

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Mirjam Prokoptšik

Kromatogrammid õppetöök ja FAIR andmeteks

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: kaasprofessor Koit Herodes
keemik Ernesto de Jesus Zapata Flores (PhD)

Tartu 2024

Kromatogrammid õppetöoks ja FAIR andmeteks

Töö eesmärk on teostada parameetreid muutes erinevaid vedelikkromatograafilisi analüüse ja kasutada saadud kromatogramme õppematerjalides. Esmalt selgitatakse erinevate parameetrite mõju tulemustele ning seejärel illustreeritakse neid kasutades reaalseid kromatogramme. Kromatograafilisi analüüse tehti 4 erineva parabeeniga – metüül-, etüül-, propüül-, butüülparabeeniga – ning uratsiili ja tiouureaga. Instrumendiks kasutati klassikalist kõrgefektiivset vedelikkromatograafi Agilent 1100 diodrivi detektoriga. Teine töö eesmärk on kirjeldada FAIR andmete põhimõtteid ja nende olulisust vedelikkromatograafilise analüüsi kontekstis ning luua veebilehe mudel mis võimaldab kromatograafilisi andmestikke FAIR põhimõtteid järgides avalikustada, vaadata ja muuta.

Märksõnad: kromatograafia, kromatogramm, HPLC, FAIR

CERCS: P300, Analüütiline keemia

Chromatograms for studying and FAIR data

The aim of the work is to perform various liquid chromatographic analyses by changing the parameters and use the obtained chromatograms in educational materials. First, the effect of various parameters on the results is explained and then they are illustrated using real chromatograms. Chromatographic analyses were performed with 4 different parabens – methyl-, ethyl-, propyl-, butylparaben – and uracil and thiourea. A classical high-pressure liquid chromatograph Agilent 1100 with a diode array detector was used. The second goal of the work is to describe the principles and importance of FAIR data in the context of liquid chromatographic analysis, and to create a website model for viewing, editing and uploading chromatographic datasets following the FAIR principles.

Keywords: chromatography, chromatogram, HPLC, FAIR

CERCS: P300, Analytical chemistry

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Vedelikkromatograafia	7
1.2 Kromatograafiline süsteem.....	8
1.3 Kvalitatiivne kromatograafiline analüüs	10
1.4 Kvantitatiivne kromatograafiline analüüs	10
1.5 Katseandmete avaldamine – FAIR	11
2. Eksperimentaalne osa.....	14
2.1 Kasutatud seadmed ja kemikaalid	14
2.2 Teostatud analüüsid ja meetodid	15
3. Tulemused ja arutelu	17
3.1 Põhimõisted	17
3.1.1 Piik ja baasijoon.....	17
3.1.2 Retentsiooniaeg.....	17
3.1.3 Piigi kuju, piigi laius, kõrgus ja laius poolel kõrgusel.....	18
3.1.4 Surnud aeg	18
3.1.5 Retentsioonifaktor.....	19
3.2 Surnud aeg ja selle määramine	20
3.3 Retentsiooni sõltuvus aine struktuurist.....	23
3.4 Retentsiooni sõltuvus eluendi koostisest	24
3.4.1 Retentsiooniaja sõltuvus orgaanilise lisandi sisaldusest eluendis.....	24
3.4.2 Retentsioonifaktori sõltuvus eluendi orgaanilise komponendi sisaldusest	25
3.5 Retentsiooniaja ja piigi laiuse sõltuvus eluendi voolukiirusest	26
3.6 Van Deemteri võrrand	27

3.7 Kvalitatiivne kromatograafiline analüüs	31
3.8 Kvantitatiivne kromatograafiline analüüs	33
3.9 FAIR andmete põhjal kromatogrammide avaldamise mudel	34
3.10 Veebilehe mudel	35
Kokkuvõte	38
Summary	39
Kasutatud kirjandus	40
Lisa 1. Põhimõisted	41
Lisa 2. FAIR-i 15 printsiipi	42
Lisa 3. Optimaalse voolukiiruse kontroll	45

Kasutatud lühendid

B%	orgaanilise lisandi sisalduse protsent eluendis (<i>organic percentage</i>)
C18	oktadetsüülsilüül-modifitseeritud statsionaarne faas (<i>octadecylsilyl-modified stationary phase</i>)
DAD	diodrivi detektor (<i>diode array detector</i>)
Et-p	etüülparabeen (<i>ethylparaben</i>)
FAIR	leitav, kättesaadav, ühildatav, taaskasutatav (<i>findable, accessible, interoperable, reusable</i>)
F_c	Voolukiirus (<i>flow rate</i>)
H_{eff}	Teoreetilise taldriku kõrgus (<i>theoretical plate height</i>)
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Me-p	metüülparabeen (<i>methylparaben</i>)
N_{eff}	teoreetiliste taldrikute arv (<i>theoretical plate number</i>)
Pr-p	propüülparabeen (<i>propylparaben</i>)
t_m	surnud aeg (<i>hold-up time</i>)
t_r	retentsiooniaeg (<i>retention time</i>)
u	mobiilse faasi liikumiskiirus (<i>mobile-phase velocity</i>)
UV	ultravioletse spektriala kiirus, vastavat kiirgust kasutav detektor (lühendit kasutatakse ka olukorras, kus detektor katab nähtavat spektriala) (<i>ultra-violet</i>)
Vis	nähtava spektriala kiirus (<i>visible</i>)
V_m	surnud ruumala (<i>hold-up volume</i>)
w_b	piigi laius baasijoonel (<i>peak width at base</i>)
w_h	piigi laius poolel kõrgusel (<i>peak width at half height</i>)

Sissejuhatus

Vedelikkromatograafia meetod on oluline ja laialdaselt kasutatav erinevates keemia valdkondades, farmaatsias, meditsiinis, toiduainetööstuses ja mujal [1]. Vedelikkromatograafia olulisuse tõttu saab seda õppida mitmetel ülikooli ja ka rakenduskõrgkooli erialadel ning isegi mõnda gümnaasiumi programmi on see oluline teema sisse mahtunud. Loomulikult on nii laialdaselt õpitava teema jaoks vaja palju erinevaid harivaid õppematerjale, kuid tihtipeale ei ole need piisavad. Olemasolevad materjalid annavad küll edasi vajalikku infot ning loovad ettekujutuse vedelikkromatograafiast, kuid tihti kasutatakse illustratsiooniks simuleeritud või teadusartiklitest võetud kromatogramme. Sellised kromatogrammid kas ei anna reaalselt pilti (näiteks puudub müra), või demonstreerivad haruldasi erijuhte, mis on liiga keeruline, et ilma erialaste teadmistega inimene seda mõistaks. Nii on keeruline saada ettekujutust, kuidas sellised kromatogrammid saadi, kas need on õnnestunud või mitte, ning mis parameetrid kromatogrammi mõjutavad.

FAIR mudel on alates 2016. aastast laialdaselt kasutusel olev põhimõtete kogumik, kuidas katseandmeid avalikustada. Mudel lähtub neljast märksõnast: leitavus, kättesaadavus, ühildatavus ja taaskasutatavus. Iga märksõna on täpsemalt välja kirjutatud kasutades viitteist FAIR mudeli printsiipi. [2]

Käesoleval tööol on kaks eesmärki:

Esiteks teostada parameetreid muutes erinevaid vedelikkromatograafilisi analüüse ja kasutada saadud kromatogramme õppematerjalides. Teha selleks analüüse muutes erinevaid parameetreid (voolukiirus, orgaanilise lisandi sisaldus eluendis, süstimiskogus, analüüsi pikkus), uurida välja nende mõju ning illustreerida parameetrite mõju kromatogrammide ja vastavate graafikute abil.

Teiseks kirjeldada FAIR andmete põhimõtteid ja nende olulisust vedelikkromatograafilise analüüsi kontekstis ning luua veebilehe mudel, mis võimaldab kromatograafilisi andmestikke FAIR põhimõtteid järgides avalikustada, vaadata, ja muuta.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Vedelikkromatograafia

Vedelikkromatograafia on meetod, mis lahutab proovi komponentideks. See lahutus toimub proovi interaktsioonide alusel mobiilse ja statsionaarse faasiga. Segu komponendid eraldatakse kolonnis, lähtudes iga komponendi afiinsusest mobiilse faasi suhtes. Kolonn kromatograafias on toru, mille sees on statsionaarne faas ja mille läbi liigub mobiilne faas. Segu komponendid võivad jaotuda mobiilse ja statsionaarse faasi vahel erinevalt. Mida suuremal määral on aine (segu komponent) jaotunud mobiilsesse faasi, seda lühem on tema retentsiooniaeg. Retentsiooniaeg (t_r) on aeg proovi sisestamise ja huvipakkuva aine piigi maksimumi tekkimise vahel. [3,4]

Vedelikkromatograafias mõjutavad retentsiooniaega mitmed tegurid: voolukiirus, kolonni temperatuur, kolonnis toimuvad interaktsioonid, mobiilse faasi koostis. Isokraatiline meetod – kromatograafia meetod, kus ühe elueerimise vältel mobiilse faasi koostis ei muutu. Eluendi voolukiirus (F_c) on mobiilse faasi liikumise kiirus läbi kolonni. Retentsiooniaeg isokraatilise lahutuse puhul on pöördvõrdeliselt seotud voolukiirusega, mis tähendab seda, et kui voolukiirust tõstetakse, siis retentsiooniaeg lüheneb. Kui voolukiirust tahtlikult ei muudeta, siis on selle muutumise kõige sagedasemad põhjused kas õhumullid instrumendi pumbas või instrumendi lekkimine. Retentsiooniaega alandab ka kolonni temperatuuri tõstmine. Rusikareegel on, et isokraatilise pöördfaasvedelikkromatograafia lahutuse puhul retentsiooniaeg muutub 2% iga 1 °C muutuse puhul kolonnis. [3,5]

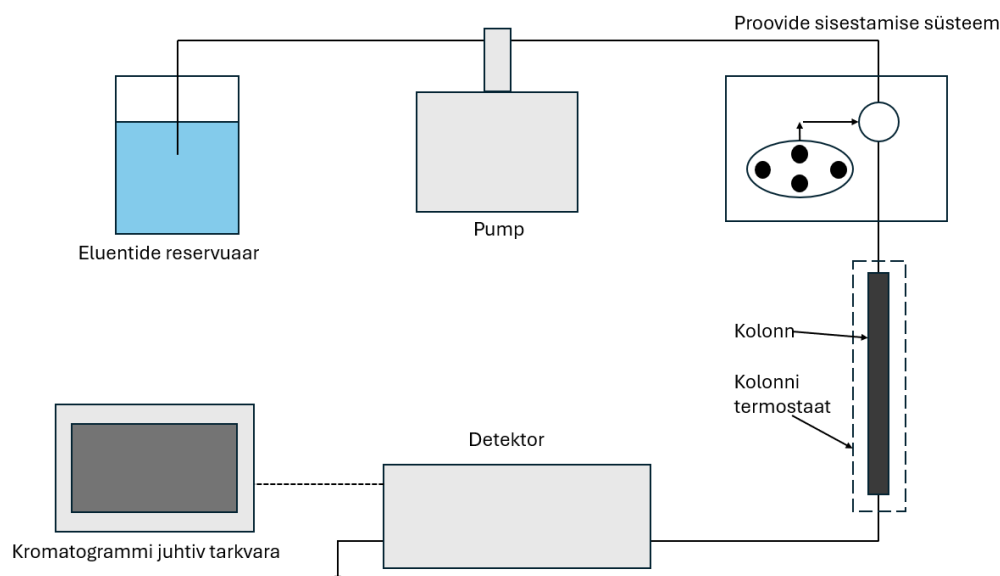
Pöördfaasvedelikkromatograafia on vedelikkromatograafia alaliik, mille puhul on mobiilne faas polaarne ja statsionaarne faas mittepolaarne (faasid on täpselt vastupidise polaarsusega normaalfaas vedelikkromatograafia puhul). Pöördfaasvedelikkromatograafias domineerib retentsiooniaja määramisel analüüdi hüdrofoobsus. Seega on polaarsetel molekulidel lühemad retentsiooniajad kui mittepolaarsetel ning ka proovi komponentide retentsiooniaeg kasvab kõige polaarsemast kõige mittepolaarsemani. Kui proovi komponentidel puuduvad aluselised ja happelised omadused, siis enamikel juhtudel võib mobiilse faasi pH mõju ainete retentsioonile tühiseks lugeda. [6]

Kõige olulisemad retentsiooni mõjutavad faktorid, mis on seotud mobiilse faasiga, on järgmised: eluendi pH, kasutamiseks valitud orgaaniline solvent ja orgaanilise aine sisaldus mobiilses faasis (B%). Puhver peab olema valmistatud süsteemile vastavas

puhverdusvahemikus, et pH oleks konstantne kogu elueerimise vältel. Puhvrit peab kasutama, et proovi lahuse pH ei mõjutaks eluendi pH-d. Parim puhverdusvõime on ühe pH-ühiku piires puhvris kasutatava happe (või aluse) pK_a -st. Kui tegemist on mitteioniseeruvate analüütidega, siis ei ole puhvrid tavaliselt vajalikud. Happed ja alused vajavad mobiilses faasis puhvri olemasolu. Lahustamiseks kasutatav orgaaniline solvent peaks olema kõikide analüüsides vältel muutumatu, et vältida retentsioonija muutust. Selleks, et analüüs suurema tõenäosusega õnnestuks ja tulemusi oleks lihtsam tõlgendada, siis oleks turvalisem valida mõni pöördfaasvedelikkromatograafias laialt kasutatav solvent (nt atsetonitriil, metanool). Orgaanilise solvendi tüübiga vähemalt sama oluline on orgaanilise aine sisaldus mobiilses faasis. Iga 10% orgaanilise faasi muutuse korral mobiilses faasis muutub retentsiooniaeg ligikaudu 2,5 korda. [5]

1.2 Kromatograafiline süsteem

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia süsteemid on hästi välja arenenud. Suuremal määral on kõik kromatograafilised süsteemid sarnase ülesehitusega, kuid mudelitel esineb pisemaid erinevusi, mis lasevad süsteemidel ajaga edasi areneda. Instrumendi põhikomponentideks on eluendi pump, proovide sisestamise süsteem ja kolonn. Instrumendi põhikomponent on ka detektor, selle puhul on tootja sageli muude põhikomponentide omast erinev, eriti kui vajatakse spetsiaalset detektorit (näiteks tandem massispektromeeter MS/MS). Lisaks võib kromatograafilisse süsteemi kuuluda kolonni termostaat ja eluendi degasaator. **Joonis 1** kujutab ühte tüüpilist kromatograafilist süsteemi. Mobiilne faas tõmmatakse reservuaarist pumpa, mis kontrollib mobiilse faasi voolukiirust (F_c) ja tekitab piisavalt kõrge rõhu, et suruda mobiilne faas läbi kolonni. Suurem osa pumpadest on mõeldud töötama rõhul kuni 400 bar (1 bar = 100 000 Pa), enamasti jäävad analüüsidsiiski 50-200 bar vahemikku. Proovid sisestatakse süsteemi kasutades spetsiaalseid sisestussüsteeme, mis mõõdavad ettenähtud proovikoguse. Proovi komponentide lahutumine toimub kolonnis, mida tavaliselt ümbritseb kolonni termostaat, mis reguleerib ja hoiab stabiilsena kolonni temperatuuri. Detektor tuvastab muutused sellest läbi voolava eluendi mingis omaduses, näiteks optilise neelduvuse muutumise analüüdi tõttu. Kromatograafi juhtiv tarkvara monitoorib detektori tuvastatut ja võimaldab saadud andmestikku graafiliselt ja tabulaarselt analüüsida. [4]



Joonis 1. Kromatograafiline süsteem

Kõrgefektiivsevedelikkromatograafia süsteemides on õhumullid suureks probleemiks, seega tuleb nendest vabaneda mobiilse faasi degaseerimise abil. Enamasti on degaseerimine vajalik, et parandada pumba toimimist, kuid vahel võivad mullid häirida ka detektori tööd. Teoorias võiks käsitsi kokku segatud isokraatilised eluendid olla kasutatavad ka degaseerimiseta, kuid usaldusväärsemate tulemuste saamiseks soovitatakse siiski kõik eluendid degaseerida. Proovide sisestamisel kasutatakse nii manuaalset süsteemi kui ka automaatset proovide sisestamist (tänapäeval levinum). Nii manuaalsete kui automaatsete proovide sisestamise süsteemide puhul on kasutusel spetsiaalne klapp, et proove saaks sisestada voolavasse ja rõhu all olevasse mobiilsesse faasi ilma, et üldist instrumendi ja pumba tööd häiritaks.

