

## VYUŽITÍ MODERNÍCH VÝPOČTOVÝCH METOD A NEURONOVÝCH SÍTÍ K OPTIMALIZACI METODY PRO LC/MS/MS ANALÝZU VOJENSKÝ VÝZNAMNÝCH ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTEK

**DUŠAN TREFILÍK**

*Ústav ochrany proti zbraním hromadného ničení, Víta Nejedlého, 682 01 Vyškov, Česká republika  
dusan.trefilik@unob.cz*

Došlo 1.6.23, přepracováno 30.10.23, přijato 13.11.23.

Hledání optimálního nastavení podmínek chemické analýzy je zpravidla zdoluhavý proces. Tento článek k tomuto účelu navrhuje využití neuronových sítí, zejména ve vztahu k určení optimální podmínek pro analýzu zkoumaných látek s využitím technologie LC/MS/MS a ESI ionizací, a to na základě znalosti jejich základních vlastností, označených jako univerzální deskriptory. Práce se soustředí na nalezení takových podmínek analýzy, kdy dochází k maximalizaci signálu iontu prekursoru. Práce se zabývá zejména otázkou, zda lze výsledky zjištěné na jednom typu analytu použít k neurální interpolační predikci optimálních podmínek analytů podobných.

**Klíčová slova:** LC/MS/MS, neuronové sítě, funkcionál elektronové hustoty, novičok, organofosfáty, kvantová chemie, optimalizace

*Prohlášení autora*

*Pracoviště je držitelem licence č.7/2012 pro nakládání s vysoce nebezpečnými látkami udělené rozhodnutím č. j.: SÚJB/OKZCHZ/27362/2012 dle §8 a 13 zákona č. 19/1997 Sb., s následnými změnami rozhodnutí o změnách licence: č. j. SÚJB/OKZCHBZ/25919/2014, a SÚJB/OKZCHBZ/7593/2020. V rámci experimentálních prací byly látky spadající pod tuto licenci zlikvidovány dle vnitřního předpisu a dle zákona č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví.*

### Úvod

Nervově paralytické látky, organofosfáty, jsou jedny z nejtoxičtějších synteticky získaných chemických sloučenin, jaké lidstvo poznalo. Jejich primárním působením je deaktivace acetylcholinesterasy (AChE), jakožto klíčového enzymu zodpovědného za udržování funkční koncentrace neurotransmiteru acetylcholinu v postsynaptické neuronové mezeře<sup>1,2</sup>. Rychlost účinku těchto látek a jejich smrtící efektivita vůči teplokrevným organismům vedla státní i nestátní aktéry k jejich vývoji s cílem zneužít těchto jejich vlastností proti člověku.

Časový a geopolitický vývoj na bojišti vedl k úvahám, zda nervově paralytické látky označované jako G-série [tabun (GA), sarin (GB), soman (GD), cyklosarin (GF)] nebo V-série (VX, VR, CVX) lze nevyhnutelně využít pouze jako bojové, nebo zda jejich potenciální modifikací nelze získat sloučeniny vhodnější, které bude možné lépe využít k diverzním účelům, k likvidaci vysoce zájmových osob<sup>3</sup>.

Tento posun lze historicky vysledovat i v současnosti, kdy se bojové využití látky GB prokázalo v Syrské občanské válce v letech 2013 (cit.<sup>4</sup>) a 2017 (cit.<sup>5</sup>), ale také k cílené likvidaci nevlastního bratra vůdce KILDR Kim

Čong-una s využitím vhodnější látky VX, a to přímo na letišti v Kuala Lumpur na začátku roku 2017 (cit.<sup>6</sup>).

Uvedené události vedly k potvrzení, že zmíněné látky jsou stále hrozbou pro mezinárodní společenství a aktivovaly zpřísnění kontrolních mechanismů definovaných OPCW (cit.<sup>7</sup>). Do seznamů látek podléhajících přísné kontrole byly následně zařazeny také látky tzv. A-série, známé pod názvem novičoky, právě na základě jejich využití při pokusu o likvidaci Sergeje Skripala a jeho dcery Julie v březnu 2018 v městě Salisbury ve Velké Británii<sup>8-10</sup> s vyjádřením nutnosti mít dostupnou identifikační instrumentaci se stopovou až ultrastopovou dispozicí. Prokázala se tak domněnka, že téměř 50 let starý sovětský projekt tzv. látek čtvrté generace<sup>11</sup>, vznikající v rámci studené války, je stále aktivní a jeho výsledky jsou využívány k pokusům o likvidaci lidských cílů.

Posledně zmiňovaný incident tak na úrovni vyšetřovatelské katalyzoval snahy o zjištění původu těchto látek a identifikaci domnělých pachatelů, ale také opodstatnil nutnost výzkumu v oblasti ochrany proti těmto hrozbám, a to zejména v oblasti analýzy, dekontaminace a výzkumu kladoucích si za cíl tyto látky strukturně a chemicky popsat, definovat jejich pravděpodobné vlastnosti a toxicitu.

Absence dostatečných analytických dat v souvislosti s látkami A-série a různorodost v uniklých informacích z přísně utajovaného sovětského projektu vedla výzkumná pracoviště k syntézám všech jejich předpokládaných struktur. Následné studium těchto látek tak umožnilo zhodnotit, zda jsou skutečně nositeli predikovaných vlastností a nakolik jsou jejich analytická data v souladu se vzorky získanými v již zmiňovaném Salisbury. Vedle struktur popisovaných Hoenigem<sup>12</sup> a Ellisonem<sup>13</sup> se jako nejpravděpodobnější ukázala struktura Mirzyanovova<sup>14,15</sup>.

