

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Chem. Listy 92, 669 - 672 (1998)

UMĚLÉ NEURONOVÉ SÍTĚ PRO OPTIMALIZACI V KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZE*

VLASTIMIL DOHNAL

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: vlasta@chemi.muni.cz

Došlo dne 15.III.1998

Úvod

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vysoce účinná separační metoda. Výhody, jako jsou malá spotřeba vzorku, krátká doba analýzy či velká separační účinnost z ní učinily jednu z nejprogressivnějších analytických metod posledních let.

Nabitě částice se v průběhu analýzy od sebe dělí účinkem elektrického pole podle různých rychlostí elektromigrace. Separace je ovlivněna mnoha faktory (druhem základního elektrolytu, jeho pH a koncentrací, koncentrací modifikátorů do něj přidaných, separačním napětím, teplotou, sorpcí látek na stěnu kapiláry, atd.). Proces hledání nejlepších separačních podmínek se nazývá optimalizace. Tu můžeme provést buď teoreticky nebo experimentálně. „Klasický“ postup optimalizací jednoho faktoru po druhém, což chemici ještě často používají, je časově náročný a nemusí vždy vést k cíli. V této práci byly zkoumány možnosti aplikace umělých neuronových sítí (NS). NS jsou progresivní metodou, nacházející stále širší aplikace v chemii^{1,2}.

Neuronové sítě se skládají z několika vrstev tzv. neuronů: ze vstupní, z jedné nebo více skrytých vrstev a z výstupní vrstvy (obr. 1). Počet neuronů v jednotlivých vrstvách je závislý na řešeném problému (na počtu vzorů, proměnných, ..., a na požadované kvalitě předpovědi). Neuronové sítě ve skrytých vrstvách a ve výstupní vrstvě napodobují funkci své biologické předlohy. Pro každý neuron (obr. 2) se vypočítá suma vážených vstupů z neuronů předchozí vrstvy, která,

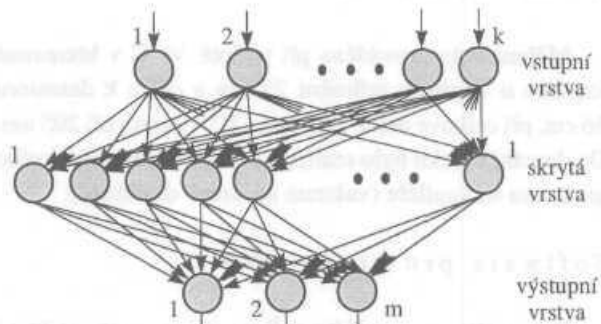
přesáhne-li tzv. prahovou hodnotu (bias), je pak pomocí přechodové funkce převedena na výstupní signál.

Práce s neuronovou sítí spočívá ve dvou fázích. V první, tzv. tréninkové fázi, se získají váhové koeficienty a prahové hodnoty tak, že síť dokáže s požadovanou přesností reprodukovat tato tzv. tréninková data. Takto natrénovaná síť pak ve fázi predikce dokáže předpovědět chování parametrů, použitých při první fázi a nalézt tak např. optimální podmínky separace.

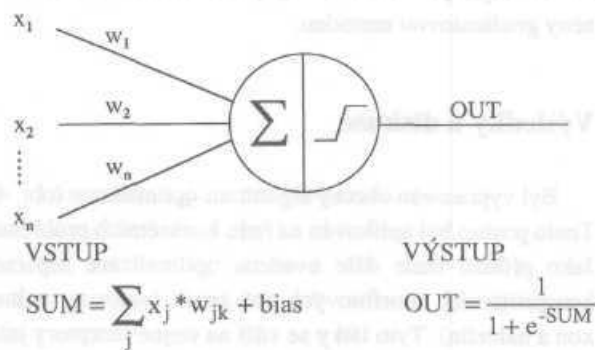
Pokusná část

Použité přístroje a chemikálie

Měření byla provedena na přístroji SpectraPHORESIS 1000 fy TSP (USA) vybaveného UV/VIS detektorem.