Enamkasutatavad detektorid põhinevad UV-Vis kiirguse neeldumise mõõtmisel (UV-Vis, DAD), aga on veel palju erinevaid detektoreid (massispektromeetiline (MS), fluorestsents (FLD), murdumisnäitaja (RI) jne). [4]

HPLC kolonnideks on tavaliselt 5-25 cm pikkused ja 1-4,6 mm siseläbimõõduga metalltorud, mis on täidetud statsionaarse faasi kandvate osakestega. Mobiilse ja statsionaarse faasi kokkupuutepinna suurendamiseks on osakesed poorsed. Klassikaliselt on poorid kogu osakese ruumalas (nn läbivate pooridega osakesed), kuid valmistatakse ka pinnalt poorseid osakesi. [7]. Osakesed on sfäärilised ja nende läbimõõdud jäävad vahemikku 1,7-5 μm ning erinevad materjali poolest (kõige tavalisem on silikageel). Milliste parameetritega kolonn täpselt valitakse, sõltub analüüsi vajadustest, näiteks kui proov on väga hüdrofoobne lahutub kaua, kasutatakse lühemaid kolonne. [4]

1.3 Kvalitatiivne kromatograafiline analüüs

Kvalitatiivne analüüs kas aitab tuvastada või kinnitada analüüsitava aine identiteeti. Iseenesest on vedelikkromatograafia üsna nõrk meetod kvalitatiivseks analüüsiks, kuid kasutades hästi toimivat HPLC süsteemi koos asjakohase detektoriga, saab süsteemi muuta palju selektiivsemaks. HPLC puhul kasutatakse kvalitatiivseks analüüsiks kolme lähenemisviisi: retentsiooniaeg, selektiivne detektor ja *offline* analüüs. Kui standardaine retentsiooniaeg on sama, mis küsimuseks oleval piigil, siis on võimalus, et tegemist on sama ainega. Kui lisaks samale retentsiooniajale on sarnased ka piikidest registreeritud UV-Vis spektrid (kasutades DAD-detektorit), siis juba päris kõrge tõenäosus, et tegemist on sama ainega. Veelgi suurema kindlusega võimaldab aineid identifitseerida MS-detektor. Uuritava piigi võib eraldada ka preparatiivselt ja saadud lahust analüüsida eraldiseisva meetodiga (nt IR, NMR). [4]

Online analüüsid selektiivse detektoriga eeldavad, et instrumendid ise annavad kvalitatiivset informatsiooni analüüsitud ainete kohta. Selleks sobivad mõningad HPLC detektorid (UV, MS, FLD). UV detektorid suudavad genereerida kromatograafilistest piikidest UV spektri, mis võib aidata tuvastada proovis leiduvat ainet, kuid UV-Vis spekritel ei ole selget seost aine struktuuriga ja seega need ei sobi enamasti identifitseerimiseks. [4]

Offline analüüse saab teha HPLC instrumentide puhul, kus on võimalik kokku koguda piisavalt palju puhtal kujul analüüti pärast selle elueerumist läbi kolonni. Pärast aine kokku kogumist analüüsitakse seda mõne muu märja keemia või instrumentaalmeetodiga, mis võimaldab aine identifitseerida. [4]

1.4 Kvantitatiivne kromatograafiline analüüs

HPLC süsteemid suudavad küll anda kvalitatiivset infot proovide kohta, kuid HPLC tõeline tugevus on kvantitatiivne analüüs. Analüütilises laboris on HPLC sageli kasutatav tööriist kvantitatiivse analüüsi jaoks. Selleks, et analüüsitulemused oleks usaldusväärsed, tuleb esmalt jälgida viit nõuet. Esiteks, HPLC süsteem ja sellega seotud meetod peavad töötama piisava täpsusega reprodutseeritaval viisil. Teiseks, instrumendi andmete süsteem peab täpselt registreerima detektori signaali muutust ajas. Kolmandaks, süsteem peab olema korrektselt kalibreeritud. Neljandaks, kogu andmestikku tuleb töödelda viisil, mis tagab, et kogu süsteem jälgib ettenähtud standardeid. Viiendaks, instrumendi parameetrid peavad olema sätitud nii, et baasijooned püsiks stabiilsed ja piikide resolutsioon oleks adekvaatne ($R_s > 1,5$). Piigi

resolutsioon (R_s) on kahe piigi lahutus väljendatud retentsiooniaegade erinevusega, jagatud piigi keskmise laiusega baasijoonel (Valem(1)) [3]. [4]

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R,1} - t_{R,2}}{w_{b,1} + w_{b,2}}$$

(1)

1.5 Katseandmete avaldamine – FAIR

Alates 2016. aastast kasutatakse katseandmete avaldamisel FAIR põhimõtteid. Artiklis, milles esmakordselt avaldati FAIR põhimõtteid, väidavad autorid, et teadusandmete taaskasutamiseks on hädasti vaja kiireloomulist lahendust. Lühend FAIR tuleb ingliskeelsete sõnade algustähtedest: *findable*, *accessible*, *interoperable*, *reusable*, mis tähendavad eesti keeles leitavust, kättesaadavust, ühildatavust, taaskasutusvõimet. Need neli aluspõhimõtet on täpselt ja selgesõnaliselt kirjeldatud 15 põhimõtte kaudu. 15 põhimõtet on pikalt välja kirjutatud ja selgitatud Lisas 2. FAIR-andmete eesmärk on esmalt suutlikkus kõiki tulemusi ühtselt tõlgendada ja teisalt samu meetodeid ühtselt rakendada ühtivate tulemuste saamiseks. FAIR põhimõtete järgimine peaks tekitama olukorra, kus andmeressursse kasutatakse võimalikult efektiivselt, teisisõnu töö tegija peab teadma, mida konkreetsed andmed tähendavad ja kuidas neid kasutada. Töö tegija all mõistetakse kas tehisintellekti, kes inimese asemel töö ära teeb ja/või instrumenti mida inimene kasutab töö tegemiseks. FAIR-i peamine eesmärk on teha digitaalsed andmed töö tegijale kasutatavaks. [2,8]

FAIR printsiipides mainitakse palju andmeid (*data*) ja metaandmeid (*metadata*). Andmete all mõistetakse kõiki digitaalseid kirjeid, ehk siis mitte ainult andmeid tulemuste kujul, vaid ka näiteks tarkvaratööriistu, meetoodikat. Metaandmete all mõistetakse mistahes ressursi kirjeldust, mille eesmärk on võimaldada selle ressursi leitavust, taaskasutust, tõlgendamist, hindamist. Andmed on miski, mida kirjeldatakse, ja metaandmed on miski, mis kirjeldab andmeid. Selleks, et vältida nende kahe mõiste sassi ajamist, käsitletakse FAIR-andmete puhul kõiki andmete ja metaandmete paare eraldi. Seega, võib olla olukordi, kus ühes kontekstis on kirjeldatav käsitletav andmetena ja teises metaandmetena. Näiteks, kromatograafias on andmete näide analüüsiga saadud retentsiooniga tähistav arv ja metaandmeteks selle analüüsi tegemise kuupäev, instrumendi liik, kolonn, aine, meetod ning retentsioonija ühik. Samuti kuulub metaandmete alla analüüsi teostaja nimi, kuid sama nimi võib labori töötajate kontekstis kuuluda hoopis andmete alla. [2,8]

Leitavus eeldab, et digiressursid on nii arvutile kui ka inimesele hõlpsasti leitavad. Masinloetavad metaandmed on samuti hädavajalik osa FAIR-andmetest, sest siis on võimalik asjakohaseid andmeid leida automaatselt. [2]

Kättesaadavus eeldab, et digitaalsete ressursside hankimise eeskirjad on selgesõnalised nii inimestele kui ka masinatele. On olemas arusaadavad mehhanismid ligipääsuta andmetele juurdepääsuloa saamiseks. [2]

Ühildatavus eeldab, et kui kaks või enam digitaalset ressursi on seotud ühe ja sama teema või üksusega, siis peaks olema võimalik masinatel liita kogu informatsioon kokku ühtseks üksuseks. Sarnaselt, kui digitaalset üksust on võimalik töödelda võrguteenusega, siis peaks masin automaatselt tuvastama nende vastavuse ning hõlbustama andmete ja selle tööriista vahelist suhtlust. See eeldab, et iga osaleva ressursi tähendus oleks selge. [2]

Taaskasutusvõime eeldab, et digitaalsed ressurssid on nii inimeste kui ka masinate jaoks piisavalt hästi kirjeldatud, et masin on võimeline otsustama, kas digitaalset ressursi tohiks uuesti kasutada (ehk kas see on antud eesmärgi jaoks asjakohane), kas ja millistel tingimustel saab ressursi taaskasutada (kas inimene/masin täidab taaskasutuse eelduseid) ning kellele teada anda ja au omistada kui ressursi taaskasutatakse. [2]

Olgugi, et FAIR põhimõtete kasutuselevõtt on laialdaselt heaks kiidetud ja mõningates olukordades ka kasutusele võetud, on mõned valdkonnad andmestike esitamisest FAIR põhimõtete järgi veel väga kaugel. [2] Hetkeseis andmestiku kogumisega on keemialaborites väga erinev. Kasutatakse palju erinevaid instrumente ja meetodikaid, nii nn märga keemiat kui ka instrumentaalanalüüsi. Tavaliselt märgitakse laborites põhilised tähelepanekud ja töökäigud üles paber kandjal olevatesse laboripäevikutesse, mis on eraldiseisvad digitaalsetest tulemustest. See meetod on küll kergesti käsitletav ja kättesaadav keemiku enda poolt, kuid tihti pole loetav ja arusaadav teiste inimeste poolt. Sellisel kujul salvestatud andmestikku on väga keeruline üle kanda digitaalsele ja ühesele kujule. Isegi kromatogrammide, joonistuste ja tabelite säilitamiseks tihti ainult pildi kujuna, mis ei võimalda tutvuda ühegi teise (meta)andmega, mis pole pildil välja toodud. Kogutud digitaalseid tulemusi hoiustatakse tihti arvuti kõvakettal või mälupulga peal. Tegemist ei ole kuigi ohutu ja jätkusuutliku hoiustamisega, mistõttu on aina enam hakatud digitaalseid andmeid pilveteenustesse paigutama. Sellisel viisil hoiustatud andmestikke on küll kerge jagada kolleegidega, kuid avalikustamine on raskendatud. [9]

Selleks, et oleks võimalik (meta)andmete taaskasutamine, on vajalik kogu andmestik koguda üheselt mõistetavalt, dokumenteeritult, organiseeritult ja standardiseeritult, kasutades samu faili

formaate. Soovitatav oleks laboritel analüüse tehes jälgida algusest peale FAIR põhimõtteid, et hõlbustada (meta)andmete taaskasutust. See nõuab fundamentaalset ümberhäälestust enamus laborite ja teadlaste puhul. Tuleb rajada spetsiaalsed repositooriumid, mis säilitaksid kindlate valdkondade andmestikke lähtudes FAIR põhimõtetest. FAIR põhimõtete järgi (meta)andmete avalikustamine ja selle tõttu ka taaskasutamine on oluline, et kõiki analüüse ei peaks tegema täiesti uuesti, kui inimest huvitab ainult teatud osa (meta)andmetest. Samuti on (meta)andmete avalikustamine oluline hariduse vaatepunktist, et õppijad saaksid päris andmestikuga võimalikult realistliku ettekujutluse. [9]

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud seadmed ja kemikaalid

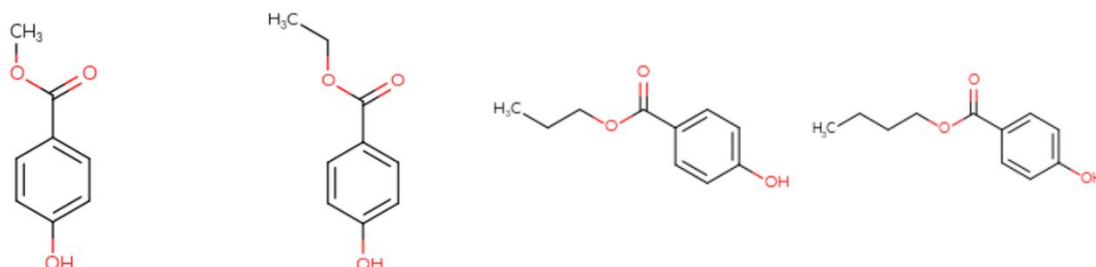
Analüüside tegemiseks kasutati Agilent 1100 Series HPLC DAD instrumenti. Instrumendi osad on degaseerija, kõrgsurvepump, proovide automaatsisestaja, kolonni termostaat, kolonn ja DAD detektor. Kasutatud detektor suudab mõõta lainepikkusi 190-950 nm ja töötab registreeriti spektrid terves selles vahemikus. Kromatogrammid registreeriti 254 nm lainepikkuse juures, mis on kasutatud ainete neeldumismaksimum. Kasutati 15 cm pikkust ja 4,6 mm diameetriga C18 Phenomenex läbivalt poorsete osakestega kolonni, täidiseosakeste suurus oli 5 µm. Eelkolonnina kasutati Phenomenex C18 2 mm pikkust ja 4,6 mm diameetriga kolonni, et vältida analüütilise kolonni saastumist. Eluendi komponentidena kasutati metanooli ja sipelghappe 0,1% vesilahust, millede suhet varieeriti erinevates analüüsides. Proovide lahustamiseks kasutati metanooli ja vee segu 1:1 mahu järgi. Vesilahustes kasutati Milli-Q IQ 7000 puhastussüsteemi vett.

Analüüse tehti 6 erineva aine ning nende omavaheliste segudega. Analüüsitavad ained olid metüülparabeen, etüülparabeen, propüülparabeen, butüülparabeen (**Joonis 2**) ning uratsiil ja tiourea (**Joonis 3**). Parabeenid olid nii segudes kui üksikainetena kontsentratsiooniga 1 mM, uratsiil ja tiourea kontsentratsiooniga 1,5 mM. Ainete puhtused ja allikad on toodud allpool (**Tabel 1**). Ainete lahused tehti valmis kaaludes puhast ainet analüütilise kaaluga viaalidesse. Seejärel lisati neile solventi nii, et saadi 10 – 15 mM lahused, millest tehti omakorda lahjendused nii, et saadi vajaliku kontsentratsiooniga lahus. Solventi lisati automaatpipetiga, segamiseks kasutati VWR International keerissegurit.

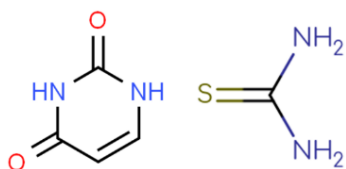
Tabel 1. Kasutatud ained, nende allikad ja puhtus

Aine	Allikas	Puhtus
Metanool (solvent, eluent)	Honeywell	≥99,9%, LC-MS puhtus
Sipelghape (eluent)	Honeywell	≥98%, LC-MS puhtus
Metüülparabeen	PolyScience	≥99%
Etüülparabeen	PolyScience	99%
Propüülparabeen	PolyScience	≥99%

Butüülparabeen	PolyScience	98%
Uratsiil	Sigma	99%
Tiouurea	Sigma	98%



Joonis 2. Metüülparabeeni, etüülparabeeni, propüülparabeeni ja butüülparabeeni struktuurivalemid.



Joonis 3. Uratsiili (vasakul) ja tiouurea struktuurivalemid.

2.2 Teostatud analüüsid ja meetodid

Tabel 2. HPLC analüüside tingimused. A tähistab eluendi ühte komponenti – sipelghapet, B teist komponenti – metanooli.

Parameeter	Uuritud vahemik
A%	20 - 50%
Analüüsi pikkus	15 - 150 min
B%	50 - 80%
Eluendi komponent A - 0,1% sipelghappe vesilahus	konstantne
Eluendi komponent B - Metanool	konstantne
F_c	0,1 - 2,0 ml/min
Koloni temperatuur	konstantne 30 °C
Sisestava aine kogus	1 - 5 μ l
Parabeenide kontsentratsioon	0,1 - 1 mM

Kokku tehti koos korduskatsetega üle 500 analüüsi nii üksikute ainete ja nende segudega. Parameetritest varieeriti voolukiirust, orgaanilise komponendi sisaldust, süsti ruumala, analüüsi pikkust (**Tabel 2**). Igast analüüsist pandi Exceli tabelisse kirja analüüsi number, kuupäev, meetodi nimetus, proovi sisu ja eksperimentaalselt mõõdetud retentsiooniaeg, piigi pindala, kõrgus ja laius poolelt piigi kõrguselt. Nende andmetega sai teha kõik edasised arvutused ja graafikud. Iga aine või seguga konkreetset mõõtmist tehti vähemalt kolm korduskatset nii, et retentsiooniaeg ei muutuks üle 0,1 min. Taoline lubatud retentsiooniaja muutus on määratud Euroopa Komisjoni poolt [10].