Význam látek A-série, ať už do bojového či diverzního použití, je tak neoddiskutovatelný. Pro vývoj účinné ochrany proti nim je třeba je podrobně studovat a následně zefektivňovat proces jejich chemické analýzy různými metodami a z rozličných matric, nejlépe jej pak následně unifikovat do přehledné metodiky.

#### Využití teorie funkcionálu elektronové hustoty (DFT)

Teorie funkcionálu elektronové hustoty je metoda stavějící na mechanismech kvantové chemie, která na základě znalosti chemické struktury organických látek a prostředí, ve kterém se nacházejí, dokáže optimalizovat studovanou molekulu co do délky vazeb, jejich vibračních stavů, vazebných úhlů, mohutnosti elektrického potenciálu, aj.<sup>16–19</sup> Na základě vypočítaných dat lze pak efektivně odhadovat lokaci a robustnost HOMO a LUMO orbitalů, vytvořit 3-D pravděpodobnostní mapu hustoty elektronů, vektorovat na molekule dipólový moment a na těchto kvantovaných fyzikálně-chemických veličinách provádět relativně přesné odhady v rozličných aplikacích<sup>20</sup>.

Carlsen<sup>15</sup> využil široké řady softwarových prostředků využívajících také DFT jako PASS, T.E.S.T., ACD/iLab, F.D.S.P.C., ACD/Percepta a QSAR Toolbox k výpočtům popisujícím pravděpodobnost konkrétní biologické aktivity vybraných sloučenin a na základě těchto odhadů uzavírá, že je zde patrný zjevný rozdíl mezi biologickou aktivitou látek z V-série oproti A-sérii, a co do bojového použití jejich výsledky mluví v neprospěch A-série. Autoři sami v dílčím závěru označují nízkou pravděpodobnost blokace cholinergního přenosu vzruchu látkami z A-série za překvapující.

Khafa a spol.<sup>21</sup> ve své práci graficky vyjádřili elektronovou hustotu vybraných zástupců bojových chemických látek a na tomto základě následně posoudili jejich dispoziční k chemickým reakcím dle vizualizací dislokace elektrostatického náboje na molekule.

Bhakhoa a spol.<sup>20</sup> metodou M06-2X/6-311+G(d,p) vyčíslili veličiny, které mají enormní význam na úvahy týkající se reaktivity, stability a dispoziční k reakcím. Tyto veličiny označují za deskriptory reaktivity. Na základě vypočítaných energetických bilancí na molekule autoři tyto deskriptory dále konkretizovali s tvrzením, že rozvíjejí představu o ionizačních a elektronově afinitních vlastnostech molekuly. Tvrdí, že tyto deskriptory reaktivity umožňují objektivně zhodnotit celkovou stabilitu molekul zkoumaných látek. Rozdíl mezi energiemi hraničních or-

bitalů označují za ukazatel stability a konstatují, že tento roste následovně:  $VX < VR < A-234 < GB$ .

Autoři Wang a spol.<sup>22</sup> dále rozvíjejí úvahu, že velká HOMO-LUMO energetická mezera je ve zřejmém vztahu s dipólovým momentem, a ve své studii se věnují diskusi korelace energetické bariéry s dipólovým momentem a dalších veličin souvisejících s mapováním elektronové hustoty molekuly.

Na základě těchto zjištění lze usuzovat, že nervově paralytické látky jsou obecně silně elektrofilní a jsou tedy ochotné akceptovat příchozí elektronovou hustotu od nukleofilních ložisek jako kyslík, dusík a síra, které jsou z toho pohledu donorovými atomy přednostně působící jako elektropozitivní centra nervově paralytických látek.

DFT analýza zkoumaných molekul, resp. její výstupy ve formě rozličně interpretovatelných energetických veličin, tak vnáší zajímavý pohled na hodnocení dispoziční molekuly k reakcím, k hodnocení její polarity, ionizačního potenciálu a elektronové afinity, a umožňuje analytikovi předpokládat případné komplikace, a hledat na ně řešení již v části plánování experimentu. Otázkou zůstává kontroverznost využití těchto moderních metod např. pro vývoj nových bojových chemických látek, kdy lze modelovat jejich hypotetické vlastnosti, zkoumat dispoziční k reakcím a jejich biologickou aktivitu.

#### LC/MS/MS analýza vysoce nebezpečných organofosforových látek

V otázce využití těchto poznatků v oblasti LC/MS/MS analýzy jsou, v případě LC části, využitelné úvahy týkající se přípravy vzorků, vhodného zvolení příslušné kolony a vhodné kombinace mobilních fází a pro vhodnou volbu jejich modifikátorů. Vliv zmiňovaných deskriptorů pro hmotově identifikační část je neoddiskutovatelná z hlediska určení vhodnosti zkoumané látky pro ESI techniku a nese s sebou informaci o volbě velikosti ionizačního napětí z důvodu možné nežádoucí fragmentace zkoumané molekuly již v této předčásti MS/MS systému.

Využití LC metody pro analýzu organofosforových bojových chemických látek (BCHL) bez tandemu s další identifikační metodou nelze považovat za využívaný postup. Je to dáno zejména hydrolytickými predispozičními těchto látek, a tak přímá analýza, navíc s velkými kvantitativně analytickými ambicemi, zde nedává příliš smysl. Také možnosti derivatizace rozkladných produktů tohoto typu vzorku, toliko pro GC/MS využívanými silylačními činidly, je u tohoto typu instrumentace principiálně nemožná.