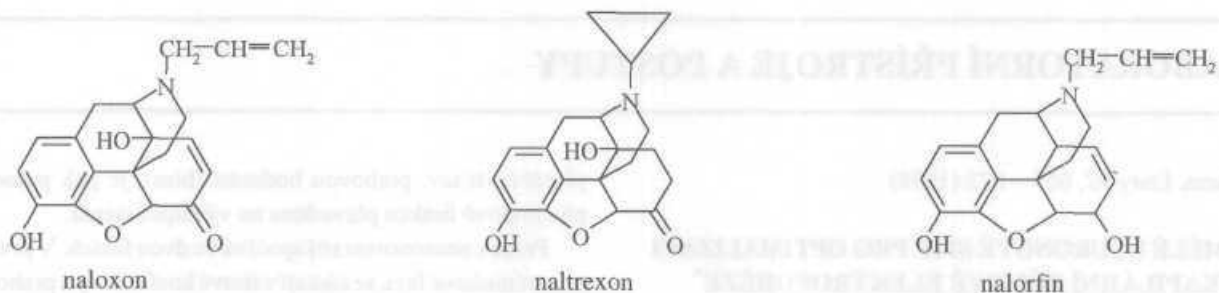


Obr. 1. Struktura neuronové sítě



Obr. 2. Schéma umělého neuronu

* Tato práce získala 1. cenu v Soutěži mladých analytických chemiků v Olomouci v únoru 1998



Obr. 3. Strukturní vzorce separovaných morfinových antagonistů

Chemikálie použité pro přípravu základního elektrolytu (BGE) byly čistoty p.a. fy Lachema. Hodnota pH BGE byla upravována mícháním ekvimolárních roztoků primárního, sekundárního a terciárního fosforečnanu sodného ve vhodném poměru.

Strukturální vzorce analyzovaných morfinových antagonistů jsou uvedeny na obr. 3. Roztok jejich směsi byl připraven vždy před analýzou v koncentraci asi 50 ppm v dvakrát destilované vodě z křemenné aparatury.

Podmínky měření

Měření byla prováděna při teplotě 30 °C v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm a délce k detektoru 36 cm, při celkové délce 42,5 cm, s UV detekcí při 205 nm. Dávkování vzorku bylo realizováno vytvořením tlakového gradientu na kapiláře (vakuum na straně detektoru).

Software pro práci s NS

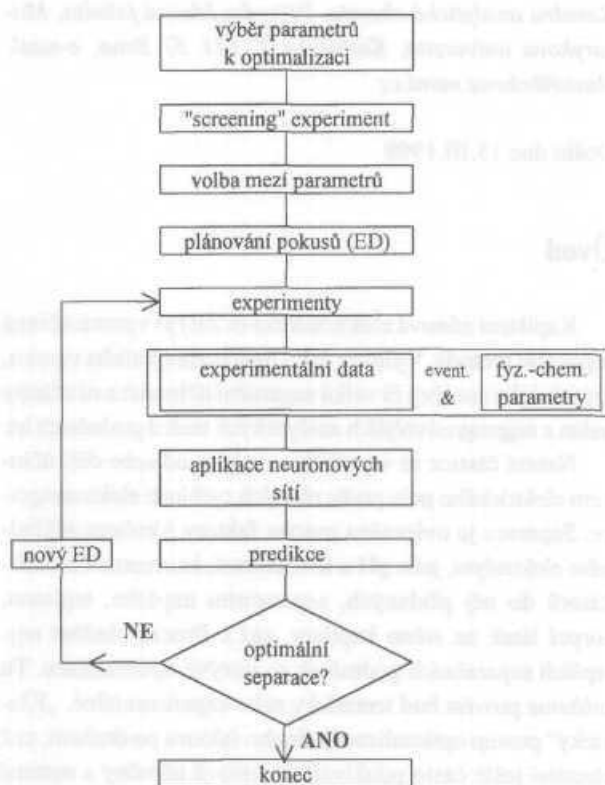
Byl použit program BP (cit.³) (back propagation), který pracuje s algoritmem zpětného šíření a jednotlivé váhové koeficienty a prahové hodnoty jsou v tréninkové fázi měněny gradientovou metodou.