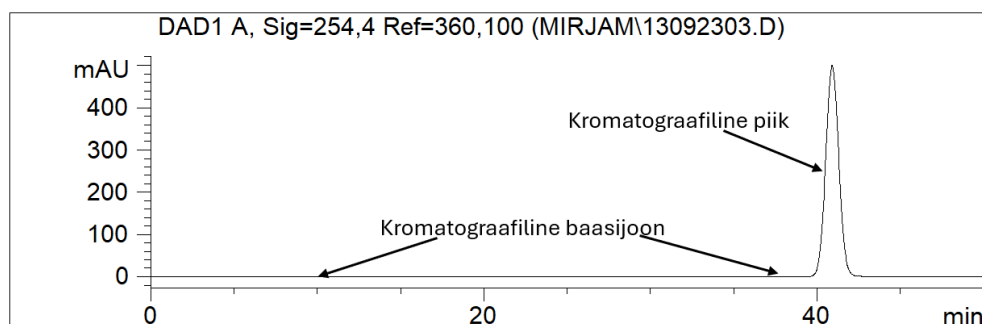
3. Tulemused ja arutelu

3.1 Põhimõisted

Kõik põhimõisted on välja toodud lisa 1. Mõistete ja seoste selgitused koos illustreerivate kromatogrammidega on esitatud järgnevas peatükis.

3.1.1 Piik ja baasijoon

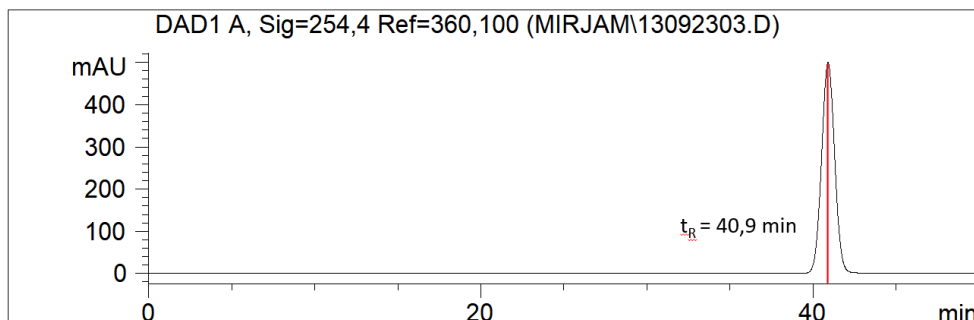
Kromatogramm – graafik, mis väljendab detektori signaali sõltuvust elueerimise ajast (vahel ka ruumalast) (**Joonis 4**). Kromatograafiline piik – kromatogrammi osa, mis esitab detektori vastust kui üks või mitu komponenti kolonnist elueeruvad. Kromatograafiline baasijoon – kromatogrammi osa, mis esitab detektori vastust hetkel, kus ainult mobiilne faas väljub kolonnist. **Joonis 4** iseloomustab nii kromatograafilist piiki kui baasijoont. [3]



Joonis 4. Kromatogramm iseloomustamaks kromatograafilist baasijoont ja piiki.

3.1.2 Retentsiooniaeg

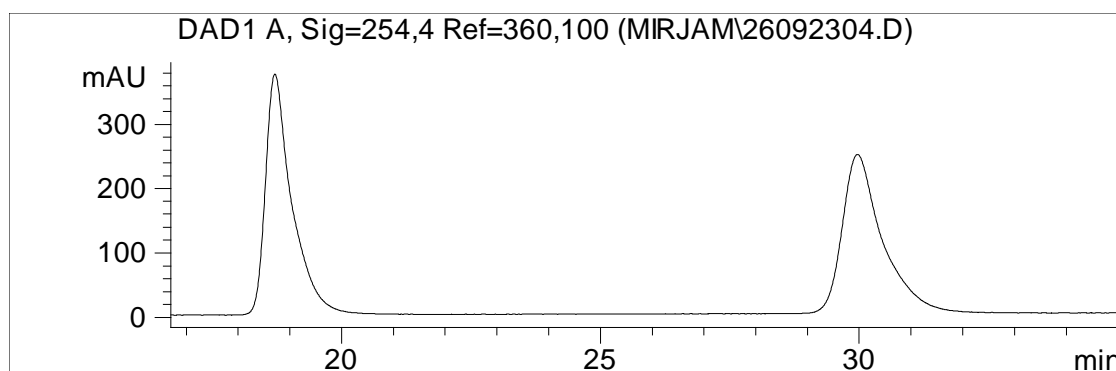
Retentsiooniaeg (t_R) on aeg proovi sisestamise ja huvipakkuva aine piigi maksimumi tekkimise vahel [3]. **Joonis 5** iseloomustab, kuidas määrata kromatogrammilt retentsiooniaega, selleks tuleb leida piigi maksimum ja leida x-teljelt sellele vastav aeg.



Joonis 5. Retentsiooniaja määramine kromatogrammilt. Aine Me-p, $F_c = 0,1$ ml/min, B% = 50%, $t_R = 40,9$ min.

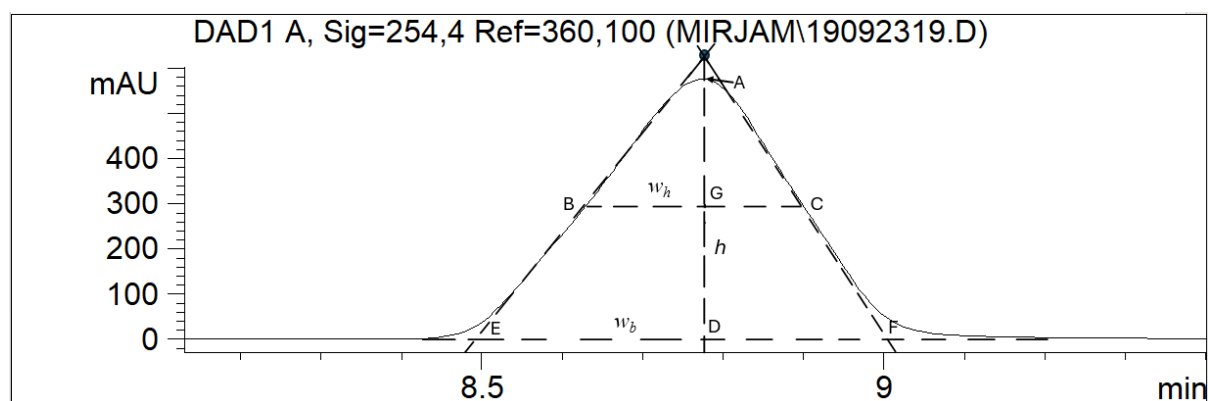
3.1.3 Piigi kuju, piigi laius, kõrgus ja laius poolel kõrgusel

Ideaalne piik on Gaussi kõvera kujuga ehk kui piigi maksimumist tõmmata vertikaalne joon, siis mõlemale poole joont tekib 2 sümmeetrilist poolikut piiki. Gaussi kõverast erinevat piiki nimetatakse asümmeetriliseks piigiks. Enamasti on piigid välja venitatud suurema retentsiooniaja poole, mida nimetatakse sabatamiseks aga ka lohisemiseks. Sabatavat piiki iseloomustab **Joonis 6**. [3]



Joonis 6. Kromatogramm iseloomustamaks piikide sabatamist.

Piigi kõrgus (h) – vahemaa piigi maksimumi ja baasijoonel vahel, mõõdetakse paralleelselt detektori vastust ilmestava teljega. Piigi laius baasijoonel (w_b) – piigi laius baasijoonel, mida mõõdetakse piigi puutujate ja baasijoonel lõikumispunktide vahelt. Piigi laius poolelt kõrguselt (w_h) – piigi laius poolelt piigi kõrguselt, mida mõõdetakse mõlema piigi küljega lõikumispunkti vahelt. Kõiki neid parameetreid iseloomustab **Joonis 7**. [3]

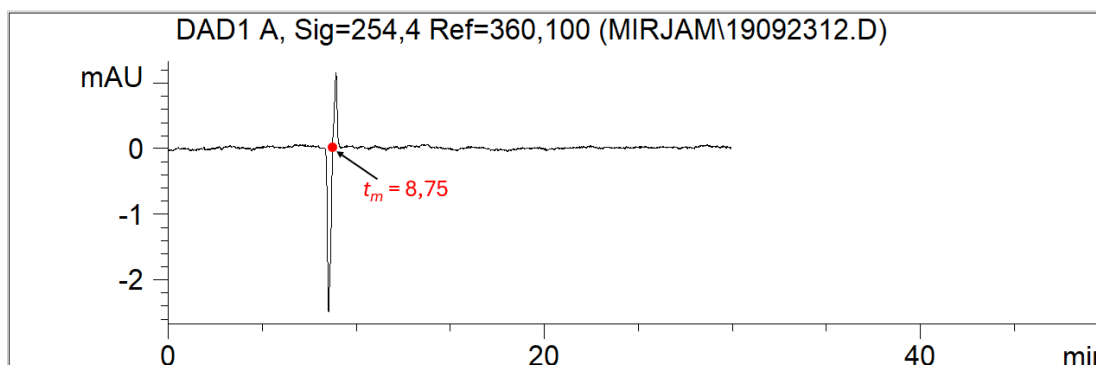


Joonis 7. Kromatogramm iseloomustamaks piigi kõrgust h (AD), piigi laiust baasijoonelt w_b (EF) ja piigi laiust poolelt kõrguselt w_h (BC).

3.1.4 Surnud aeg

Surnud ajaks (t_m) nimetatakse aega, mis kulub sellisel ainel kolonni läbimiseks, mis ei seostu kolonni statsionaarse faasiga. Surnud ruumala (*hold-up volume*) (V_m) on sellise aine elueerumiseks kuluv mobiilse faasi ruumala, mis ei seostu statsionaarse faasiga.

Vedelikkromatograafia kromatogrammil märgib surnud aega tavaliselt proovi solvendist tingitud baasijooni häiritus, mida demonstreerib **Joonis 8**. Põhjalikumalt kirjeldab surnud aega ja selle olulisust peatükk 3.2.



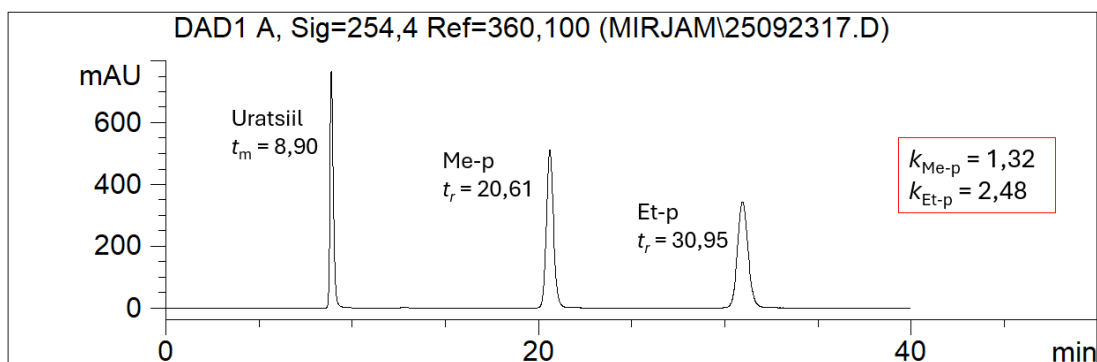
Joonis 8. Iseloomulik surnud aja piik kromatogrammil, punktiga märgitud ajaline väärtus, mis viitab surnud ajale.

3.1.5 Retentsioonifaktor

Retentsioonifaktor k näitab ajalist suhet, kui palju proov viibib statsionaarses ja mobiilses faasis, see arvutatakse retentsiooniaja ja surnud aja t_m kaudu (Valem (2)). Retentsioonifaktor väljendab aega, kui palju kauem viibib proov statsionaarses faasis selle asemel, et mobiilses faasis kolonn läbida. Mida suurem on retentsioonifaktor, seda kauem viibib proov statsionaarses faasis. Üldiselt on soovitav, et $k \geq 1$, aga vahemik, kus piigid on piisavalt hea lahutuvusega, need pole liiga lähedal surnud ajale ja retentsiooniaeg pole liiga pikk, on retentsioonifaktori väärtuste vahemikus $1 < k < 10$ [7]. **Joonis 9** kujutab Me-p ja Et-p piike võrreldes uratsiili iseloomustatud surnud aja piigiga. On näha, et suurem k väärtus tähendab kaugemal paiknemist surnud aja piigist. [3]

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

(2)

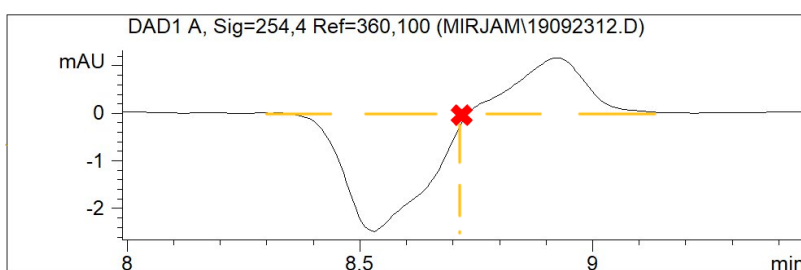


Joonis 9. Me-p ja Et-p retentsioonifaktorite väärtused ja paiknemine seoses surnud ajaga. Surnud aega iseloomustab markeraine uratsiili piik.

3.2 Surnud aeg ja selle määramine

Surnud ajaks (t_m) nimetatakse sellise aine kolonni läbimiseks kuluvat aega, mis ei seostu kolonni statsionaarse faasiga. Surnud ruumalaks (*hold-up volume*) (V_m) nimetatakse sellise aine elueerumiseks kuluvat mobiilse faasi ruumala, mis ei seostu statsionaarse faasiga. Surnud aja määramisega on võimalik uurida potentsiaalseid meetodilisi probleeme. Käesolevas töös määrati surnud aega kolme erineva meetodiga - baasijoonest häiritusest, markerainete abil ja arvutuslikult. [3,11]

Selleks, et surnud aega saaks määrata, peab sellele vastav piik olema eristatav, ehk proov ja eluent ei tohi olla sama koostisega. Seejuures ei tohi proov ja eluent olla sama koostisega, muidu pole surnud aja piik eristatav. John Dolan [11] soovib surnud aega määrata kromatogrammil kohas, kus piik tõuseb baasijoonest kõrgemale (**Joonis 10**), sest sealt on võimalik surnud aega tuvastada mugavamalt ja parema korratavusega, kui piigi maksimumide kaudu. [11]



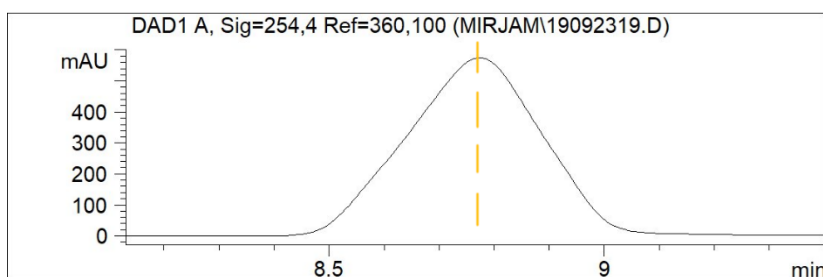
Joonis 10. Kromatogrammi uurimisel surnud aja tuvastamine. $t_m = 8,7$ min, $F_c = 0,2$ ml/min, $B\% = 80$, kolonni temperatuur 30 °C, süstiti 5 μ l solventi.

Esiteks määrati surnud aega kromatogrammidelt, millel oli eristatav surnud aja piik. Selleks tehti analüüs tühiprooviga, mille solventi koostis erines mobiilse faasi koostisest. Eelistati tühiproovi, et poleks muid segavaid piike. J. Dolani artikli järgi määrati surnud aeg

kromatogrammil kohast, kus piik hakkab baasijoonest üles poole tõusma [11]. **Joonis 10** kujutab suurendatud kromatogrammi, millel on punase ristiga märgitud koht, kus piik hakkab baasijoonest ülespoole tõusma. Just selle punkti juures x-teljel on määratud surnud aeg – antud kromatogrammil 8,7 minutit.