Naprosto běžně se ovšem s výhodou a vysokou citlivostí využívá tandemu LC/MS/MS k analýze rozkladných produktů či vysokomolekulárních aduktů organofosforových BCHL s afinitními proteiny. Oudejans<sup>23</sup> metodou LC/MS/MS analyzoval látku VX v souvislosti s její stálostí v porézních materiálech po dekontaminaci. OPCW a Lee<sup>24</sup> označují metodu LC/MS/MS jako efektivní nástroj k forenzní analýze environmentálních a biomedicinských vzorků, kde se dá s úspěchem dosahovat v identifikaci

rozkladných a metabolických produktů citlivosti řádově  $1 \text{ ng ml}^{-1}$ , resp.  $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$  při práci v módu iontové selekce (SIM). Tsuchihashi<sup>25</sup> nebo Katagi<sup>26</sup> zdůrazňují význam metody LC/MS/MS při možném zneužití látky VX, kdy stavějí na své historicky stále nepříliš vzdálené analytické zkušenosti se zneužitím sarinu v tokijském metru.

Bryant<sup>27</sup> ve své studii využíval LC/MS/MS a zjistil, že degradační metabolické produkty těchto látek jsou mnohem stabilnější, nežli jejich „rodiče“. Jejich množství v biologickém vzorku je tak vhodným měřítkem intenzity intoxikace jedince.

GC/MS je pro analýzu organofosfátů velmi efektivní metoda, nicméně má své limity pro analýzu jejich rozkladných produktů, kdy je nelze stanovovat přímo a je třeba vhodně derivatizovat a tudíž komplikovaně převádět rozkladné produkty do organického rozpouštědla<sup>28–30</sup>.

Mirbabaee při studiu<sup>31</sup> biodegradace A-234 použil triplkvadrupól Agilent 6410B. Výsledkem studie bylo zjištění, že A-234 je významným urinálním markerem intoxikace touto látkou a byla prokázána přítomnost aduktů A-234 s aminokyselinou tyrosinem a enzymem AChE.

LC/MS/MS metoda se tak stala poměrně atraktivní formou určování degradačních produktů bojových chemických látek využívajíc jejich stálosti, relativní polaritu, která umožňuje přímou analýzu vodných vzorků nebo vodných extraktů s jejich nevýznamnou nebo žádnou další úpravou.

Neuronové sítě jako nástroj pro zpracování objemného množství dat

Pokusy transformovat neurální propojení v lidském mozku do matematického modelu, který by byl schopen složité nelinearity postihnout, jsou známy již v počátcích 40. let 20. století. Zjistilo se, že navrhnout strukturu modelu nebude nikterak složité, neboť jde jen o to zkopírovat analogii fungování neuronové sítě v mozku a vhodně ji modifikovat. Donald Hebb<sup>32</sup> v roce 1949 ve své přelomové monografii tak na základě svého studia této biologické analogie a podmíněných reflexů definoval algoritmus, který umožňoval učit neuron změnou vah jeho vstupů. Vyšel tak z jednoduché myšlenky, že pokud je neuron excitován korektně, pak se posílí spoje, které k excitaci vedly. Naopak pokud bude excitován nesprávně, je třeba tyto spoje oslabit. Metoda ve svých počátcích neumožňovala realizovat složitější aplikace, neboť by vyžadovaly daleko rozsáhlejší topologii neuronové sítě, a tím i řádově vyšší náročnost na výpočetní výkon. Vývoj neuronových sítí také brzdila skutečnost, že nebyl dlouho definován algoritmus učení vícevrstevných neuronových sítí. Ten byl postaven až roku 1986 na principu zpětného šíření chyby. S postupným rozmachem informačních technologií ekvivalentně tomu rostla i složitost reálně využitelných topologií i počet aplikací, včetně těch využitelných v oboru chemie<sup>33</sup>.

Příkladem budiž klasifikace vín<sup>34</sup>, která řeší hypotetický problém, zda lze ze souboru různorodých chemických deskriptorů zjistitelných jednoduchou chemickou

analýzou odhadnout s využitím neuronové sítě jejich původ, tedy konkrétní vinařství. Byla vzata vína bez ohledu na jejich druh ze tří různých lokálně příbuzných vinařství a byla provedena chemická analýza 13 vlastností (z nejdůležitějších: obsah alkoholu, kyseliny jablečné, obsah usazenin, pH usazenin, obsah hořčiku, fenolu, intenzita zbarvení, aj.). Ke každému takto popsanému vínu bylo přiřazeno vinařství. Tento soubor dat sloužil k tomu, aby se neuronová síť o deseti skrytých vrstvách naučila s definovanou chybou rozeznávat, která vína patří jakému vinařství.

Gasteiger<sup>33</sup> popisuje využití neuronových sítí v různých oblastech chemie, konkrétně v odhadování chemické reaktivity, kde deskriptory jako totální náboj, disociační energie, elektronegativita, polarita byly vstupem do sítě a výstupem byla očekávaná reaktivita. Tento model pak Röse<sup>35</sup> realizoval na výzkumu zabývajícím se predikcí heterolyticky štěpících se vazeb a odhadu reaktivity chemických reakcí. Cílem bylo vytvořit širokou databázi elementárních reakcí ve vazbě na rozdílné fyzikálně-chemické parametry těchto reakcí. Následně pak využit strojového učení k predikci složitějších reakcí s využitím zmíněné databáze s myšlenkou, že tuto znalostní databázi lze dále doplňovat a výsledky zlepšovat.