Výsledky a diskuse

Byl vypracován obecný algoritmus optimalizace (obr. 4). Tento postup byl aplikován na řadu konkrétních problémů. Jako příklad bude dále uvedena optimalizace separace kompetitivních morfinových antagonistů (naloxon, naltrexon a nalorfin). Tyto látky se váží na stejné receptory jako morfin, ale na rozdíl od něj mají nulovou nebo zanedbatelnou biologickou aktivitu. Proto se používají zejména jako antidota při předávkování morfinem či jeho deriváty.

Jako parametry pro optimalizaci byly zvoleny: separač-

ALGORITMUS OPTIMALIZACE S VYUŽITÍM UMĚLÝCH NEURONOVÝCH SÍTÍ



Obr. 4. Optimalizační algoritmus

ní napětí, doba dávkování vzorku a koncentrace základního elektrolytu. Hodnota optimálního pH byla nalezena separátním postupem. Tato měření lze považovat za „screening“ experiment. Optimalizace byla nejdříve provedena „klasickým“ způsobem a poté odhadnuty meze optimalizovaných parametrů (viz tabulka I).

Dále pak byly použity dvě různé metody plánování pokusů⁴ (experimental design, ED) a to dvouhladinový „central composite“ plán (CCD) a dvouhladinový faktorový plán a provedeny experimenty. Získaná data byla použita k natrénování NS. Vstup: koncentrace BGE, sepa-

rační napětí, doba dávkování vzorku; výstup: rozlišení píků naloxonu a naltrexonu a k zamezení náhodné variability i parametry píků a to plochy, výšky a počty teoretických

pater. Tato data je eventuelně možné doplnit informacemi z tabulek či databází fyzikálně-chemických vlastností látek.

Tabulka I

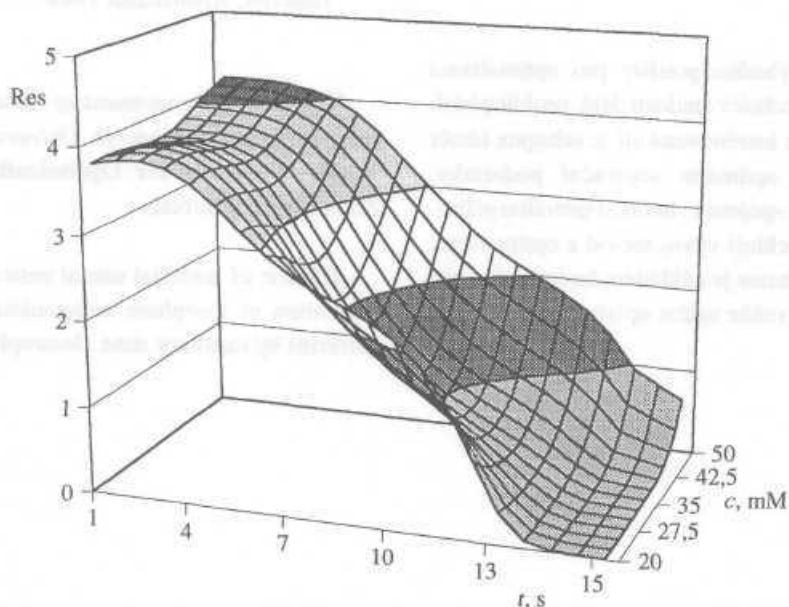
Meze parametrů při optimalizaci

Parametr	Dolní mez	Horní mez
Separáční napětí [kV]	5	15
Doba injekce vzorku [s]	1	15
Koncentrace BGE [mM]	20	50