Paige R. Perry ja Jason W. Coym kasutasid surnud aja ja ruumala määramiseks mitmeid klassikalisi markereid: uratsiili, tioureat ja kaaliumnitraati kontsentratsiooniga 0,10 M ning kaaliumnitraati, deutereeritud vett kontsentratsiooniga 0,0001 M. Tegemist on nii polaarsete ainetega, et nad ei seostu pöördfaaskromatograafia statsionaarse faasiga ja elueeruvad surnud ajal. Perry ja Coym kasutasid analüüsiks klassikalisi vedelikkromatograafia instrumente, millel oli UV-Vis detektor, kolonnidena 10 cm pikkuseid ja 4,6 mm läbimõõduga, täidiseosakeste suurusega 5 μm C18 kolonne. Analüüse tehti erinevate orgaanilise aine sisalduste juures, voolukiirus oli 1,0 ml/min ja aine süstimiskogus oli 5 μl . Solvendi orgaanilise koostisosana kasutati nii metanooli kui ka atsetonitriili. Analüüdi suuremate kontsentratsioonide puhul kasutati lainepikkust 254 nm ja väiksemate puhul 230 nm. Selgus, et erinevad markerid andsid surnud aja ja ruumala määramisel küllaltki erinevaid t_m ja V_m väärtuseid, kuid kõige korratavamaid tulemusi andsid 0,1 M kontsentratsiooniga tiourea ja kaaliumnitraat, deutereeritud vesi ei osutunud sobivaks markeriks. [12]

Teiseks kasutati surnud aja tuvastamiseks polaarsete markereid - uratsiili ja tioureat. Need ained on nii polaarsed, et elueeruvad surnud ajaga samal ajal. Surnud ajaks loetakse markeri retentsiooniaeg. Polaarsete markerid analüüsiti nii erinevate B% kui ka voolukiiruste juures. Uratsiil ja tiourea andsid surnud aja väärtuseks kokkulangevad ajad. **Joonis 11** kujutab uratsiili piiki surnud aja määramiseks – antud kromatogrammil 8,7 minutit. Uratsiili ja tioureat kasutati surnud aegade määramiseks erinevate voolukiiruste ja eluendi orgaaniliste sisalduste juures.



Joonis 11. Uratsiili piik surnud aja tuvastamiseks. $t_m = 8,7$ min, $F_c = 0,2$ ml/min, B% = 80, kolonni temperatuur 30 °C, süstiti 5 μl ainet.

Kontrollimaks, kas kromatogrammilt saadud surnud aja (t_m) väärtus ei erine eeldatavast, on võimalik arvutada surnud aeg mobiilse faasi ruumala (V_m) kaudu. Valemi (3) kaudu saab välja

arvutada mobiilse faasi ruumala kolonnis. Kuna kolonn on silindrikujuline, siis on tegu silindri ruumala valemist 65 protsendi võtmisega. L on kolonni pikkus [mm] ja d_c kolonni diameeter [mm]. Valemis on tehtud eeldus, et tegu on läbivalt poorse kolonniga, kus V_m osakaal on umbes 65% kolonni ruumalast ja et umbes pool sellest on kolonniosakeste vahel ja ülejäänud täidiseosakeste poorides. Valem (4) kaudu saab leida ligikaudse surnud aja mobiilse faasi ruumala ja voolukiiruse (F_c [ml/min]) kaudu. Kuna valemite näol on tegemist suure lihtsustusega, siis on surnud aja leidmisel lubatud määramatus $\pm 10\%$. [11]

$$V_m = 0,65 \cdot \pi \cdot L \cdot \left(\frac{d_c}{2}\right)^2 / 1000 \quad (3)$$

$$t_m = V_m / F_c \quad (4)$$

Mõõdetud ja arvutatud surnud aegade oluline erinevus viitab probleemile kromatograafilises süsteemis (nt õhumull pumbas), seega saab surnud aega kasutada kui diagnostika tööriista. Kui arvutusliku ja kromatogrammilt leiduva surnud aja vahe on üle 20%, siis tuleb hakata otsima viga kromatograafilises süsteemis. Surnud aja leidmine ja selle korrektsuse hindamine on oluline ka retentsioonifaktori leidmisel, mis iseloomustab piikide kaugust surnud ajast. [11]

Kui surnud aeg on suurem kui arvutuslik, siis on tõenäoliselt voolukiirust valesti hinnatud. Võimalik, et instrumendis esineb lekkeid või mulle, või on probleemid seotud pumba ja selle klappidega. Põhjuseks võivad ka olla poori ja proovi molekuli vahelised hüdrofoobsed interaktsioonid. [11]

Kolmandaks, arvutati surnud aeg valemite (3), (4) kaudu. Baasijoone häirituse ja markerainete abil määrati surnud aeg samade parameetrite puhul, nende parameetritega saab surnud aja välja arvutada järgnevalt:

$$V_m = 0,68 \cdot \pi \cdot 152 \text{ mm} \cdot \left(\frac{4,6 \text{ mm}}{2}\right)^2 / 1000 = 1,718 \text{ ml}$$

$$t_m = \frac{1,718 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml/min}} = 8,6 \text{ min}$$

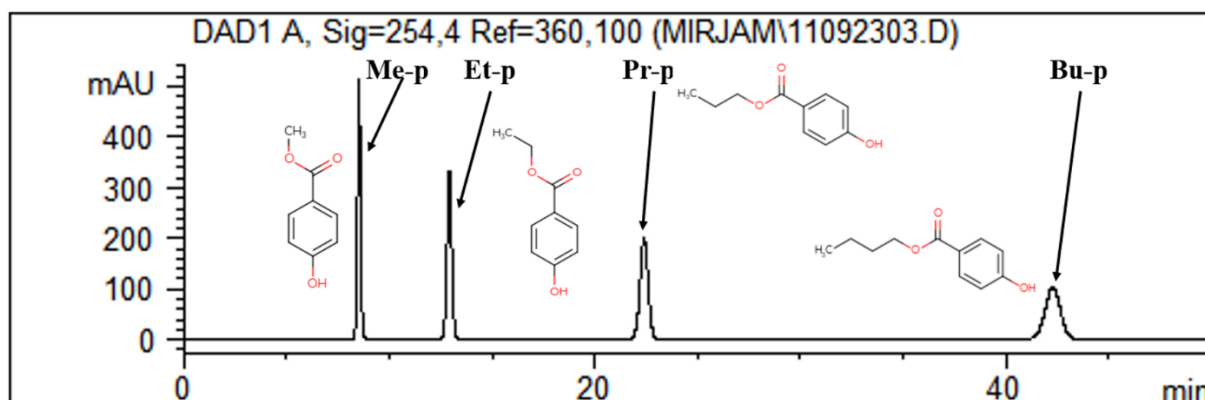
Kõigi kolme meetodi kaudu leitud surnud ajad on lähedaste väärtustega (**Tabel 3**), seega ei leitud antud meetodites süstemaatilist viga.

Tabel 3. Surnud aegade ajalised väärtused leitud kolme erineva meetodiga samade parameetrite puhul.

Baasijoone häiritus	Markerainete kasutamine	Arvutamine
$t_m = 8,7 \text{ min}$	$t_m = 8,7 \text{ min}$	$t_m = 8,6 \text{ min}$

3.3 Retentsiooni sõltuvus aine struktuurist

Kuna kasutati on pöördfaaskromatograafiat, siis on polaarsete ainete retentsiooniaeg väiksem kui vähempolaarsetel ainetel. Uuritavad parabeenid erinevad struktuuri poolest vähe, iga parabeeni puhul on alküülalhelal üks CH₂-fragment rohkem kui eelmisel (**Joonis 2**). Sellest lisasüsinikust piisab, et muuta aine vähem polaarseteks, seda iseloomustab retentsiooniaegade erinevus. Üks põhjustest, miks valiti analüüsiks just need ained, on iseloomustada, kui erinevalt ained käituvad, isegi kui nende struktuurid erinevad väga vähe. Tegemist on suhteliselt polaarsete ainetega, mis tähendab, et nende retentsiooniajad pöördfaaskromatograafias on lühemad kui mittepolaarsetel ainetel, mis viib lühemate analüüsideni. Antud analüüdid on suhteliselt tavalised ained ja nende käitumine kromatograafilises süsteemis on kergesti selgitatav, mistõttu on nende kaudu hea illustreerida erinevaid kromatograafilisi parameetreid ja seoseid.



Joonis 12. Parabeenide järjekord kromatogrammil. Ainete retentsiooniaegu ja kromatografeerimise tingimusi iseloomustab **Tabel 4**.

Joonis 12 iseloomustab parabeenide segu piikide järjekorda – metüül-, etüül-, propüül-, butüülparabeen, sama kromatogrammi retentsiooniaegu näitab **Tabel 4**. Selline piikide järjekord püsis kõikide analüüsideni. Piikide järjekorda kontrolliti eksperimentaalselt, tehes iga segus oleva parabeeniga ka eraldi analüüsi täpselt samade analüüsitingimustega ning veenduti, et retentsiooniajad vastavad segu analüüsi retentsiooniaegadele.

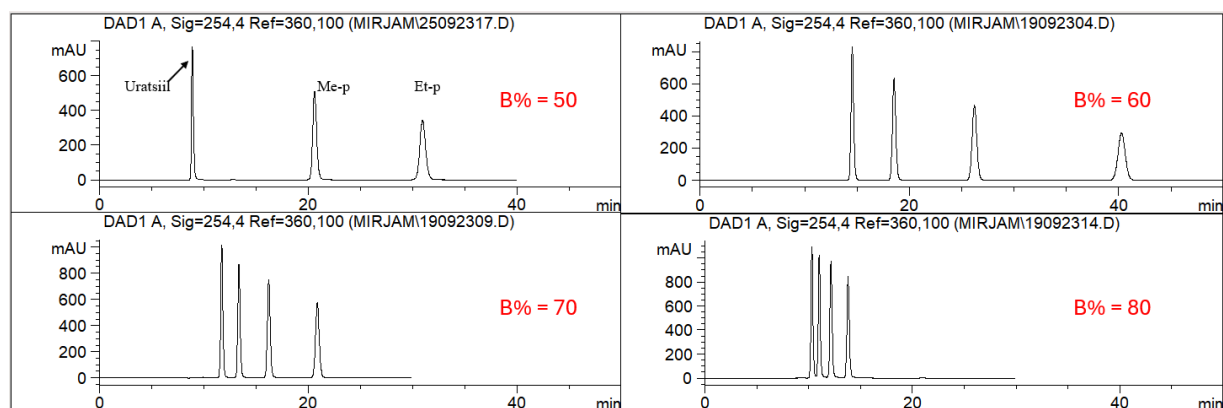
Tabel 4. Parabeenide retentsiooniajad. B% = 50, $F_c = 0,5$ ml/min, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 5 μ l.

Aine	Retentsiooniaeg [min]
Me-p	8,54
Et-p	12,93
Pr-p	22,40
Bu-p	42,28

3.4 Retentsiooni sõltuvus eluendi koostisest

3.4.1 Retentsiooniaja sõltuvus orgaanilise lisandi sisaldusest eluendis

Retentsiooniaja sõltuvuse B%-st uurimiseks tehti analüüse muutes parameetritest ainult eluendi orgaanilise komponendi sisaldust. Ülejäänud parameetrid olid $F_c = 0,2$ ml/min, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 5 μ l. **Joonis 13** näitab, kuidas retentsiooniaeg lüheneb eluendi orgaanilise komponendi sisalduse kasvamisel. **Tabel 5** näitab retentsiooniaegu, mis vastavad kromatogrammidel olevatele piikidele.



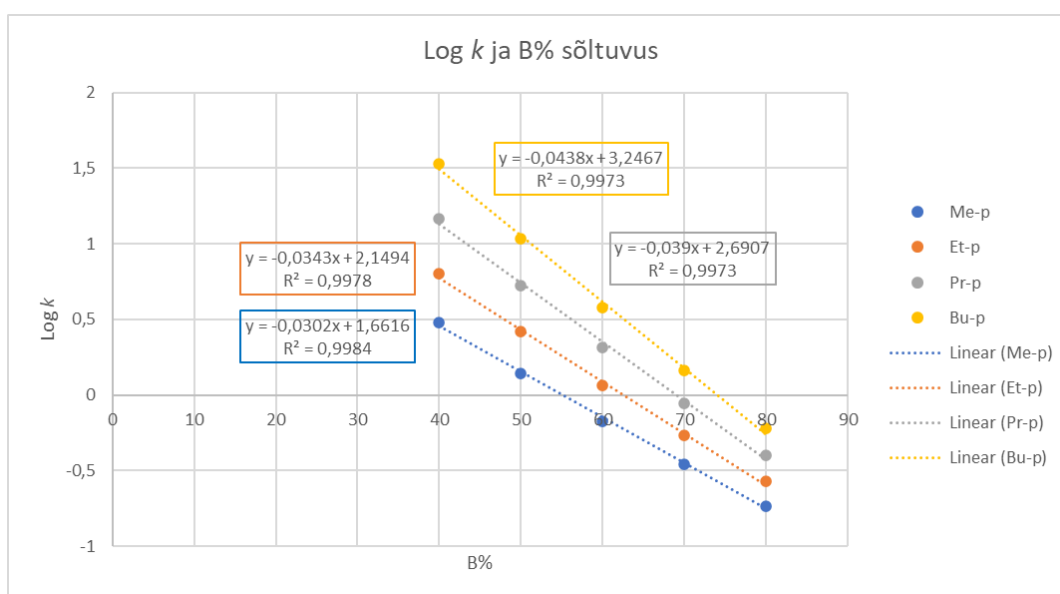
Joonis 13. Kromatogrammid iseloomustamaks retentsiooniaja kahanemist B% kasvamisel. B% on märgitud kromatogrammidel. Kromatogrammil B% = 50 on märgitud ainete nimetused, järgnevatel kromatogrammidel puudub uratsiili piik ja neli parabeeni on järjekorras Me-p, Et-p, Pr-p, Bu-p.

Tabel 5. Nelja parabeeni retentsiooniajad sõltuvalt eluendi orgaanilise komponendi sisaldusest.

	B%	50	60	70	80
t_r	Me-p	20,61	14,55	11,72	10,31
	Et-p	30,95	18,54	13,36	11,02
	Pr-p		26,21	16,22	12,15
	Bu-p		40,26	20,87	13,80

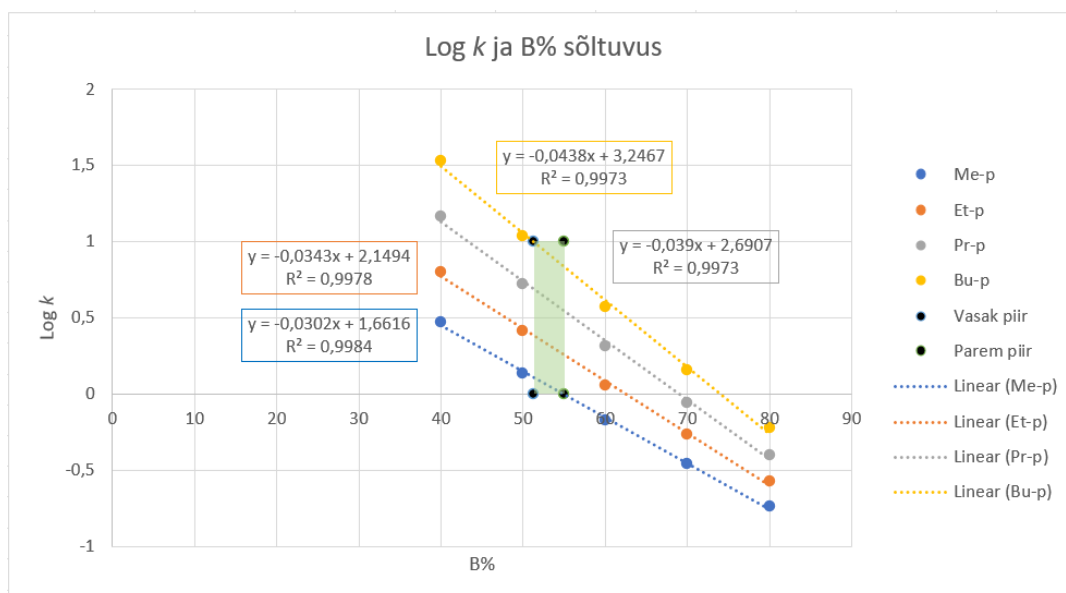
3.4.2 Retentsioonifaktori sõltuvus eluendi orgaanilise komponendi sisaldusest

Ideaalses olukorras peaks retentsioonifaktori (k) logaritm sõltuma lineaarselt orgaanilise komponendi sisaldusest eluendis (B%) [7]. Mida suurem on B%, seda väiksem on k , ehk seda vähem aega viibib proov statsionaarses faasis. **Joonis 14** iseloomustab kõigi nelja parabeeni $\log(k)$ ja B% sõltuvust, joonisel on toodud lineaarse regressiooni sirged koos vastavate võrranditega (vastava värviga parabeeni graafik ja võrrand on vastavuses) ja R^2 väärtus, mis kirjeldab lineaarset seost. Analüüsid tehti konstantse voolukiiruse (0,4 ml/min), süsti ruumala (3 μ l), kolonni temperatuuri (30 °C) juures, muutes B% sisaldust 40% - 80%. Korrelatsioonikoefitsiendi R^2 maksimaalne väärtus on 1 ja jooniselt on näha, et leitud R^2 väärtused on ligilähedased 1-ga, seega on iseloomustatud eeldatav sõltuvus.