Tusar<sup>36</sup> při HPLC analýze komponentů vín španělského původu sledoval závislosti pH na obsahu alkoholu. Podle schopnosti dělit jednotlivé charakteristické komponenty vína spočítal faktor selektivity SF. S pomocí modelovacího nástroje publikovaného Zupanem<sup>37</sup> založeném na metodě nejmenších čtverců promítl 3-D graf do půdorysné roviny a interpoloval závislost faktoru selektivity SF na již zmíněných veličinách.

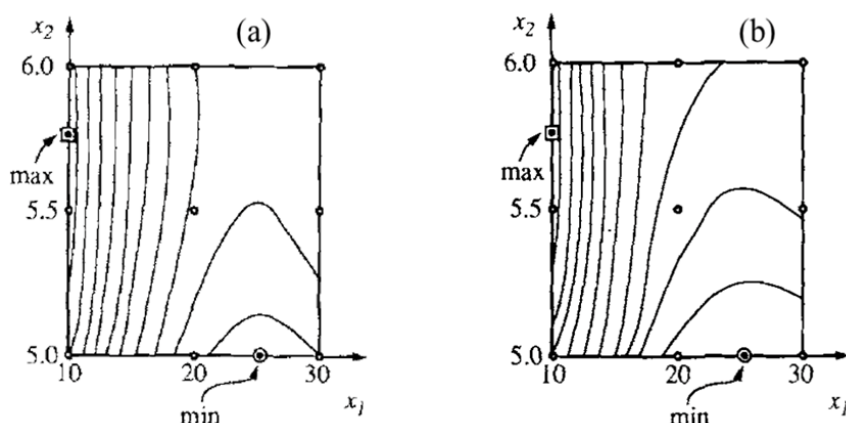
Ten samý problém následně modeloval s pomocí neuronové sítě, která se skládala ze dvou stejných vstupních deskriptorů, šesti neuronů v jedné skryté vrstvě a výstupem byl sledovaný faktor SF. Porovnání výsledků obou modelů lze nalézt v obr. 1.

Otto a spol.<sup>38</sup> studovali vliv reakčních podmínek nitrace benzenu na vznik jeho monosubstituovaného derivátu, resp. poměru paralelně vznikajícího *p*-nitrobenzenu a *o*-nitrobenzenu a také *m*-nitrobenzenu. Pro optimalizaci reakční směsi a podmínek reakce, s cílem získávat převážně jeden z derivátů, použil neuronové sítě.

Významně složitější aplikace neuronových sítí, zejména v oblasti fyzikální chemie, lze nalézt např. u Kuličenka a spol.<sup>39</sup>, kde autoři propojili teorii funkcionálu elektronové hustoty s neuronovými sítěmi zároveň porovnávají efektivitu těchto metod v aplikaci na výpočet meziatomárního potenciálu majícího vliv na stabilitu studované molekuly. Zjistili, že využití neuronových sítí, resp. strojového učení, má znatelný vliv na počet *ab initio* iterací při DFT výpočtech a tím významně redukuje výpočetní čas a eliminuje chyby.

## Experimentální část

Na základě potřeby unifikovat a akcelarovat postup nalezení optimální metodiky využitelné pro analýzu vo-

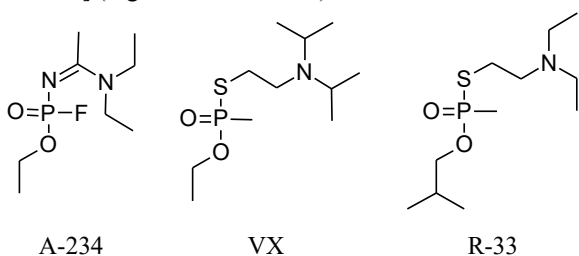


Obr. 1. Porovnání výsledků získaných polynomičnou interpolací (a) a generovaných neuronovou sítí (b)<sup>37</sup>

jensky významných organofosforových látek metodou LC/MS/MS, aplikovatelné v mobilních a stacionárních laboratorních AČR, vyvstala snaha o navázání na současné trendy v oblasti zpracování velkého množství dat neuronovými sítěmi a na současné možnosti modelování deskriptorů molekul na základě DFT.

#### Analyty

Ethyl-*N*-[1-(diethylamino)ethyliden]fosforamidofluoridát (A-234, 86 %) [CAS 2387496-06-0], *S*-[2-(diisopropylamino)ethyl]-*O*-ethyl-methylfosfonothioát (VX, 92 %) [CAS 50782-69-9], *S*-[2-(diethylamino)ethyl]-*O*-(2-methylpropyl)-*P*-methylfosfonothioát (R-33, 73 %) [CAS 159939-87-4] (vše VVÚ Brno, Česká republika), LTQ Positive calibration solution (Thermo Scientific, USA), tributylfosfát PHR1205 Pharmaceutical standard 99,8 % [CAS 126-73-8] (Sigma-Aldrich, USA).



Pro analýzu byly všechny analyty připraveny v molární koncentraci 40  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Vzhledem k nízké tenzi par zkoumaných analytů bylo k dávkování analytu zvoleno vážení na analytických vahách SAG 285 /M (Mettler Toledo, Singapur) upravených pro vážení v digestoři s vysokým tlakovým spádem.