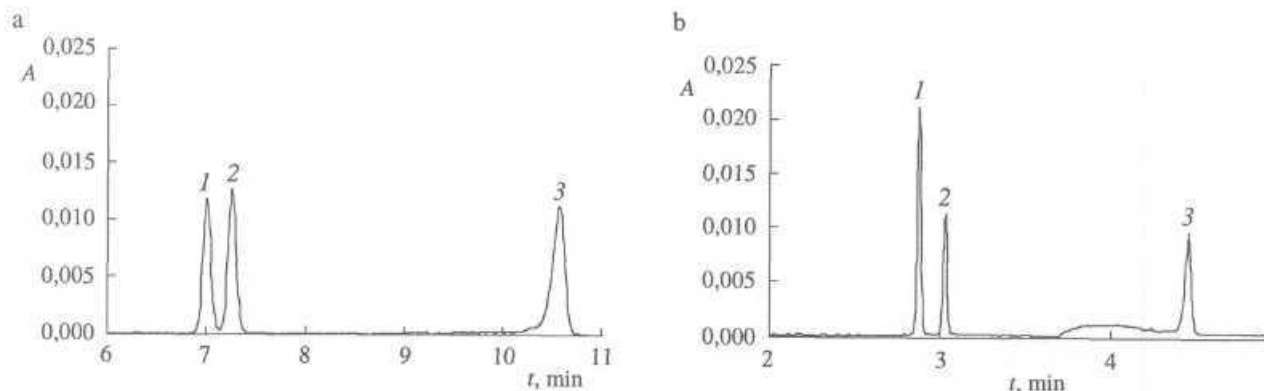
Výsledky a diskuse

Byly nalezeny vhodné struktury neuronových sítí, kdy NS dokázala s přesností 0,1 % pro každý parametr reprodukovat tréninková data. Pro CCD měla jednu skrytou vrstvu se 14 neurony, pro druhý ED.jich bylo v této vrstvě pouze 7.

Takto natrénovaných NS bylo použito k predikci cho-



Obr. 5. Graf závislosti rozlišení (*Res*) píků naltrexonu a nalorfinu na koncentraci (*c*) fosfátového BGE a době (*t*) dávkování vzorku (pH = 7,0; separáční napětí 11 kV), • 0-1, ■ 1-2, □ 2-3, ▨ 3-4, ● 4-5



Obr. 6. Separace morfinových antagonistů optimalizovaná „klasickou“ metodou (a) a za použití umělých neuronových sítí (b), 1 nalorfin, 2 naltrexon, 3 naloxon, separáční podmínky (separáční napětí, doba dávkování vzorku, koncentrace BGE): a) 7 kV, 2 s, 50 mM; b) 15 kV, 1 s, 50 mM

vání jednotlivých parametrů a byly získány 3D-plochy závislosti jednotlivých parametrů na separačních podmínkách. Je možno říci, že se predikce získané z obou struktur NS výrazně nelišily. Jako optimální byla kvalifikována separace s maximálním rozlišením píků naltrexonu a nalorfinu a proto byly použity separační podmínky s nejvyšší hodnotou predikce tohoto parametru (obr. 5) a za těchto podmínek provedena separace (obr. 6).

V další fázi je eventuelně možno použít další, jemnější plán pokusů, znovu provést experimenty a na získaná data opět aplikovat NS. V daném případě to nebylo nutné.

Závěr

NS mohou být s výhodou použity pro optimalizaci metod v CZE a to bez jakékoli znalosti dějů, probíhajících během separace. Jednou natrénovaná síť je schopna téměř okamžitě předpovědět optimální separační podmínky. Umělé neuronové sítě ve spojení s vhodnou metodou plánování pokusů značně urychlují vývoj metod a optimalizaci v CZE. Navržený algoritmus je základem budovaného expertního systému, který může nalézt uplatnění nejen v kapilární elektroforéze.

Tato práce je součástí řešení grantového projektu GAČR č. 203/96/0478.

LITERATURA

1. Zupan J., Gasteiger J.: *Anal. Chim. Acta* 248, 1 (1991).
2. Havel J., Peňa E. M., Rojas-Hernández A., Doucet J.-P., Panaye A.: *J. Chromatogr. A* 793, 317 (1998).
3. McClelland J. L., Rumelhart D. E.: *Explorations in Parallel Distributed Processing*. MIT Press, Massachusetts 1988.
4. Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Deming S. M., Michotte Y., Kaufman L.: *Chemometrics: A Textbook*. Elsevier, Amsterdam 1988.

V. Dohnal (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Artificial Neural Networks for Optimization in the Capillary Zone Electrophoresis**

The use of artificial neural networks for the optimized separation of morphine antagonists (naloxon, naltrexon, nalorfin) by capillary zone electrophoresis is described.