Joonis 14. Nelja parabeeni retentsioonifaktori ja orgaanilise sisalduse sõltuvus.

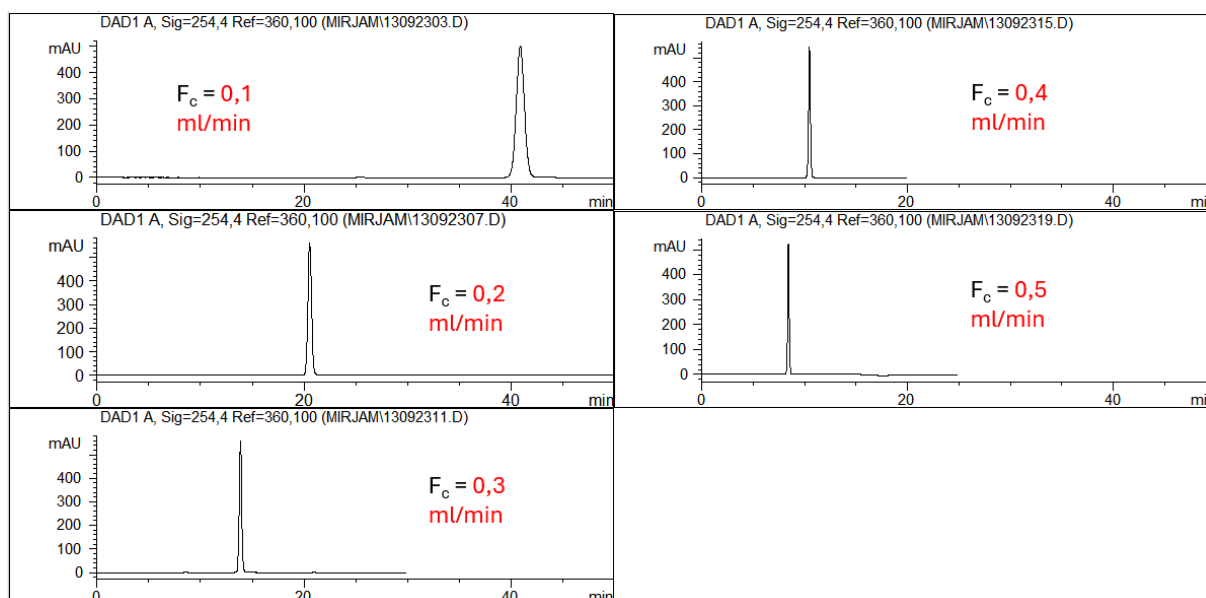
Optimaalset B% väärtust saab määrata kui leida B% vahemik, kus retentsioonifaktor jääb vahemikku $1 < k < 10$. Selleks kasutati rakendust GeoGebra [13]. $\log(k)$ ja B% sõltuvuse võrrandis pandi k võrduma 1 ja 10-ga ja saadi kaheksa vertikaalset graafikut, kaks iga parabeeni kohta. Leiti ühisosa, kus kõikide parabeenide kahe graafiku vahemikud kattuks. Oluline on leida optimaalne orgaaniline sisaldus samaaegselt kõikide ainete jaoks, et neid oleks võimalik korraga samade parameetritega analüüsida, vastasel juhul kulub analüüsideks mitmekordne aeg. Saadud ühisosas registreeriti x-teljega lõikumise punkti x koordinaadid, mis iseloomustavadki optimaalse orgaanilise sisalduse vahemikku. **Joonis 15** iseloomustab saadud pinda, mille vertikaalseteks piirideks on optimaalse orgaanilise sisalduse väärtused ja horisontaalseteks piirideks optimaalne k vahemik (roheline ristkülik).



Joonis 15. Nelja parabeeni retentsioonifaktori ja orgaanilise sisalduse sõltuvus koos illustreeritud optimaalse orgaanilise komponendi sisaldusega.

3.5 Retentsioonaja ja piigi laiuse sõltuvus eluendi voolukiirusest

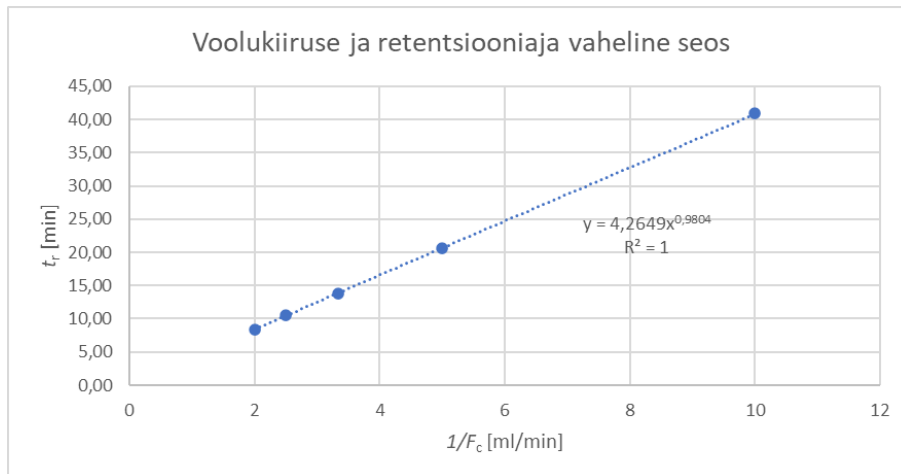
Selleks, et määrata retentsioonaja sõltuvust eluendi voolukiirusest, tehti analüüsid, muutes ainult voolukiirust. Ülejäänud parameetrid olid B% = 50, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 5 µl.



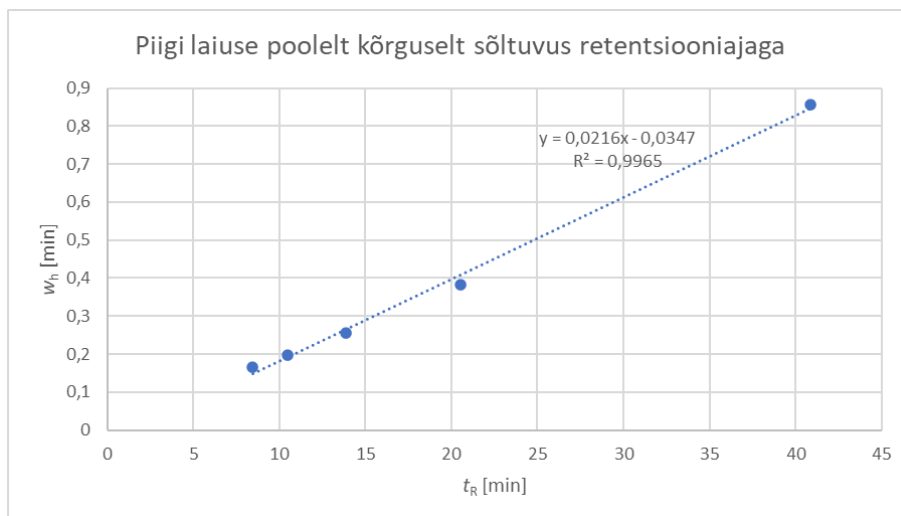
Joonis 16. Me-p retentsioonaja ja piigi laiuse sõltuvus voolukiirusest. Voolukiirused on toodud kromatogrammide peal.

Kromatogrammid, mis iseloomustavad retentsioonaja vähenemist voolukiiruse kasvamisel on toodud **Joonis 16**. Tabel 6 näitab kromatogrammidele vastavaid F_c , t_r ja w_h väärtuseid ja samade

väärtustega graafikuid iseloomustavad **Joonis 17** ja **Joonis 18**, on näha, et F_c ja t_r vahel on lineaarne seos ning F_c ja w_h vaheline seos on lähedane lineaarsele, aga mitte täielikult lineaarne.



Joonis 17. Graafik iseloomustamaks Me-p voolukiiruse ja retentsioonaja sõltuvust.



Joonis 18. Graafik iseloomustamaks Me-p voolukiiruse ja piigi laiuse poolelt kõrguselt sõltuvust.

Tabel 6. Me-p retentsioonaja ja piigi laiuse poolelt kõrguselt sõltuvus voolukiirusest.

F_c [ml/min]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
t_r [min]	40,90	20,55	13,87	10,48	8,44
w_h [min]	0,856	0,383	0,255	0,197	0,164

3.6 Van Deemteri võrrand

Koloni efektiivsus väljendab kromatograafilise süsteemi võimet anda kitsaid piike. See on üks kõige enam kasutatud parameeter koloni kirjeldamisel ning seda väljendatakse teoreetiliste taldrikute arvuna, tähis N_{eff} . Kolonnid, millel on suurem teoreetiliste taldrikute arv, on kõrgema

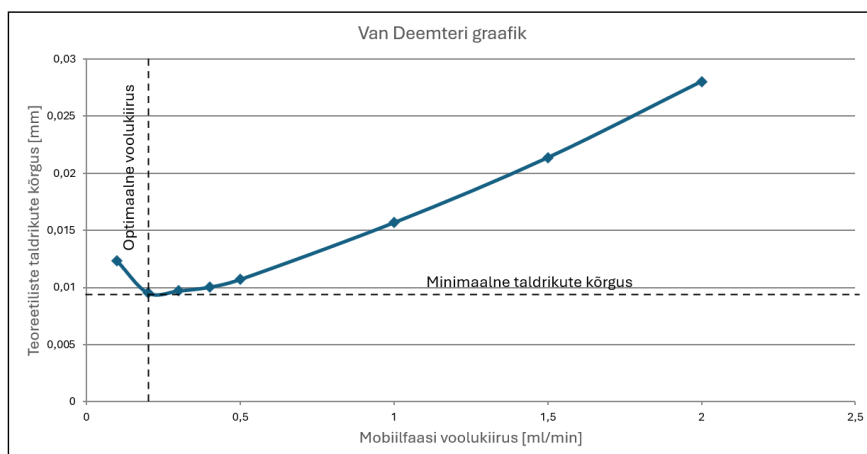
efektiivsusega. Sama retentsioonijaga piikide puhul on kitsamad need piigid, mis on mõõdetud efektiivsema kolonniga. Seega, kui kolonn on efektiivne, siis on vaja vähem vaeva näha selektiivsuse saavutamiseks, sest kitsamad piigid võimaldavad rohkem komponente lahutada. Kolonni efektiivsust mõjutavad kolonni parameetrid (diameeter, pikkus, statsionaarse faasi osakeste suurus), eluendi tüüp (eriti selle viskoossus) ja voolukiirus. Efektiivsust piigi laiusega baasjoonel kaudu saab arvutada Valemiga (5)(6). Baasjoonelt on keeruline täpselt määrata piigi laiust, seetõttu kasutatakse enamasti efektiivsuse arvutamiseks Valem (6). [7,14]

$$N_{eff} = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (5)$$

$$N_{eff} = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (6)$$

Van Deemteri võrrand väljendab efektiivsust kui eluendi lineaarse kiiruse või voolukiiruse funktsiooni, tähis H_{eff} . H_{eff} nimetatakse teoreetilise taldriku kõrguseks ja leitakse kui kolonni pikkus (L) jagatakse teoreetilise taldrikute arvu ehk efektiivsusega (Valem (7)). Eesmärk on saavutada võimalikult väike teoreetiliste taldrikute kõrgus, mida on kõige lihtsam saavutada väikeste kolonni osakeste suurusega, madala viskoossusega mobiilses faasis ja optimaalse eluendi voolukiirusega. Kui osakeste suurus kolonnis väheneb, siis optimaalne lineaarkiirus suureneb. Mobiilse lineaarse kiirus (u) väljendab statsionaarse faasiga mitte-interakteeruvate osakeste keskmist liikumiskiirust piki kolonni [3]. Mida väiksem on teoreetilise taldriku kõrgus, seda suurem on taldrikute arv konkreetse pikkusega kolonni puhul. Van Deemteri graafik võimaldab hinnata kolonnide efektiivsust ning graafiku kaudu saab leida optimaalse voolukiiruse konkreetsetele kromatografeerimise tingimustele. Just toodud meetodiga Van Deemteri graafikuid koostades iseloomustati optimaalse voolukiiruse leidmist. [14]

$$H_{eff} = L/N_{eff} \quad (7)$$



Joonis 19. Van Deemteri graafik. Optimaalne voolukiirus leitakse graafiku punktis, kus taldrikute kõrgus on minimaalne.

Teine võimalus Van Deemteri graafikut koostada on leida efektiivsus mobiilse faasi lineaarse liikumiskiiruse u [cm/s] ja kolme konstandi kaudu (Valem (8)). Konstant A väljendab Eddy difusiooni (mitu vooluteed) (Valem (10)), d_p on osakeste suurus kolonnis ja λ osakeste kuju), konstant B pikisuunalist difusiooni ja konstant C massiülekannet mobiilises ja statsionaarses faasis. Mobiilse faasi liikumiskiirus u leitakse jagades kolonni pikkuse surnud ajaga (Valem (9)). [14,15]

$$H_{eff} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (8)$$

$$u = L/t_m \quad (9)$$

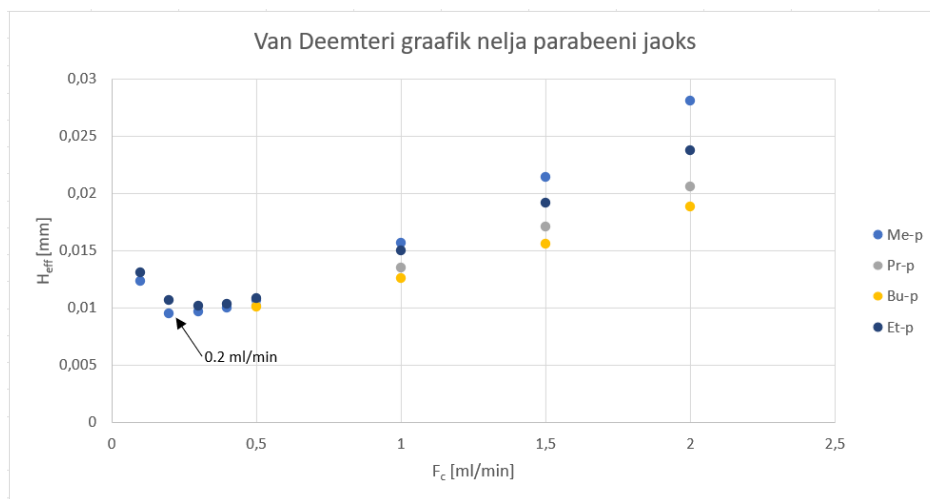
$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p \quad (10)$$

Optimaalsetel tingimustel kui kolonni osakeste suurus on 5 μm ja kolonni pikkus 15 cm, peaks N_{eff} väärtus olema vahemikus 10 000 – 12 000 [7].