#### Rozpouštědla

Voda (Optima, USA) [CAS 7732-18-5], acetonitril (Optima, USA) [CAS 75-05-8], methanol (Biosolve) [CAS 67-56-1], kyselina mravenčí (Optima, USA) [CAS 64-18-6], kyselina octová (Optima, USA) [CAS 64-19-7], kyselina trifluoroctová (Optima, USA) [CAS 76-05-1] vše v čistotě LCMS.

#### Instrumentace

Jako kapalinový chromatograf byl použit Ultimate 3000 v konfiguraci sestávající se z vysokotlakého modulu HPG-3200SD opatřeného dvěma bočními ventily umožňujícími měření na dvou kolonách zároveň, dále z automatického dávkovače vzorků WPS-3000TLS ANALYTICAL a UV-Vis modulu DAD-3000. Kolony byly temperovány v modulu TCC-3000SD. Konfiguraci byl představen degasser SRD-3200 (vše Thermo Scientific, USA).

Jako hmotnostní detektor zapojený v tandemu s předchozí instrumentací byl použit robustní LTQ XL (Thermo Scientific, USA) systém s lineární iontovou pastí a iontovou optikou tvořenou kvadrupólem a oktapólem, jako iontový zdroj byla použita ESI hlava.

Rozprašovací plyn byl vytvářen generátorem dusíku GENIUS XE 35 (Peak, Scotland UK) s výchozím nastavením tlaku 100 psi. Jako kolizní plyn bylo použito stlačené hélium 5.0 (Linde, Česká republika).

#### Software

K ovládání HPLC systému byl použit Chromeleon 7.2.10 [komerční licence] a k ovládání LTQ XL XCalibur 4.5, kde vzájemná komunikace mezi těmito softwarovými moduly byla zajišťována serverovým rozhraním SII for XCalibur ve verzi 1.5.0.10747 [komerční licence]. Namě-

řená chromatografická data byla interpretována v jeho toolboxu QualBrowser, včetně snímání hmotnostních spekter.

K tvorbě kvantově-chemických grafických výstupů a výpočtu bylo použito softwaru Spartan 20' (Wavefunction Inc., USA) [akademická licence]. Neuronové sítě byly stavěny s použitím modulu Deep Learning – NeuralNetwork, který je součástí balíku MATLAB 2023a (MathWorks, USA) [Campus-Wide licence]. V MATLABu byly také tvořeny programové skripty pro analýzu neuronové sítě, které umožnily optimalizovat podmínky měření vybraných analytů.

Pro vytváření a ověřování fragmentačních diagramů byl využíván robustní software Mass Frontier 8.0 SR 1, kterého bylo také využito k interpretaci hmotnostních spekter (Thermo Scientific, USA) [komerční licence].

#### Volba deskriptorů pro neuronovou síť

Na základě potřeby optimalizovat poměr vstupních parametrů LC na výstupní signál neuronové sítě byly jako „vnější“ deskriptory zvoleny složení mobilní fáze (**B**), průtok mobilní fáze (**Q**) a intenzita průtoku mlčího plynu (**E**). Zároveň však byly, ve snaze postihnout vliv fyzikálně chemických vlastností molekuly, doplněny další intramolekulární „vnitřní“ deskriptory, vycházející z DFT analýzy analytu. Tyto vnitřní deskriptory (tab. I) zároveň plnily funkci rozlišujícího markeru, který umožňoval neuronové síti přiřadit k jí analyzovaným hodnotám tu konkrétní látku, které tyto hodnoty patří.

Pro vytváření neuronové sítě byl použit softwarový prostředek MATLAB a jeho Deep Learning Toolbox. Byla navržena topologie sítě (obr. 2) s jednou vstupní vrstvou obsahující sedm deskriptorů (**B**, **Q**, **E**, **L**, **H**, **D**, **S**) s následující skrytou neuronovou vrstvou obsahující vícevrstvý perceptron o 50 vrstvách. Jako aktivační funkce skryté vrstvy byla zvolena hyperbolická tangenta. Výstupní vrstva obsahovala jeden target, reprezentovaný intenzitou signálu prekurzorového iontu.

Takto navržená neuronová síť byla trénována na 396 reálně naměřených vzorcích studovaných analytů tak, že

100 % souboru měření bylo použito jako data trénovací a načež data klasifikována jako testovací (28 dat od každého analytu), byla naměřena posléze a byla použita k ověření úspěšnosti natrénované sítě. Trénování bylo prováděno do té doby, dokud úspěšnost učení sítě na trénovacích datech a validace takovéto sítě na testovacích datech nedosáhla hodnoty alespoň 98 %. Jako trénovací algoritmus byla zvolena Bayesovská regulace.

