałymi izotopami. Autor wskazuje też inne argumenty na dokonany wybór, tj. wysoką aktywność biologiczną i duże znaczenie związków tych metali w gospodarce człowieka oraz możliwość ich użycia w analityce środowiskowej realizowanej z użyciem spektrometrii mas.

Niskorozdzielcze widma MS związków organicznych charakteryzują się stosunkowo prostym charakterem ze względu na obecność pierwiastków takich jak: C, H, O, N, S, które mają dwa naturalne izotopy o znaczących udziałach procentowych, przy czym jeden z nich stanowi formę dominującą. Natomiast w przypadku widm pochodnych metaloorganicznych metody ich analizy stają się znacznie bardziej skomplikowane. Ich złożony obraz jest wynikiem występowania licznych sygnałów od wieloizotopowych metali, a ponadto komplikują go interferencje pochodzące od produktów różnych reakcji następczych, w głównej mierze hydrogenacji i dehydrogenacji, zachodzących w komorze jonizacyjnej spektrometru. Obserwowane widma mają zatem złożone, trudne do analizy pasma, będące wynikiem nakładania się sygnałów pasm prostych, pochodzących od dwóch lub więcej jonów. Właśnie trudności dotyczące wyjaśniania skomplikowanych zależności pomiędzy strukturą związku a jego widmem, problemy podobieństwa widm oraz brak ogólnych reguł opisujących procesy fragmentacji związków metaloorganicznych, a także ciągle stosunkowo skromna ich reprezentacja w bazach danych widm mas stanowią główne przeszkody na drodze do opracowania efektywnych metod analizy tych widm. Z tego względu zagadnienia obejmujące poszukiwanie korelacji w relacji widmo – struktura oraz opracowanie schematów fragmentacji związków metaloorganicznych, w odniesieniu do licznych serii widm, jest ważnym zadaniem badawczym.

Mgr. inż. Ernest Pujszo podjął w tym zakresie wyzwanie badawcze w ramach swojej dysertacji doktorskiej, w nadziei uzyskania wielu cennych informacji ułatwiających ustalanie struktur nieznanych związków chemicznych. Zasadniczym celem studiów było zweryfikowanie odpowiedzi na pytanie: czy użycie odpowiedniej kombinacji metod chemometrycznych (już istniejących) do analizy serii widm mas organicznych pochodnych metali pozwala na rozróżnienie wśród nich grup o tych samych podstrukturach oraz dokonanie ich klasyfikacji?

Recenzowana praca doktorska jest napisana według typowego schematu i zawiera spis treści, cel i zakres pracy oraz dobrze „zbilansowaną" część teoretyczną, zawierającą charakterystykę widm mas EI (rozdz. 3), omówienie pochodnych organicznych wybranych metali wieloizotopowych wraz ze wskazaniem ich aktywności biologicznej i zastosowań (rozdz. 4). Bardzo ważny jest rozdział 5, który przedstawia i charakteryzuje metody chemometryczne użyte w pracy do analizy widm mas badanych związków. W dalszej, zasadniczej części rozprawy Autor dokonuje analizy widm mas EI związków metaloorganicznych połączonymi metodami chemometrycznymi a następnie przedstawia wnioski, prawidłowo zestawiony spis cytowanej literatury (148 pozycji), spisy tabel i rysunków oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość materiału dysertacji zamieszczona jest na 123 stronach, z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi częściami rozprawy. W rozdziale 4, Doktorant charakteryzując widma mas omawia m.in. procesy fragmentacyjne, rodzaje widm mas uwzględniając ich rozdzielczość, biblioteki widm oraz interpretację widm mas związków organicznych metaloorganicznych. Wyjaśnia również dekonwolucję interferencji izobarycznych w widmach mas oraz eliminację interferencji jonów M-nH w pasmach niskorozdzielczych widm mas. W rozdziale 5 omawia kolejno metody chemometryczne stosowane głównie do analizy widm mas związków organicznych, które Autor pracy wykorzystał do realizacji wytyczonego celu. Krótko przedstawia takie metody jak: (i) analiza składu pasm widmowych dla jednego pasma (BCA - *band composition analysis*) wraz z uwzględnieniem teoretycznych podstaw tej procedury oraz przykładowymi obliczeniami realizowanymi przez algorytm BCA w procesie dekonwolucji widma związku metaloorganicznego, (ii) program MassFeatGen – służący do wyznaczania cech spektralnych obliczonych dla całego widma mas, (iii) analizę głównych składowych (PCA - *principal component analysis*) oraz (iv) analiza wiązkowa (CA - *cluster analysis*). Rozdział obejmuje analizę widm mas EI związków metaloorganicznych pochodnych

organicznych wymienionych wcześniej metali: cyny, żelaza i niklu, wykazujących zróżnicowane profile wieloizotopowe, połączonymi metodami chemometrycznymi.