Van Deemteri graafikud koostatakse, et määrata optimaalne voolukiirus. Esmalt tehti analüüsid konstantsete parameetritega ($B\% = 50$, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala (5 μl)), muutes ainult voolukiirust. Vajalike parameetritena pandi kirja aine retentsiooniaeg ja piigi laius poolal piigi kõrgusel ning nende andmetega arvutati välja teoreetiliste taldrikute arv (N_{eff}) ja kõrgus (H_{eff}). Van Deemteri graafikute koostamiseks kasutatakse võrrandeid (6) ja (7), sest nende võrrandite jaoks on eksperimentaalseid parameetreid lihtsam mõõta. Voolukiiruseid muudeti

vahemikus 0,1 ml/min – 2 ml/min. Madalamad voolukiirused oleks tähendanud liiga pikki retentsiooniaegu (0,1 ml/min voolukiiruse juures Me-p $t_r = 41$ min) ja kõrgemad voolukiirused olid piiritletud instrumendi tõttu (maksimaalne rõhk instrumendil 400 bar, kõrgema voolukiirusega oleks rõhk suurem olnud). Me-p ja Et-p puhul tehti mõõtmised kõikide voolukiirustega, Pr-p ja Bu-p puhul ainult vahemikus 0,5 ml/min – 2 ml/min, sest madalama voolukiiruse puhul oleks retentsiooniaeg olnud liiga pikk (0,5 ml/min voolukiiruse juures Bu-p $t_r = 42$ min). Veenduti et Pr-p ja Bu-p käituvad analoogselt Me-p ja Et-p, seda iseloomustab

Joonis 20.



Joonis 20. Van Deemteri graafik nelja parabeeni jaoks. Noolega on näidatud Me-p optimaalne voolukiirus 0,2 ml/min.

Joonis 20 kujutab nelja parabeeni Van Deemteri graafikuid. Optimaalne voolukiirus on graafikus kohas, kus teoreetiline taldrikute kõrgus on miinimumis. Me-p puhul optimaalne $F_c = 0,2$ ml/min, Et-p puhul optimaalne $F_c = 0,3$ ml/min. **Tabel 7** iseloomustab graafikule vastavaid arve. Saadud optimaalsetele voolukiirustele vastavad teoreetiliste taldrikute arvud on lähedased ka Snyder *et al.* õpikus välja toodud vahemikule (10 000 – 12 000) [7].

Tabel 7. Teoreetiliste taldrikute arvud ja kõrgused Van Deemteri graafikul.

F_c [ml/min]		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5	2,0
H_{eff} [μ m]	Me-p	12,3	9,5	9,7	10,0	10,7	15,7	21,4	28,0
	Et-p	13,1	10,6	10,2	10,4	10,9	15,0	19,2	23,8
	Pr-p					10,2	13,5	17,1	20,6
	Bu-p					10,1	12,6	15,6	18,8
N_{eff}	Me-p	12350	15977	15671	15164	14364	9697	7113	5421
	Et-p	11594	14276	14884	14662	14007	7922	6395	7922
	Pr-p					14880	11276	8909	7394
	Bu-p					15001	12048	9771	8086

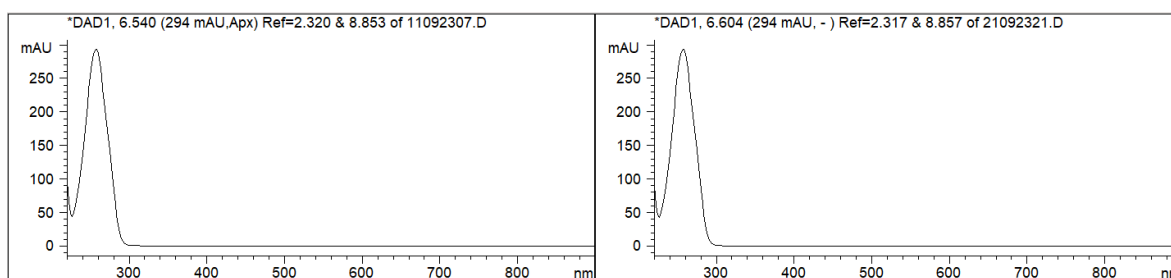
Eksperimentaalselt määratud optimaalse voolukiiruse korrektsust hinnati erinevate kordusmõõtmistega. Korduvad analüüsid tehti teistel päevadel, teise kolonniga, teise

instrumendiga, koos ja ilma eelkolonnita, teiste ainetega (vt Lisa 3). Ka kordusmõõtmistega saadi optimaalseks voolukiiruseks ligikaudu 0,2 ml/min.

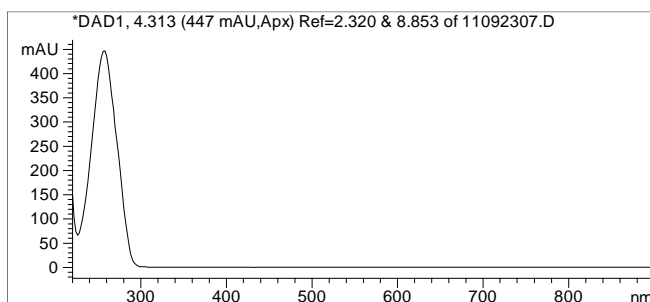
Snyder *et al.* toob enda õpikus välja, et kõrgrõhkvedelikkromatograafia kolonne kasutatakse tavaliselt kõrgema voolukiirusega kui on optimaalne, sest kasutades kolm korda suuremat voolukiirust kui on optimaalne voolukiirus, langeb N_{eff} väärtus vähe (u 20%), aga retentsiooniaeg langeb kolm korda ehk saab teostada palju lühemaid analüüse [4]. Seega, kui tutvuda analüüsidega, kus kasutatakse voolukiiruseks 1,0 ml/min või enam, siis eelistatakse voolukiiruse puhul ajalist optimaalsust, mitte efektiivset.

3.7 Kvalitatiivne kromatograafiline analüüs

Kvalitatiivsuse all mõistetakse kromatograafias aine tuvastamisega seotud tulemusi, seega piigi ja sellele vastava aine kokku viimist. Selleks kasutati kahte moodust. Esiteks uuriti UV spektreid. Kuna tegemist on väga sarnaste struktuuridega ainetega (**Joonis 2**), siis saab parabeenide järgi hästi näitlikustada, kuidas UV spektri uurimine ei pruugi olla hea meetod kvalitatiivseks analüüsiks, sest kõikide parabeenide spektrid olid liiga sarnased. **Joonis 21** iseloomustab, kuidas nii segus kui ka üksikainena on Et-p UV spektrid väga sarnased, seega nende kaudu ei saa tõestada kahe aine erinevust. **Joonis 22** iseloomustab Me-p UV spektrit, mis on analüüsitud parabeenide seguga koos, on näha kuidas Me-p ja Et-p UV spektrid on väga sarnased, seega ei ole võimalik ainult UV spektrite kaudu aineid identifitseerida.

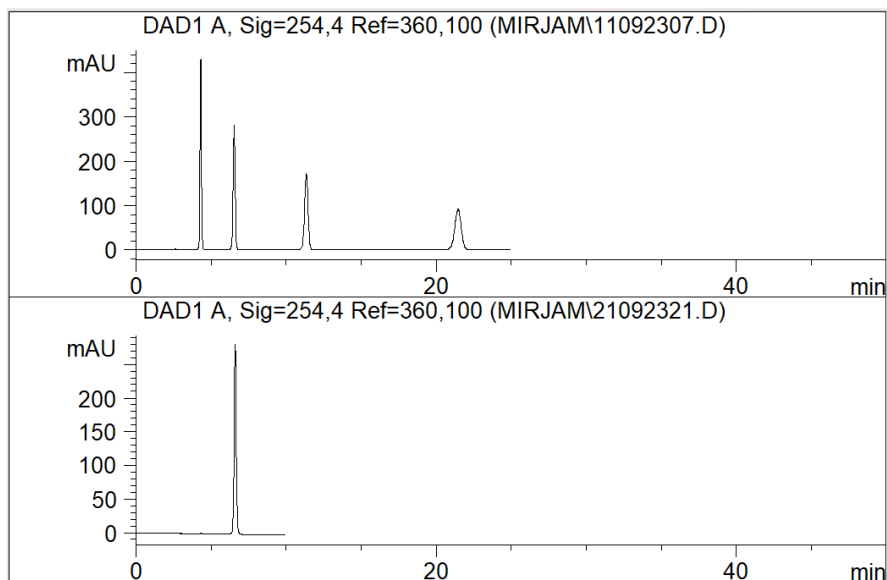


Joonis 21. Et-p UV spektrid. Ülemine piik on võetud segu analüüsist, alumine üksiku Et-p analüüsist.



Joonis 22. Me-p UV spekter, võetud segu analüüsist.

Teiseks võrreldi üksiku aine retentsiooniaegu segus olevate ainete retentsiooniaegadega. Teise meetodi puhul tehti analüüsid üksiku parabeeniga kui referentsainega ja siis kõikide parabeenide seguga, muutmata ühtegi muud parameetrit peale proovi koostise. Seejärel võrreldi retentsiooniaegu nii üksikutel parabeenidel kui segus olevatel ning veenduti nende klappimises. Seega võis kindel olla, et ained on õigesti tuvastatud.



Joonis 23. Üleval kromatogramm kõigi nelja parabeeniga. All kromatogramm etüülparabeeniga. Mõlemal juhul $F_c = 1,0$ ml/min, B% = 50, kolonni temperatuur 30 °C, sisestatud ainete ruumala 5 μ l.

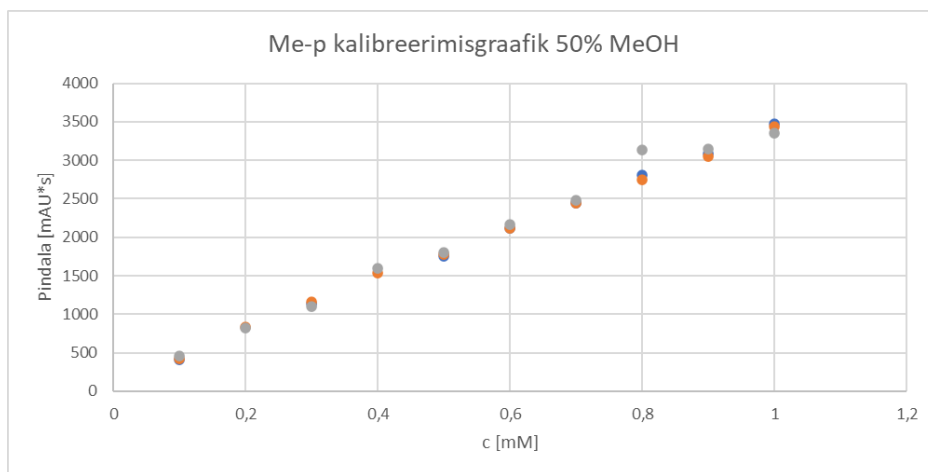
Tabel 8. Segus olevate parabeenide ja üksiku Et-p retentsiooniajad. $F_c = 1,0$ ml/min, B% = 50, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 5 μ l.

t_r [min]	Me-p segu	4,31
	Et-p segu	6,54
	Pr-p segu	11,35
	Bu-p segu	21,45
	Et-p üksik	6,61

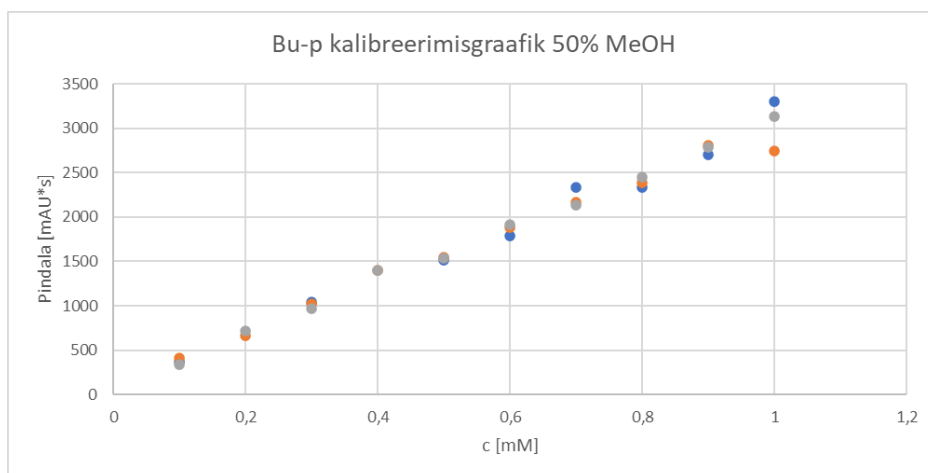
Joonis 23 kujutab nii kromatogrammi, kus on prooviks segu kõigist neljast parabeenist kui ka kromatogrammi, kus on prooviks ainult üksik Et-p. Mõlemad kromatogramm on saadud, tehes analüüse samade parameetrite juures. **Tabel 8** kujutab mõlemal kromatogrammil toodud ainete retentsiooniaegu ning on näha, et Et-p retentsioonieg ei erine üle 0,1 min, seega on tuvastatud ainete klappivus. Olemas on andmed, mis võimaldavad retentsiooniaja järgi ainete tuvastamist demonstreerida kõikide parabeenide korral.

3.8 Kvantitatiivne kromatograafiline analüüs

Kvantitatiivsuse all mõistetakse kromatograafias aine kogusega seotud tulemusi. Piigi suurus sõltub kromatograafi sisestatud ainehulgast. Piigi suurust võib kirjeldada nii piigi kõrguse kui ka pindalaga. Sisestatud ainehulka võib kirjeldada nii süsti ruumalaga kui ka aine kontsentratsiooniga. Piigi pindala sõltuvus aine kontsentratsioonist on tihedalt kasutatav kalibreerimisgraafikute koostamiseks. Kalibreerimisgraafiku abil saab määrata analüüdi kontsentratsiooni tundmatus proovis. Piigi pindala ja süstimiskoguse sõltuvusega kalibreerimisgraafikuid reeglina ei koostata, sest instrumendi süstimisruumala pole piisavalt täpne. Sama ruumala sisestamise korratavus on seevastu väga hea.



Joonis 24. Me-p kalibreerimisgraafik. B% = 50, Fc = 0,4 ml/min, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 3 μ l. Kujutatud on kolme korduskatset kalibreerimisgraafiku koostamisel (iga värv vastab eraldi mõõtmiseeriale).



Joonis 25. Bu-p kalibreerimisgraafik. B% = 50, Fc = 0,4 ml/min, kolonni temperatuur 30 °C, süsti ruumala 3 μ l. Kujutatud on kolme korduskatset kalibreerimisgraafiku koostamisel (iga värv vastab eraldi mõõtmiseeriale).

Joonis 24 ja **Joonis 25** kujutavad vastavalt Me-p ja Bu-p kalibreerimisgraafikuid. Aine kontsentratsioonid on muudetud vahemikus 0,1 – 1 mM ning registreeritud on vastavad piigi pindalad. Iga punkt graafikul vastab konkreetsele mõõtmistulemusele, graafikult on näha, kuidas kõik kolm eraldi mõõtmistulemust langevad reeglina kokku ning tegu on lineaarse seosega. Üksikud hälbid punktid ei kordu mõlema joonise peal, seega tehti järeldus, et tegu pole süstemaatilise, vaid juhusliku veaga, mida võis põhjustada instrumendi eksimus.