#### Získávání experimentálních dat

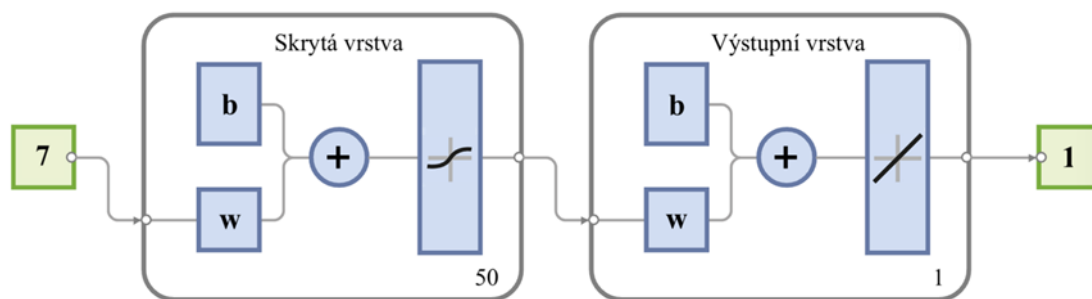
S použitím ovládacího programu XCalibur byl naprogramován proces dávkování vzorku tak, aby se měnily tři zásadní parametry měření – tedy složení mobilní fáze (**B**, [%]) reprezentované procentuálním obsahem acetonitrilu, dále průtok mobilní fáze (**Q**, [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]) a hodnota ShGFR (sheath gas flow rate) (**E**, [arb]). XCalibur také dával pokyn periférii hmotnostního detektoru načíst příslušný soubor obsahující ladění iontové optiky, která byla optimalizována na TBF.

Parametr **B** mohl nabývat hodnot 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 [%]. Parametr **Q** mohl nabývat hodnot 100, 200, 300 [ $\mu\text{l}$ ] a hodnota ShGFR se pohybovala v intervalu 10–40 [arb] s krokem 10 arb, tedy mohla nabývat čtyř hodnot. Celkem tak XCalibur vydal pokyn k proměření 132 možných kombinací těchto hodnot pro jeden analyt.

Pro realizaci měření tributyl-fosfátu, látky VX a látky A-235 tak bylo proměřeno 396 měření, která byla ještě třikrát reprodukována z důvodu kontroly stability sledova-

Tabulka I  
Veličiny získané DFT analýzou

	A-234	TBF	VX
LUMO, eV ( <b>L</b> )	1,77	1,9	1,61
HOMO, eV ( <b>H</b> )	-10,18	-12,51	-9,12
Dipólový moment, Debye ( <b>D</b> )	7,77	5,39	3,92
$S$ , $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ( <b>S</b> )	478,55	549,9	540,92



Obr. 2. Navržená topologie neuronové sítě určené pro učení se na experimentálních datech; **b** – bias (zesílení), **w** – weights (váhy)

ného signálu. Mobilní fáze nebyly nikterak modifikovány. Nastříkáván byl vždy objem 1  $\mu\text{l}$  analytu. Sledovaná intenzita hodnoty signálu prekurzorového iontu byla zaznamenávána do souboru.

Aby bylo možné celý proces automatizovat, byl systém nástřiku vzorku modifikován tak, aby zajistil konstantní podmínky všech měření, a to při minimální možné spotřebě analytu a mobilních fází. Toto bylo realizováno tak, že byl vzorek z autosampleru veden mimo kolonu a DAD, přímo do ESI. Dávkovací jehla byla promývána před a po nadávkování vodou o LCMS čistotě. Naměřené výsledky byly zaznamenávány do tabulky, odkud byly načteny neuronovou sítí a využity k jejímu tréninku.

## Výsledky a diskuse

Byl naprogramován skript v prostředí programu MATLAB, který umožňoval řídit natrénovanou neuronovou sítí a využít ji k interpolaci grafických dat s cílem získat vizualizace průběhu experimentu o mnohem větším rozlišení umožňujícím přesnější nalezení optima parametrů B, Q, a E. Tento posun v interpretaci je zobrazen v obr. 3.

Variací proměnné E, při všech možných kombinacích proměnných B a Q, byla získána taková její hodnota, kdy intenzita signálu prekurzorového iontu byla maximální a následně byla při této hodnotě odečtena optimální B<sub>opt</sub> a Q<sub>opt</sub>. V dalším kroku byla do systému zapojena kolona Accucore<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 2,1 mm  $\times$  150 mm  $\times$  2,6  $\mu\text{m}$ , která se

ukázala jako nejvhodnější pro eluci těchto skupin látek, které byly eluovány izokraticky podle jejich zjištěných optim v rámci simulace měření využitím neuronové sítě (tab. II).

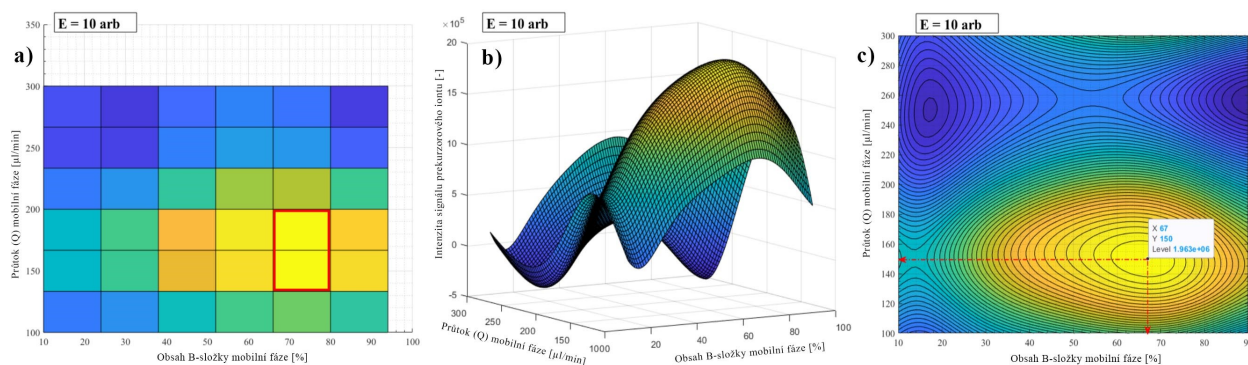
Následně byla provedena optimalizace kolizní energie tak, aby bylo možno sejmout kvalitní ms<sup>2</sup> spektrum látky A-234 a uložit jej do knihovny.

