

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Antonio Prlj

**Nova metoda multivarijatne analize
podataka spektrofotometrijske titracije**

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Vladislava Tomišića i neposrednim vodstvom dipl. ing. Gordana Horvata u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

Veliko hvala dipl. ing. Gordanu Horvatu na pomoći pri izradi ovog rada, kao i mentoru prof. dr. sc. Vladislavu Tomišiću na primjedbama i sugestijama koje su mi pomogle pri pisanju rada.

Sadržaj

§ 1. Uvod	1
§ 2. Teorijski dio.....	2
2.1. Multivarijatna analiza podataka spektrofotometrijske titracije	2
2.2. Spektrofotometrijska titracija	4
§ 3. Materijali i metode	6
§ 4. Rezultati i diskusija	7
4.1. Testiranje programa pomoću sintetskih podataka	7
4.2. Obrada podataka realne spektrofotometrijske titracije.....	12
§ 5. Struktura programa SCATCHARD.....	18
5.1. Unos podataka	18
5.2. Grafičko sučelje.....	19
§ 6. Zaključak	22
§ 7. Literatura	23
Sažetak	24
Abstract	25
Dodatak.....	26

§ 1. Uvod

Određivanje konstanti ravnoteže reakcije izuzetno je važno u kemiji¹ te je razvijen čitav niz odgovarajućih eksperimentalnih metoda². Ako je barem jedan od sudionika reakcije spektralno aktivan u UV-Vis području pogodno je određivanju konstante ravnoteže pristupiti metodom spektrofotometrijske titracije. Metoda se temelji na praćenju promjene apsorbancije prilikom promjene sastava reakcijske smjese te je dostupna u većini modernih kemijskih laboratorija.

Kompleksni spojevi često su intenzivno obojeni pa je spektrofotometrijska titracija pogodna za određivanje pripadnih konstanti ravnoteže kompleksiranja^{3,4}. Pri tome je posebno zanimljivo vezanje molekula liganda na biomakromolekule, što je važno za razumijevanje mnogih biokemijskih procesa u živoj stanici^{5,6}. U tom slučaju efektivni broj veznih mjesta (n) na makromolekuli može biti puno veći od jedan. Valja napomenuti da vrijednost n ponekad može i ukazivati da je neki od reaktanata onečišćen, tj. da mu je stvarna koncentracija u otopini niža od očekivane.

Do sada je razvijeno više komercijalnih programa za obradu podataka spektrofotometrijskih titracija, kao što su npr. HYPERQUAD⁷ i SPECFIT⁸. Njihov je nedostatak u tome što se pomoću njih ne mogu simultano određivati vrijednosti konstante ravnoteže i parametra n . U tu je svrhu u ovom radu razvijen program SCATCHARD pomoću kojeg se multivarijantnom obradom eksperimentalnih podataka mogu odrediti vrijednosti konstante ravnoteže i parametra n , a uz to i svojstveni spektri pojedinih vrsta u kemijskoj reakciji. Program je testiran na simuliranim spektrima za hipotetsku reakciju u kojoj su svi sudionici spektralno aktivni, pri čemu je na simulirane spektre superponirana normalno raspodijeljena pogreška. Također je dodatno testiran na podacima prikupljenim prilikom spektrofotometrijskog praćenja vezanja molekula bojila Coomassie Brilliant Blue na protein albumin iz goveđeg seruma. Pri tome je određena odgovarajuća konstanta ravnoteže, kao i efektivni broj veznih mjesta na proteinu. Program ima interaktivno grafičko sučelje, a napisan je u programskom paketu MATHEMATICA 7.0⁹.

§ 2. Teorijski dio

2.1. Multivarijantna analiza spektrofotometrijskih podataka¹⁰

Metoda spektrofotometrije temelji se na mjerenju intenziteta zrake određenog područja elektromagnetskog zračenja prije i nakon prolaska kroz reakcijsku smjesu. Smanjenje intenziteta zrake nakon prolaska kroz uzorak može se povezati s koncentracijom spektralno aktivne vrste preko Beer-Lambertovog zakona:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon(\lambda, T) \cdot c \cdot l \quad (1)$$

gdje je I intenzitet zrake nakon prolaska kroz uzorak, I_0 početni intenzitet zrake, ε molarni apsorpcijski koeficijent, A apsorbancija, c koncentracija vrste koja apsorbira, a l duljina optičkog puta. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji spektralno aktivne vrste, a faktori proporcionalnosti su molarni apsorpcijski koeficijent i duljina optičkog puta. Molarni apsorpcijski koeficijent ovisi o valnoj duljini, temperaturi i mediju u kojem se nalazi vrsta koja apsorbira.