3.9 FAIR andmete põhjal kromatogrammide avaldamise mudel

Selleks, et teadustööd oleks võimalikult tulemuslikud, on ülioluline metaandmete korrektne ja täielik salvestamine ja kasutamine. Yano *et al.* kirjeldavad oma artiklis olulisi uuendusi, mida keemia ja andmeteaduse valdkonnad vajaksid ning nende kõige aluseks on korrektne (meta)andmete kogumine ja töötlemine. Oluliste uuendustena tuuakse välja:

1. Tugevamad sidemed keemikute, kes analüüsi teevad, ja andmeteadlaste, kes tulemusi analüüsivad, vahel, et saadud tulemused ja andmestikud maksimaalselt ära kasutada ja leida innovatiivseid lahendusi.
2. Keemia-spetsiifiliste andmesüsteemide arendamine, mis tagaks saadud keemiliste (meta)andmete efektiivsema analüüsi.
3. Keemiaeksperimentide ühtne kavandamine keemikute ja andmeteadlaste poolt, et teadustöö tulemusi võimalikult efektiivselt kasutada.
4. Luua (meta)andmete võrgustik keemia teadustööde jaoks, et tuua ühte kohta kokku ja siduda kõik keemia valdkonnaga seotud (meta)andmed. [16]

Üks olulisemaid eeldusi andmestike taaskasutamiseks ja paremaks haldamiseks tulevikus on metaandmete korrektne ja ideaalis ühtsel viisil salvestamine. Metaandmeid on tohtu hulk ning olenevalt olukorrast ja vaatepunktist võib igäiks neist olla oluline, seega on tähtis, et võimalikult suur osa neist saaks edasi antud. Kui kromatograafia andmefailid võetakse otse vastavast tarkvarast, siis on üks osa metaandmetest seal juba salvestatud, näiteks eluendi voolukiirus, orgaanilise lisandi sisaldus. Seega on metaandmete saamiseks kaks võimalust: 1) tuleb tarkvarast, 2) kasutaja sisestab. Kasutajal peab olema võimalus tarkvarast tulnud metaandmeid ka muuta. See on vajalik olukordades, kus tarkvaras oli vale info (nt tarkvaras oli tegelikult erinev kolonni nimetus). Arvestades, et metaandmeid võib kromatograafias olla väga palju, tuleks need kategoriseerida:

1. Primaarsed (hädavajalikud ja lihtsasti leitavad)

- a. Eluendi koostis
 - b. Eluendi voolukiirus
 - c. Kolonn ja selle mõõtmised
 - d. Kolonni temperatuur
 - e. Süstitava proovi kogus jne
2. Sekundaarsed (olulised, kuid mitte hädavajalikud)
 - a. Detektori mõõteraku ruumala ja optilise tee pikkus
 - b. Gradiendi seguri ruumala
 - c. Eelkolonni olemasolu jne
 3. Kasutaja defineeritud (pole hädavajalikud, kuid siiski olenevalt kontekstist olulised)
 - a. Töö teostaja
 - b. Töö teostamise kuupäev
 - c. Mõni ebestandardne seade süsteemis jne

Nende kategooriate järgi saab metaandmeid prioriseerida ja jälgida, et kõige olulisemad oleks andmestikus kindlasti olemas. Ideaalis salvestatakse andmestikud taolisesse süsteemi, kus on alati võimalik metaandmeid juurde lisada ja korrigeerida.

3.10 Veebilehe mudel

FAIR andmete ühildatavuse printsiibi alla kuulub nõue, et kõik andmed oleks avaldatud võimalikult rahvusvahelises ja laialt mõistetavas keeles [8]. Seetõttu tehti ka veebilehe mudel inglise keeles kui ühes laialdasemalt kasutatavas keeles maailmas. Veebilehe mudel koostati Excelis ning seal kujutati veebilehel olevaid kategooriaid, nende peale klõpsates avanevaid valikuid ja (alam)alamkategooriaid. Veebilehe mudel tehti kahe olukorra jaoks – kui vaataja pole sisse loginud (**Joonis 26**) ja kui ta on sisse loginud (**Joonis 27**). Nagu kujutab **Joonis 26**, siis saavad kasutajad ilma sisse logimata tutvuda avalike andmestikega, neid jagada ja sorteerida soovitatavate parameetrite järgi, tutvuda veebilehe ja FAIR-i ajaloo, printsiipide ja eesmärkidega, aga ka laiemalt kromatograafiaga, samuti leida allikaid, kust teema kohta lähemalt uurida. Veel on võimalik otsida abi veebilehte puudutavate küsimuste osas, tutvuda veebilehel kasutatava terminoloogiaga ning otsida avalikke andmestikke püsiva identifikaatori, autori või märksõna kaudu. Samuti saab külastaja luua endale kasutajakonto pannes kirja enda nime, asutuse, meiliaadressi ning määrates parooli.

Home	Public Datasets	About Us	About FAIR	About Chromatography
	Sort by	History	https://www.go-fair.org/	Basics
	Recently added	Documentation	DOI: 10.1038/sdata.2016.18	How to read chromatograms
	Date of publication	Goals	How to go FAIR?	Where to learn more
	Which instrument was used		Why go FAIR?	
	Author			
	Country of origin			
	What was analyzed			
	Keywords in (meta)data			
	View			
	Share			
Help	Search	email address:	password:	Sign Up
		Login		
FAQ	Search by persistent identifier			First Name
Contact	Search by author			Family Name
Used and suggested vocabulary and terms	Search by keyword			Organization
Report				Email
				Password
				Re-enter password
				Two factor authentication

Joonis 26. Veebilehe vaade (paigutatud kahele reale), kui kasutaja ei ole sisse loginud.

Kui kasutaja on sisse loginud, siis näeb ta vaadet, mida kujutab **Joonis 27**, nüüd on kasutajal palju rohkem valikuid. Analoogselt saab vaadata avalikke andmestikke, kuid nüüd on neid võimalik ka sobiva autentimise korral muuta. Muutes saab nii juurde lisada üksikuid andmeid kui ka kokku liita terveid andmestikke. Seejärel on võimalik andmestikke kas ainult enda jaoks salvestada või salvestada ja avalikustada. Sisse logides on rohkem valikuid ka andmestike jagamisel – on võimalik jagada nii terveid kui osalisi andmestikke, nii lingi kui ka identifikaatori kaudu või jagades otse teisele kasutajale. Lisatud on kategooria nimega „Autentimist vajavad andmestikud“, ka seal on võimalik andmestikke vaadata, muuta ja jagada, kuid selleks peavad olema esmalt täidetud kõik autentimisnõuded, mis on iga andmestiku puhul selgesõnaliselt välja toodud. Eraldi kategooria on enda andmestike loomiseks, seal saab valida, kas lisada juba õiges formaadis fail või konverteerida see ümber. Ideaalis oleks kõik veebilehele lisatavad andmestikud samas formaadis, et kogu andmestik oleks lihtsamalt muudetav masinloetavaks ja kogu informatsiooni otsimine, tabelite ja graafikute koostamine oleks automatiseeritud. Samuti saab valida juba eksisteerivaid andmestikke ning neid muuta.

Järgmine suur kategooria sisaldab teiste kategooriate all salvestatud andmestikke. Seal on võimalik andmestikke veel vaadata, muuta ja jagada, siis on kõik andmestikud, millega kasutaja kokku puutub, ühes kohas koos. Nagu sisse logimata vaates, saab endiselt lugeda veebilehe ja

FAIR-i ja kromatograafia kohta, otsida abi ning erinevaid andmestikke, kuid nüüd on võimalus otsida ka andmestike seast, millega kasutaja on varasemalt kokku puutunud.

Home	Public Datasets	Authenticated Datasets	Create Dataset	Stored Datasets
	Sort by	Authentication conditions	Load new dataset	View
	Recently added	If not satisfied then no proceeding	Already correct file format	Modify
	Date of publication	If satisfied then proceed to next points	Convert to correct format	Suggested modifications
	Which instrument was used	Sort by	Select dataset	Make dataset FAIR
	Type of spectra	Recently added	From stored datasets	Not enough meta(data)
	Country of origin	Date of publication	From public datasets	Add (meta)data to existing dataset
	What was analyzed	Which instrument was used	From authenticated datasets	Merge datasets
	Author	Type of spectra	(needs authentication)	Save updates
	Keywords in (meta)data	Country of origin	Save dataset	Save and publish
	View	What was analyzed	Add name	Share
	Modify	Author	Add persistent identifier	To existing user
	Authentication conditions	Keywords in (meta)data	Add data usage license	Copy a link
	Add (meta)data to existing dataset	View		Share partial dataset
	Merge datasets	Modify		Only persistent identifier
	Save updates	Authentication conditions		
	Save and publish	Add (meta)data to existing dataset		
	Share	Merge datasets		
	To existing user	Save updates		
	Copy a link	Save and publish		
	Share partial dataset	Share		
	Only persistent identifier	To existing user (needs authentication)		
		Copy a link (needs authentication)		
		Share partial dataset		
		Only persistent identifier		
About Us	About FAIR	About Chromatography	Help	Search
				Logged in as: ...
				Log out
History	https://www.go-fair.org/	Basics	FAQ	Search by persistent identifier
Documentation	DOI: 10.1038/sdata.2016.18	How to read chromatograms	Contact	Search by author
Goals	How to go FAIR?	Where to learn more	Used and suggested vocabulary and terms	Search by keyword
	Why go FAIR?		Report	Search my previous datasets
				Previously viewed
				Previously modified
				Previously created

Joonis 27. Veebilehe vaade (paigutatud kahele real), kui kasutaja on sisse loginud.

Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli genereerida kromatogramme ja andmestikke kromatograafia õpetamise jaoks. Selleks tehti palju erinevaid analüüse, muutes instrumendi voolukiirust, orgaanilise aine sisaldust eluendis, analüüsi pikkust, süstitava proovi ruumala, määrati surnud aeg mitmel erineval meetodil. Teine töö eesmärk on kirjeldada FAIR andmete põhimõtteid ja nende olulisust vedelikkromatograafilise analüüsi kontekstis ning luua veebilehe mudel, mis võimaldab kromatograafilisi andmestikke FAIR põhimõtteid järgides avalikustada, vaadata, ja muuta.

Töö käigus registreeriti üle 500 kromatogrammi kuue erineva aine ning nende segudega. Nende kromatogrammide abil selgitati kromatograafia mõisteid ja nähtusi. Koostati andmestikud, mis näitavad, et instrumendi voolukiiruse tõstmine muudab ainete retentsiooniajad palju lühemaks ning voolukiiruse tõstmisega muutuvad piigid kitsamateks. Demonstreeriti, kuidas leida optimaalne voolukiirus Van Deemteri graafikute abil. Näidati eluendi orgaanilise komponendi sisalduse muutmise mõju retentsiooniajale ja retentsioonifaktorile ning optimaalse eluendi koostise leidmist. Surnud aja määramist illustreeriti kokku kolmel erineval meetodil ning analüüsiti saadud tulemusi. Toodi välja kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsi võimalused ning selgitati, kuidas mõlemat analüüsi teostada. Tehti selgeks FAIR põhimõtete sisu ning nende vajalikkus. Loodi veebilehe mudel, mis iseloomustab FAIR-i printsiipide põhjal kromatograafiliste andmete vaatamist, üles laadimist ning modifitseerimist.

Tulevikus tuleb populariseerida kõikide katseandmete avaldamist FAIR põhimõtetele vastavalt. On hädavajalik taaskasutada katseandmeid ning luua mahukas andmebaas kromatograafilistest andmetest avalikkusele kasutamiseks.

Summary

The aim of the work was to generate chromatograms and datasets for teaching chromatography. For this, many different analyses were performed by changing the flow rate of the instrument, the organic percentage in the eluent, the length of the analysis, the volume of the injected sample, the dead time was determined by several different methods. The second goal of the work is to describe the principles of FAIR data and their importance in the context of liquid chromatographic analysis, and to create a web page model that allows chromatographic datasets to be published, viewed, and modified in accordance with the FAIR principles.

During the work, more than 500 chromatograms were generated with six different substances and their mixtures. With those chromatograms the concepts and phenomena of chromatography were explained. Datasets were compiled that show that increasing the flow rate of the instrument makes the retention times of the substances much lower, and that the peaks become narrower as the flow rate is increased. It was demonstrated, how to find the optimum flow rate using Van Deemter plots. The effect of changing the organic percentage in the eluent on the retention time and the retention factor and finding the optimal organic percentage was shown. Dead time determination was illustrated by three different methods and the obtained results were analysed. The possibilities of qualitative and quantitative analysis were pointed out and it was explained how to perform both analyses. The content of the FAIR principles and their necessity were made clear. A website model was created that characterizes the viewing, uploading and modification of chromatographic data based on FAIR principles.

In the future, the publication of all experimental data in accordance with FAIR principles must be popularized. It is crucial to reuse experiment data and create a large database of chromatographic data for public use.

Kasutatud kirjandus

1. C. Today, What Are the Most Common Applications of HPLC?, *Chromatogr. Today*. (n.d.).
2. A. Jacobsen, R. de Miranda Azevedo, N. Juty, D. Batista, S. Coles, R. Cornet, M. Courtot, M. Crosas, M. Dumontier, C.T. Evelo, C. Goble, G. Guizzardi, K.K. Hansen, A. Hasnain, K. Hettne, J. Heringa, R.W.W. Hooft, M. Imming, K.G. Jeffery, R. Kaliyaperumal, M.G. Kersloot, C.R. Kirkpatrick, T. Kuhn, I. Labastida, B. Magagna, P. McQuilton, N. Meyers, A. Montesanti, M. van Reisen, P. Rocca-Serra, R. Pergl, S.-A. Sansone, L.O.B. da Silva Santos, J. Schneider, G. Strawn, M. Thompson, A. Waagmeester, T. Weigel, M.D. Wilkinson, E.L. Willighagen, P. Wittenburg, M. Roos, B. Mons, E. Schultes, FAIR Principles: Interpretations and Implementation Considerations, *Data Intell.* 2 (2020) 10–29.
3. D.B. Hibbert, ed., *Separation in Analytical Chemistry*, in: *Compend. Terminol. Anal. Chem.*, 4th ed., The Royal Society of Chemistry, 2023: pp. 154–189.
4. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 1st ed., Wiley, 2009.
5. J. Dolan, Retention Time Drift—A Case Study, *LCGC N. Am.* 34 (2016) 254–261.
6. J. Dolan, Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity, *LCGC N. Am.* 35 (2017) 22–28.
7. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 1st ed., Wiley, 1997.
8. M.D. Wilkinson, M. Dumontier, I.J. Aalbersberg, G. Appleton, M. Axton, A. Baak, N. Blomberg, J.-W. Boiten, L.B. Da Silva Santos, P.E. Bourne, J. Bouwman, A.J. Brookes, T. Clark, M. Crosas, I. Dillo, O. Dumon, S. Edmunds, C.T. Evelo, R. Finkers, A. Gonzalez-Beltran, A.J.G. Gray, P. Groth, C. Goble, J.S. Grethe, J. Heringa, P.A.C. 'T Hoen, R. Hooft, T. Kuhn, R. Kok, J. Kok, S.J. Lusher, M.E. Martone, A. Mons, A.L. Packer, B. Persson, P. Rocca-Serra, M. Roos, R. Van Schaik, S.-A. Sansone, E. Schultes, T. Sengstag, T. Slater, G. Strawn, M.A. Swertz, M. Thompson, J. Van Der Lei, E. Van Mulligen, J. Velterop, A. Waagmeester, P. Wittenburg, K. Wolstencroft, J. Zhao, B. Mons, The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship, *Sci. Data.* 3 (2016) 160018.
9. D. Solle, Be FAIR to your data, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3961–3965.
10. Commission implementing regulation (EU) 2021/808, (2021).
11. J. Dolan, Column Dead Time as a Diagnostic Tool, *LCGC N. Am.* 32 (2014) 24–29.
12. P.R. Perry, J.W. Coym, Comparison of common mobile-phase volume markers with polar-group-containing reversed-phase stationary phases, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2310–2315.
13. GeoGebra - the world's favorite, free math tools used by over 100 million students and teachers, (n.d.).
14. R. Sankar, Fundamental Chromatographic Parameters, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 55 (2020) 46–50.
15. J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
16. J. Yano, K.J. Gaffney, J. Gregoire, L. Hung, A. Ourmazd, J. Schrier, J.A. Sethian, F.M. Toma, The case for data science in experimental chemistry: examples and recommendations, *Nat. Rev. Chem.* 6 (2022) 357–370.

Lisa 1. Põhimõisted

Kõik põhimõisted on defineeritud Hibberti terminoloogia õpiku kaudu [3].

Retentsiooniaeg (t_r) – aeg proovi sisestamise ja huvipakkuva aine piigi maksimumi tekkimise vahel.

Kromatograafiline baasijoon – kromatogrammi osa, mis esitab detektori vastust hetkel, kus ainult mobiilne faas elueerub kolonnist.

Kromatograafiline piik – kromatograafi osa, mis esitab detektori vastust kui üks või mitu komponenti kolonnist elueeruvad.

Kolonn (kromatograafias) – toru, mille sees on statsionaarne faas ja läbi mille liigub mobiilne faas.

Kromatogramm – graafiline või muusugune detektori vastuse esitus elueerunud ruumala või aja suhtes.

Isokraatiline meetod – kromatograafia meetod, kus ühe elueerimise vältel mobiilse faasi kontsentratsioon ei muutu.

Mobiilse faasi liikumiskiirus (u) – mobiilse faasi lineaarkiirus, mida mõõdetakse risti kolonni läbilõikega voolu liikumise suunas.

Piigi kõrgus – vahemaa piigi maksimumi ja baasijoonel vahel, mõõdetakse paralleelselt detektori vastust ilmestava teljega.

Piigi laius baasijoonel (w_b) – piigi laius baasijoonel, mida mõõdetakse piigi puutujate ja baasijoonel lõikumispunktide vahelt.

Piigi laius poolelt kõrguselt (w_h) – piigi laius poolelt piigi kõrguselt, mida mõõdetakse mõlema piigi küljega lõikumispunkti vahelt.