Mgr inż. Ernest Pujszo przedstawił jasno zdefiniowany plan badań, polegający na wykonaniu kolejnych, logicznie zaprojektowanych zadań. Na początku Doktorant wykonał analizę serii widm dla pochodnych trimetylocyny za pomocą połączonych metod MassFeatGen – PCA. Następnie, powtórzył chemometryczną analizę tych samych widm stosując połączone metody BCA – PCA – CA. Kolejny etapu planu badań obejmował analizę zestawu widm pochodnych organicznych żelaza, wytypowany ze względu na podobieństwo profilu izotopowego tego metalu do profilu węgla; obydwa te pierwiastki w widmie mas wykazują obecność jednego z izotopów o dominującym udziale. Następnie widma te poddał analizie za pomocą metod MassFeatGen – PCA stosowanych dotychczas wyłącznie do związków typowo organicznych, zmieniając wartości liczbowe w parametrach cech spektralnych zdefiniowanych w MassFeatGen. W ostatnim etapie przeprowadził analizę oddzielnie dwóch serii widm organicznych pochodnych niklu, stosując kombinację metod BCA – PCA – CA.

Praca doktorska mgr. inż. Ernesta Pujszo jest opracowaniem teoretycznym. Przeprowadzona chemometryczna analiza niskorozdzielczych widm mas EI pochodnych organicznych wieloizotopowych metali Sn, Fe oraz Ni umożliwiła mgr. inż. Pujszo zrealizowanie założonego celu badawczego. Wykonane badania obejmowały analizę polegająca na wykorzystaniu cech widmowych umożliwiających dokonanie klasyfikacji związków metaloorganicznych. Autor rozprawy uzyskał interesujące wyniki, niektóre z nich mają znamiona nowości naukowej. Do najważniejszych należy zaliczyć:

1. Zidentyfikowanie obecności wspólnych podstruktur w kilku seriach związków metaloorganicznych dla zbadanych widma z użyciem różnych kombinacji połączonych metod chemometrycznych.
2. Wykazanie, że kombinacja metod chemometrycznych BCA – PCA – CA stanowi optymalne podejście umożliwiające skuteczną klasyfikację związków metaloorganicznych metali wykazujących bogate i zróżnicowane profile izotopowe, tj. Ni i Sn.
3. Sformułowanie wniosku, w oparciu o słuszne założenie uwzględniające duże podobieństwo profili izotopowych żelaza i węgla, że kombinacja metod MassFeatGen – PCA, stosowana dotychczas dla widm mas związków typowo organicznych. Metodyka ta okazała się też skuteczna w przypadku badania widm mas organicznych pochodnych żelaza.

4. Wykazanie, że PCA jest bardzo czuła na jakość danych wejściowych, co oznacza zasadność przeprowadzania wstępnej weryfikacji jakości widm w serii badawczej. Dla zrealizowania tego celu korzystne jest opracowanie nowej metody chemometrycznej opartej na analizie profili izotopowych.
5. Wykorzystanie połączonych metod chemometrycznych może być użyteczne przy ocenie jakości widm pochodzących z różnych bibliotek danych. Autor rozprawy wykazał to na przykładzie analizy widm dla pochodnych organicznych żelaza.
6. Wizualna ocena grupowania się punktów odpowiadających widmom związków tej samej klasy na wykresach PCA jest w niektórych przypadkach niepełna i może prowadzić do błędnych wniosków. Autor rozprawy słusznie zaleca w takich przypadkach wykonanie dendrogramu hierarchicznego z użyciem analizy wiązkowej CA.
7. Wykazanie potrzeby ciągłego uzupełniania baz danych o widma kolejnych pochodnych metaloorganicznych. Takie działania umożliwiają coraz skuteczniejsza klasyfikację już istniejących oraz nowych grup tych związków w oparciu o ich widma MS.

W tym miejscu chciałbym poczynić kilka uwag, głównie o charakterze dyskusyjnym, oraz pytań. Spodziewam się, że mgr inż. Ernest Pujszo odniesie się do nich podczas obrony.