S cílem zlepšit ionizaci vzorku a získat tím ještě větší odezvu sledovaného signálu byla vodná mobilní fáze modifikována nejprve kyselinou mravenčí, pak octovou, a nakonec kyselinou trifluoroctovou, vždy v koncentraci 0,1 %. Zisk na intenzitě signálu či jeho úbytek lze nalézt v tab. III.

Na látce A-234 byla provedena analýza fragmentačních řad s využitím softwaru MassFrontier (obr. 4), se zjištěními, která nacházejí shodu se studií jiných autorů<sup>24</sup>.

Byla ověřena možnost vlivu hydrolyzy látky A-234 při kontaktu s mobilní fází o optimálním poměru složky A a B. Za předpokladu významného nadbytku mobilní fáze vůči analytu byla sledovaná hydrolyza považována za reakci 1. řádu, z čehož byl odvozen poločas rozpadu 4 h 49 min a konstatováno, že vzhledem ke kontaktu látky A-234 s mobilní fází v průběhu eluce na koloně nepřekračující celkový čas 30 min, lze považovat vliv hydrolyzy za zanedbatelný.

V rámci studia kinetiky hydrolyzy látky A-234 bylo zjištěno, že optimalizací souboru experimentů neuronovými sítěmi došlo ke zvýšení odezvy analytického systému v celkovém úhrnu o 1080 %. Mezi detekce se pro látku A-234 stala koncentrace řádově 1  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ , u látky VX



Obr. 3. Původní rozlišení naměřených dat (a), projekce simulace neuronové sítě do 3D (b), průmět do plochy Q, B (c) vše při E = 10 arb u látky A-234. Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy.

## Tabulka II

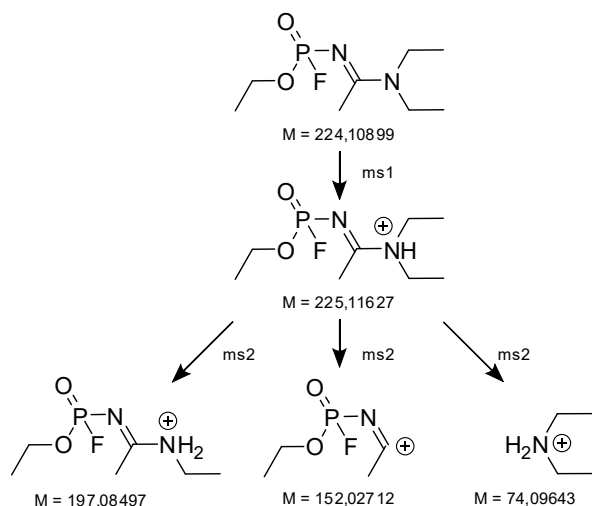
Optimální hodnoty deskriptorů pro maximalizaci hodnoty signálu iontu prekurzoru

Deskriptor	A-234	TBF	VX	R33
Obsah B-složky mobilní fáze B, %	33	51	62	38
Průtok mobilní fáze, $\mu\text{l min}^{-1}$	105	250	213	223
Hodnota ShGFR, arb	28,35	26,66	29,6	34,2

Tabulka III

Číselné vyjádření vlivu modifikátoru mobilní fáze na ionizaci analytu

Mobilní fáze	A-234	TBF	VX	R33
Mravenčí kyselina	+ 23 %	+ 15 %	+ 28 %	+29 %
Octová kyselina	+ 36 %	+ 12 %	+ 32 %	+30 %
Trifluoroctová kyselina	– 37 %	– 28 %	–35 %	–36 %

Obr. 4. Evoluce prekurzorového a produktových iontů v  $ms^2$  spektru látky A-234

10  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$  a u látky R-33 taktéž 1  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ , přičemž kritériem byl poměr signálu iontu použitého ke kvantifikaci ku pozadí v hodnotě velmi štědrých 10:1. Mez stanovitelnosti takto optimalizované metody lze tak předpokládat u poměru S/N 5:1 v řádu desítek  $\text{fg } \mu\text{l}^{-1}$ , což je dostatečná citlivost pro tolik potřebná stanovení ultrastopových množství sledovaných analytů.

## Závěr

Analytická a vědecká pracoviště se často potýkají s množstvím výsledků, kde vzájemnou provázanost nastavitelných podmínek měření a výstupních dat lze klasifikovat jako nelineární multidimenzionální problém. S rozmachem výpočetního výkonu se stávají popisované technologie stále více přístupnější a využitelné na rozličné oblasti výzkumu. Tato práce je návrhem aplikace neuronových sítí a DFT teorie na problém optimalizace podmínek měření tak, aby sledovaný výstupní signál byl co nejintenzivnější, což v důsledku umožňuje především zvyšovat citlivost identifikační metody. Tento soubor postupů umožňuje pro daný analyt vypracovat metodiku měření, která bude svou citlivostí využitelná nejen pro práci specialistů chemického vojska, ale i v jiných oborech vědeckého poznání.