Voolukiirus (F_c) – mobiilse faasi liikumise kiirus läbi kolonni.

Elueerumine – komponendi kolonnist välja voolutamine.

Surnud aeg (t_m) (*hold-up time*) – aeg, mis on vajalik statsionaarse faasiga mitteseostuva komponendi elueerimiseks.

Surnud ruumala (*hold-up volume*) (V_m) – sellise aine elueerimiseks kuluv mobiilse faasi ruumala, mis ei seostu statsionaarse faasiga.

Lisa 2. FAIR-i 15 printsiipi

FAIR andmete märksõnad leitavuse kättesaadavus, ühildatavus ja taaskasutusvõime on täpsemalt defineeritud 15 printsiibiga.

Leitavuse märksõna alla kuulub neli printsiipi, mis on välja toodud selgitustega:

1. (Meta)andmetele määratakse globaalselt unikaalne ja püsiv identifikaator.
 - a. Püsiva identifikaatori all mõistetakse kindlat koodi, mille kaudu saab (meta)andmed jäädavalt ja stabiilselt tuvastada. See on standardne moodus metaandmete otsimiseks, mille kaudu on võimalik ka juurdekuuluvad andmed leida. Antud identifikaator viitab ainult ühele konkreetsele allikale. Näiteks DOI – digitaalobjekti identifikaator (*digital object identifier*), saab kasutada konkreetse artikli leidmiseks, kus kirjeldati analüüsitulemusi.
2. Andmeid kirjeldatakse rohkete metaandmetega.
3. Metaandmed sisaldavad selgesõnaliselt identifikaatorit, mis kuulub kirjeldatavate andmete juurde.
 - a. Tihti hoiustatakse metaandmeid oma andmetest eraldi, kuid on oluline, et need suudetaks omavahel kokku viia.
4. (Meta)andmed on registreeritud või indekseeritud viisil, kuidas neid on võimalik hõlpsalt leida. [2,8]

Kättesaadavuse märksõna alla kuulub neli printsiipi, mis on välja toodud selgitustega:

5. (Meta)andmed on leitavad nende identifikaatori kaudu, kasutades standardiseeritud protokollid (mehhanismi).
6. Andmetele peab ligi pääsema klassikaliste otsingumeetoditega, ideaalis automaatse masinotsimisega. Protokoll on avatud, tasuta ja universaalselt rakendatav.
 - a. Kõikidel inimestel ja masinatel peaks olema ligipääs vähemalt metaandmetele. Protokollid, mille aluseks on võrguligipääs (World-Wide Web), näiteks HTTP kaudu, on üks näide avatud, tasuta ja universaalselt rakendatavast süsteemist.
7. Protokoll võimaldab vajadusel autentimist ja autoriseerimist.
 - a. FAIR ei tähenda, et andmed oleksid kõigile ilmtingimata avatud. Kõikide andmete ligipääsutingimused peavad olema üheselt välja toodud, kõikidele andmetele ei saa olla igäihel ligipääsu. Erandid on andmekogudega, mis on varjatud eetilistel, legaalsel, usulistel vms põhjustel.

8. Metaandmed on kättesaadavad isegi siis, kui andmeid pole enam saadaval. [2,8]

Ühildatavuse aluspõhimõtte alla kuulub kolm printsiipi, mis on välja toodud selgitustega:

9. (Meta)andmed kasutavad teadmiste esitamiseks ametlikku, kättesaadavat, jagatud ja laialdaselt rakendatavat keelt.

a. Kui kõik andmed on esitatud erinevates ja haruldastes formaatides, siis on väga keeruline ja kulukas neid ühildada, mis omakorda tähendab, et töö tegijad ei suuda digitaalsete ressursse üheselt mõista. Näiteks, kui töö tegija näeb temperatuuri andmeid, siis ta saab aru, kas tegu on tänase ilma temperatuuriga või hoopis inimese kehatemperatuuriga ehk metaandmeid antud andmehulga kohta.

10. (Meta)andmetes kasutatakse FAIR'i põhimõtteid järgivaid sõnavarasid.

a. Terminoloogia, millega andmestikke kirjeldatakse, peab olema laialdaselt kasutatav ja üheselt mõistetav, vajalik on piisav selgitus. Näiteks andmete kirjeldamiseks ei piisa ainult sõnast temperatuur, vaid peab kirjeldama täpsemalt: kolonni temperatuur, sulamistemperatuur.

11. (Meta)andmed sisaldavad kvalifitseeritud viiteid teistele (meta)andmetele.

a. Kvalifitseeritud viide on viide teisele ressursile (selle püsivale identifikaatorile), milles on selgelt määratletud seos antud ressursiga (versioon, ressursside kogumise ajaline vahemik). Näiteks kui metaandmetest on esitatud mitu versiooni, siis on mõistlik anda ligipääs kõikidele versioonidele ja neile korrektselt viidata. [2,8]

Taaskasutusvõime aluspõhimõtte alla kuulub neli printsiipi, mis on välja toodud selgitustega:

12. (Meta)andmeid kirjeldatakse rikkalikult ja arvukalt täpsete ning asjakohaste omadustega.

a. Omadusi peaks olema nii palju kui võimalik arvestades, et andmestikuga tutvuja teadmiste taust pole teada. Seega peaks leiduma omadusi, mis võivad huvitada erinevate taustade ja huvialadega inimesi.

13. (Meta)andmed väljastatakse selge ja kättesaadava andmekasutuslitsentsiga.

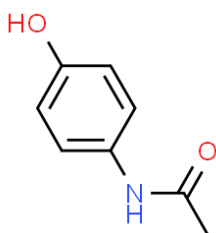
a. Digitaalsed ressursid peavad igal ajal sisaldama litsentsi, mis kirjeldab, mis tingimustel võib ressursse kasutada. Kui litsentsi ei leita, siis ei ole andmete kasutamiseks luba.

14. (Meta)andmed on seostavad detailse päritoluga.

- a. Detailne päritolu sisaldab vastuseid küsimustele: kuidas (meta)andmed saadi, miks ja kelle poolt need genereeriti, mis tingimuste all, mis (meta)andmed olid alguses olemas ja mis allikaid kasutati, mis rahastusega (meta)andmed saadi, kes on (meta)andmete omanik, keda peaks krediteerima, mis muudatusi on (meta)andmetega tehtud pärast nende avalikustamist.
15. (Meta)andmed vastavad domeeniga seotud valdkonnastandarditele.
- a. Kui on olemas valdkonna poolt rajatud standardid või klassikalised meetodid, kuidas (meta)andmeid koguda ja jagada, siis tuleb neid jälgida. [2,8]

Lisa 3. Optimaalse voolukiiruse kontroll

Selleks, et veenduda optimaalse voolukiiruse õiges tuvastamises, tehti mitmed kordusmõõtmised. Esmalt kontrolliti samu analüüse, aga teisel päeval, tulemusi kontrolliti kõikide parabeenide puhul. Seejärel korrati analüüse muutes kolonni, tehes analüüse koos ja ilma eelkolonnita, muutes instrumenti ja tehes analüüse ka teiste ainetega. Teise kolonnina kasutati Agilent C18 15 cm pikkust ja 4,6 mm diameetriga kolonni, kolonni osakeste suurus 5 µm. Teise instrumendina kasutati Agilent 1260 UHPLC instrumenti, analüüsid detekteeriti DAD detektoriga. Teise ainenäite kasutati atsetoaminofeeni ehk parasetamooli (**Joonis 28**). **Tabel 9** kujutab analüüsi parameetreid kontrollis olevatel mõõtmistel.

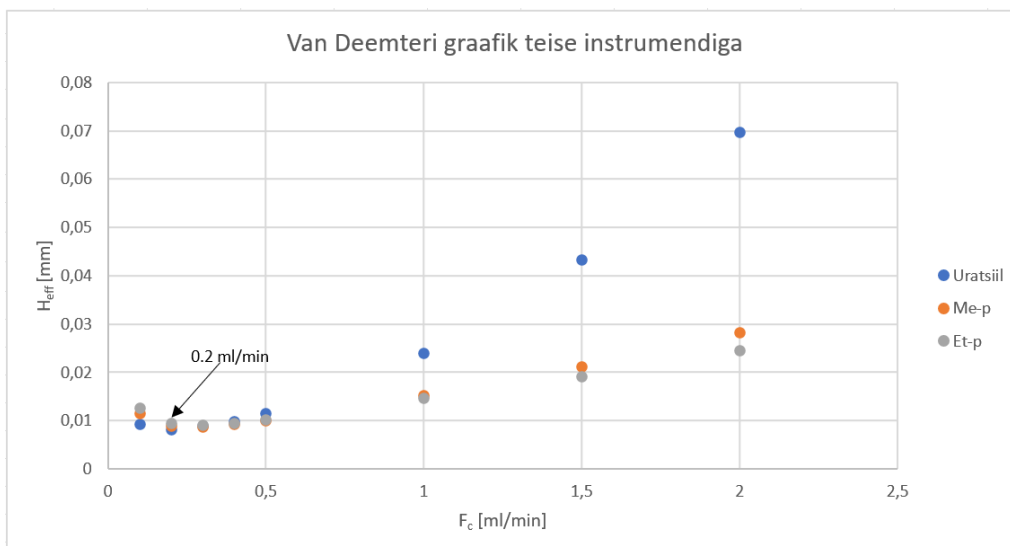


Joonis 28. Atsetoaminofeeni struktuur.

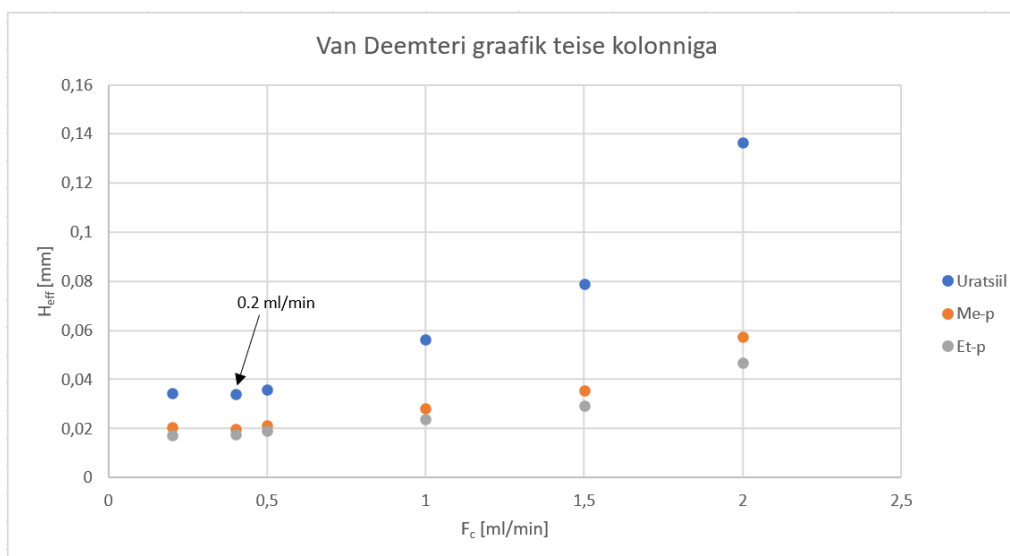
Tabel 9. Vastavad parameetrid optimaalse voolukiiruse kontrollis.

Analüüs	Teine instrument	Teine kolonn	Eelkolonniga ja ilma	Teise ainega
Parameeter				
/min]	0,1 - 2,0	0,1 - 2,0	0,1 - 2,0	0,1 - 2,0
B%	50	50	50	50
Kolonni temp. [°C]	30	30	30	30
Süstimiskogus [µl]	1	5	5	1

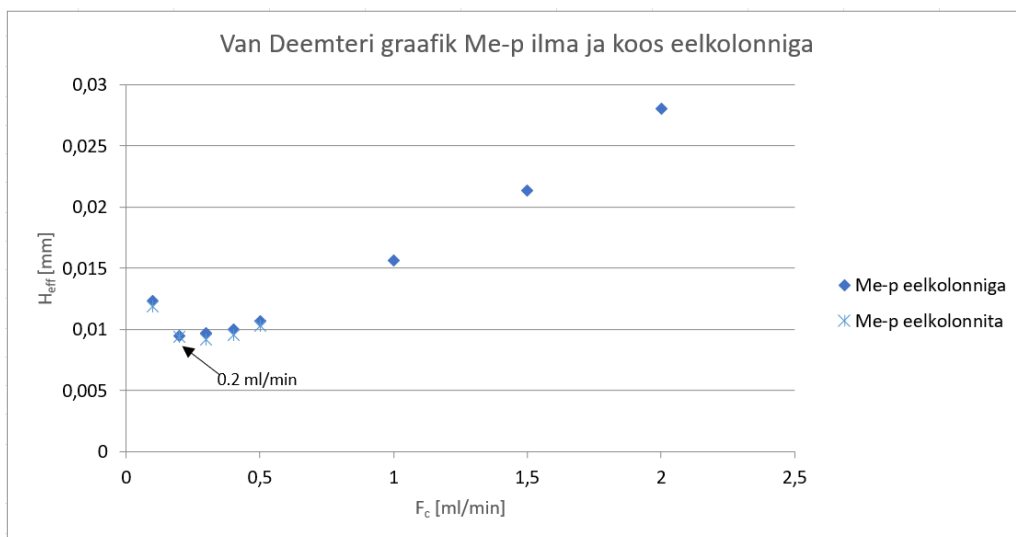
Nagu ilmestavad **Joonis 29** kuni **Joonis 32**, siis suudeti kõikide analüüsides saavutada sama optimaalne voolukiirus 0,2 ml/min. Seega jätkati analüüse esialgse kolonniga kasutades eelkolonni, ainetega ja instrumendiga, sest veenduti nende eranditeta käitumises.



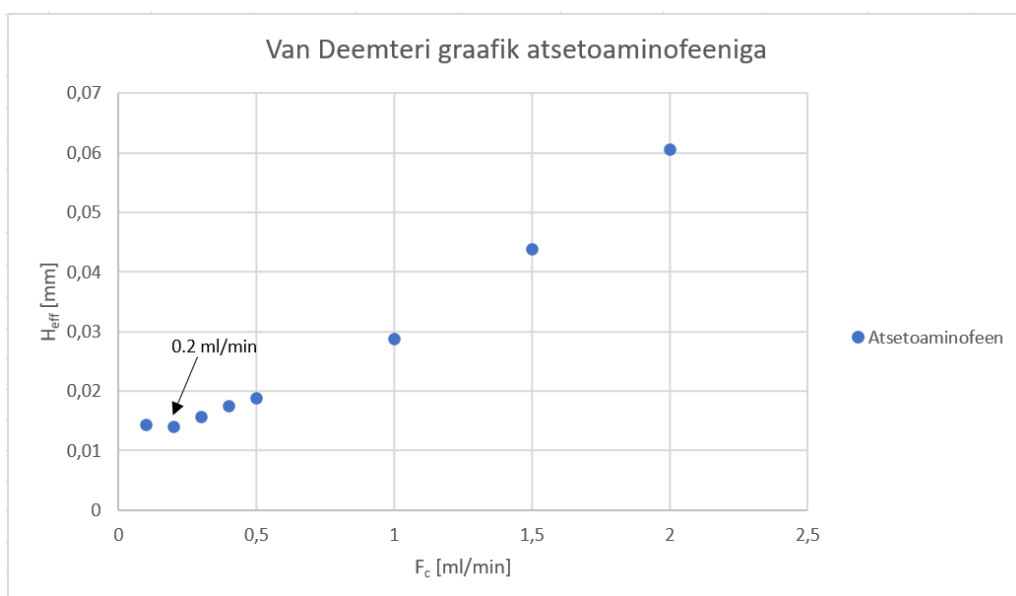
Joonis 29. Van Deemteri graafik teise instrumendiga. Agilent 1260 UHPLC. Analüüsiti uratsiili, Me-p, Et-p.



Joonis 30. Van Deemteri graafik teise kolonniga. Agilent C18 15 cm pikkus ja 4,6 mm laius. Analüüsiti uratsiili, Me-p, Et-p.



Joonis 31. Van Deemteri graafik ilma ja koos eelkolonniga. Analüüsiti Me-p.



Joonis 32. Van Deemteri graafik atsetoaminofeeniga.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mirjam Prokoptšik,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Kromatogrammide õppetöök ja FAIR andmeteks,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Koit Herodes ja Ernesto de Jesus Zapata Flores,

(juhendajate nimed)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mirjam Prokoptšik

28.05.2024