1. Użycie metod chemometrycznych w zastosowaniach analitycznych MS oprócz wymienionych już zalet charakteryzuje się pewnymi ograniczeniami i utrudnieniami. Przyczyną ich jest fakt, że podstawowy materiał badawczy do niniejszej pracy stanowiły referencyjne widma mas pochodnych cyny, żelaza i niklu zgromadzone i skatalogowane w renomowanych bibliotekach (bazach widm) w postaci cyfrowej National Institute of Standards and Technology (NIST02 oraz NIST08). Bazy widm zawierają niekiedy wyniki nadmiernie uproszczone o jakości niewystarczającej do prawidłowej klasyfikacji i są nieprzydatne do celów chemometrycznej analizy niskorozdzielczych widm mas EI pochodnych organicznych wieloizotopowych metali. Metody chemometryczne umożliwiają wyeliminować szereg błędów w widmach, uwzględnionych w wartościach indeksu jakości, będących wynikiem wadliwej kalibracji spektrometru mas lub nieprawidłowego zapisu danych. Pozwalają wskazać na występowanie uszkodzeń sygnałów powstałych w następstwie błędów popełnianych w procesie rejestracji i konwersji widm oraz potwierdzić, że przyczyną występowania punktów odbiegających wyraźnie od skupisk oznaczonych na wykresach PCA są błędne wartości intensywności względnych sygnałów w analizowanym widmie mas. Zdaniem recenzenta w

takich przypadkach właściwa weryfikacja widm związana byłaby z koniecznością współpracy z laboratorium dysponującym spektrometrem mas oraz wykonywaniem widm doświadczalnych. Zdaję sobie jednak sprawę, że ten bardzo pomocny fakt zwiększałby jednocześnie praco- czaso- i kosztochłonność badań.

2. Relacja pomiędzy widmami wysokiej i niskiej rozdzielczości podczas użycia metod chemometrycznych do analizy widm mas organicznych pochodnych metali może wpływać na uzyskiwaną informatywność analityczną, tj. na rozróżnienie wśród grup o takich samych podstrukturach (i na dokonanie ich klasyfikacji). W jaki sposób?

3. Skład wieloizotopowego jonu wywiera wpływ na kształt pasma jonu masowego, w jakich przypadkach jest on istotny?

4. Sposób upraszczania widma masowego w celu dokonania wyboru (eliminacji) sygnałów istotnych dla poprawności interpretacji ma zapewne wpływ na ujawnianie cech widmowych. Do jakich uogólnień prowadzą zdobyte przez Autora w tym zakresie doświadczenia?

5. Relację pomiędzy rozdzielczością a dokładnością lokalizacji sygnału w widmie masowym skutkuje efektami obliczeniowymi. Jak można je scharakteryzować?

6. Co sądzi Autor o możliwości włączenia analizy czynnikowej, zwłaszcza wspomaganej komputerowo (computer assisted target factor analysis), do wykonywanych obliczeń w kontekście ułatwienia analizy widm MS w obszarze badań obejmującym dysertację?

Chciałbym z uznaniem stwierdzić, że niniejsza rozprawa doktorska jest interesująca, napisana niezwykle starannie, bardzo dobrym stylem i profesjonalnym językiem. Nie znalazłem w niej niemal żadnych uchybień językowych. Jedyne moje uwagi dotyczą: ulubionego sformułowania Autora: „multiizotowopowy" zamiast "wieloizotopowy" oraz użytego dwukrotnie niezręcznego zwrotu (str. 95, 96): „ …atom N połączony jest z dwoma węglami oraz fosforami".. zamiast „…atom N połączony jest dwoma atomami węgla oraz atomami fosforu"

Poczynione uwagi, zarówno krytyczne jak i dyskusyjne nie zmieniają jednak mojej pozytywnej opinii o wartości naukowej rozprawy doktorskiej mgr. inż. Ernesta Pujszo. Jego rozprawa wskazuje kierunek możliwości rozwoju nowych procedur chemometrycznej analizy widm mas organicznych pochodnych wieloizotopowych metali i niewątpliwie przyczynia się do ich rozwoju. Wcześniej już wskazałem na jej elementy nowości naukowej.

W swoich badaniach Autor rozprawy trafnie wykorzystywał liczne, zwłaszcza fundamentalne prace badawcze Varmuzy, adekwatne do zakresu badań źródła literaturowe, konfrontując otrzymane wyniki z danymi innych autorów. Dzięki umiejętnej i wnikliwej dyskusji uzyskanych wyników, osiągnął cel pracy poparty prawidłowymi wnioskami. Pragnę dodać, że fragmenty pracy doktorskiej są już przedmiotem dwóch wydanych drukiem wspólnych publikacji w czasopismach o zasięgu ogólnopolskim oraz trzech komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych. Mgr inż. Ernest Pujszo jest we wszystkich przypadkach pierwszym współautorem.

Reasumując stwierdzam, że przedstawioną do recenzji dysertację doktorską mgr. inż. Ernesta Pujszo oceniam pozytywnie. Uprzejmie informuję Wysoką Radę Wydziału Technologii Chemicznej, Politechniki Poznańskiej, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim (określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003r. "O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. nr 65/03, poz. 595) i w rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15.01.2004r. (Dz. U. nr 15/04, poz. 128) oraz rozporządzeniu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 15.12.2005r. (Dz. U. nr 252/05, poz. 2125) „W sprawie szczegółowego trybu prowadzenia czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora") i z wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Ernesta Pujszo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.