## LITERATURA

- Bajgar J.: *Adv. Clin. Chem.* 38, 151 (2004).
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2002.
- Středa L.: *Fenomén jménem Novičok*. Tribun EU, Praha 2022.
- UN General Assembly Security Council: Report of the United Nations Mission to investigate allegations of the use of chemical weapons in the Syrian Arab Republic on the alleged use of chemical weapons in the Ghouta area of Damascus on 21 August 2013, A/67/997–S/2013/553 (2013).
- OPCW: Report of the OPCW fact-finding mission in Syria regarding alleged incidents in Ltamenah, the Ayrian Arab Republic 24 and 25 march 2017, S/1636/2018 (2018).
- OPCW: Decision: Chemical Weapons Incident in Kuala Lumpur, Malaysia, EC-84/DEC.8 (2017).
- Crowley M., Dando M., Shang L.: *Preventing Chemical Weapons: Arms Control and Disarmament as the Sciences Converge*. RSC, London 2018.
- Stone R.: *Science* 359, 1314 (2018).
- Vale J., Marrs A. T. C., Manynard R. L.: *Clin. Toxicol.* 56, 1093 (2018).
- Nepovidomova E., Kuča K.: *Arch. Toxicol.* 93, 11 (2019).
- Haláček E., Koblíha Z.: *Chem. Listy* 105, 323 (2011).
- Hoening S.: *Compendium of Chemical Warfare Agents*. Springer, New York 2007.
- Ellison D. H.: *Handbook of chemical and biological warfare agents*, 2 vyd. CRC Press, Florida 2007.
- Mirzayanov V. S.: *Russian Chemical Weapons Program: An Insider's Chronicle of the Russian Chemical Weapons Program*. Outskirts Press, Denver 2009.
- Carlsen L.: *Mol. Inf.* 38, 8 (2019).
- Husaini M. A. B.: *Int. J. Recent Technol. Engineering* 8, 3706 (2019).
- Üstün E., Koc S., Demir S., Özdemir I.: *J. Organomet. Chem.* 815, 16 (2016).
- Pach C., Berger T. C., Bonte T., Trentesaux D.: *Comput. Ind.* 65, 706 (2014).
- Atilgan A., Yurdakul S., Erdogdu Y., Güllüoğlu M. T.: *J. Mol. Struct.* 1161, 55 (2018).
- Bhakhua H., Rhyman L., Ramasami P.: *R. Soc. Open Sci.* 6, 2054 (2019).
- Khalfa A., Ferrari M., Fournet R., Sirjevan B., Verdier L., Glaude P. A.: *J. Phys. Chem. A* 119,

- 10527 (2015).
22. Li X., Wang H., Lv R., Wu W., Luo J., Tang Y.: *J. Phys. Chem. A* 113, 10335 (2015).
  23. Oudejans L.: EPA/600/S-19/074. US EPA, Washington DC 2019.
  24. Lee J. Y., Lee Y. H.: *J. Anal. Chem.* 69, 909 (2014).
  25. Tsuchihashi H., Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M.: *J. Anal. Toxicol.* 22, 383 (1998).
  26. Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 698, 81 (1997).
  27. Bryant P. J. R., Ford-More A. H., Perry B. J., Wardrop W. H., Watkins T. F.: *J. Chem. Soc.* 312, 1553 (1960).
  28. Sega G. A., Tomkins B. A., Griest W. H.: *J. Chromatogr. A* 790, 143 (1997).
  29. Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H., Yamashita M.: *J. Anal. Toxicol.* 32, 86 (1999).
  30. Hook G. L., Kimm G., Koch D., Savage P. B., Ding B., Smith P. A.: *J. Chromatogr. A* 992, 1 (2003).
  31. Mirbabaei F., Ali M. K., Taghi M., Babri N. M., Faraz S. M., Hosseini S. E., Ashrafi D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 414, 3429 (2022).
  32. Hebb D. O.: *The organization of behavior: a neuropsychological theory*, 2 vyd. J. Wiley, New York 1957.
  33. Gasteiger J., Zupan J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32, 503 (1993).
  34. <https://uk.mathworks.com/help/deeplearning/ug/wine-classification.html>, staženo 8. 11. 2023.
  35. Röse P., Gasteiger J.: *Anal. Chim. Acta* 235, 163 (1990).
  36. Tusar M., Rius F. X., Zupan J.: *Mitteilungsbl. - Ges. Dtsch. Chem., Fachgruppe Chem.-Inf.-Comput.* 19, 72 (1991).
  37. Zupan J., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* 239, 311 (1990).
  38. Otto M., Horcher U., Gasteiger J.: *Software Dev. Chem.* 4, 377 (1989).
  39. Kulichenko M., Smith J. S., Nebgen B.: *J. Phys. Chem. Lett.* 12, 6227 (2021).

**D. Trefilík** (*NBC Defence Institute, Vyškov, Czech Republic*): **Use of Modern Computational Methods and Neural Networks to Optimize Methods for LC/MS/MS Analysis of Military-Relevant Organophosphorus Compounds**

The search for the optimal instrumental settings of conditions in chemical analysis is typically a lengthy process. This article proposes the use of neural networks for this purpose, particularly in relation to determining the optimal conditions for the analysis of substances under study using LC/MS/MS and ESI technologies, based on the knowledge of their fundamental properties, referred to as universal descriptors. The work focuses on finding such analysis conditions that maximize the precursor ion signal. The paper specifically addresses the question of whether the results obtained from one type of analyte can be used for neural-interpolated prediction of optimal conditions for similar analytes.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: LC/MS/MS, neural networks, electron density functional theory, novichok, organophosphates, quantum chemistry, optimization



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.