Apsorbancije uzorka pri više valnih duljina čine spektar, koji se može izraziti u obliku vektora apsorbancija:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A(\lambda_1) \\ \cdot \\ \cdot \\ A(\lambda_i) \\ \cdot \\ \cdot \\ A(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon(\lambda_1) \\ \cdot \\ \cdot \\ \varepsilon(\lambda_i) \\ \cdot \\ \cdot \\ \varepsilon(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot c \cdot l. \quad (2)$$

U slučaju kada sustav sadrži više spektralno aktivnih vrsta, apsorpcijski spektar smjese jednak je zbroju spektara pojedinih komponenata:

$$\mathbf{a} = \mathbf{a}_1 + \dots + \mathbf{a}_j + \dots + \mathbf{a}_n, \quad (3)$$

što se u matričnom obliku može zapisati kao:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A(\lambda_1) \\ \cdot \\ \cdot \\ A(\lambda_i) \\ \cdot \\ \cdot \\ A(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) \cdot & \cdot & \varepsilon_j(\lambda_1) & \cdot & \cdot & \varepsilon_n(\lambda_1) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_1(\lambda_i) \cdot & \cdot & \varepsilon_j(\lambda_i) & \cdot & \cdot & \varepsilon_n(\lambda_i) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_1(\lambda_m) \cdot & \cdot & \varepsilon_j(\lambda_m) & \cdot & \cdot & \varepsilon_n(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ c_j \\ \cdot \\ \cdot \\ c_n \end{bmatrix} \cdot l. \quad (4)$$

Stupci matrice molarnih apsorpcijskih koeficijenata su svojstveni spektri pojedinih komponenta smjese.

Tijekom spektrofotometrijske titracije dodatkom titransa mijenjaju se ravnotežne koncentracije apsorbirajućih vrsta u reakcijskoj smjesi, a samim time i apsorbcije. Stoga se odgovarajući Beer-Lambertov zakon može napisati u matričnom obliku kao:

$$\begin{bmatrix} A_1(\lambda_1) & \dots & A_h(\lambda_1) & \dots & A_k(\lambda_1) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ A_1(\lambda_i) & \dots & A_h(\lambda_i) & \dots & A_k(\lambda_i) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ A_1(\lambda_m) & \dots & A_h(\lambda_m) & \dots & A_k(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \dots & \varepsilon_j(\lambda_1) & \dots & \varepsilon_n(\lambda_1) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_1(\lambda_i) & \dots & \varepsilon_j(\lambda_i) & \dots & \varepsilon_n(\lambda_i) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_1(\lambda_m) & \dots & \varepsilon_j(\lambda_m) & \dots & \varepsilon_n(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_{11} & \dots & c_{1h} & \dots & c_{1k} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ c_{j1} & \dots & c_{jh} & \dots & c_{jk} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ c_{n1} & \dots & c_{nh} & \dots & c_{nk} \end{bmatrix} \cdot l. \quad (5)$$

Matrica molarnih apsorpcijskih koeficijenata jednaka je onoj u jednadžbi (4) jer se radi o intrinzičnom svojstvu tvari, dok stupci matrice apsorbcija i koncentracija odgovaraju različitim dodacima titransa. Jednadžbu (5) može se zapisati skraćeno kao:

$$\mathbf{A} = \mathbf{E} \mathbf{C} l, \quad (6)$$

gdje je \mathbf{E} matrica molarnih apsorpcijskih koeficijenata, a \mathbf{C} matrica ravnotežnih koncentracija.

Ako su tijekom spektrofotometrijske titracije određene apsorbcije pri više valnih duljina (matrica \mathbf{A}), moguće je provesti iterativni postupak u kojem se računaju vrijednost konstante ravnoteže reakcije i molarni apsorpcijski koeficijenati reaktanata i produkata. Prvo se pretpostavi neka vrijednost konstante ravnoteže (K) iz koje se za zadani model reakcije izračuna matrica \mathbf{C} . Zatim se matrica apsorbcija (podijeljena s duljinom optičkog puta l) množi s pseudoinverzom matrice koncentracija čime se metodom najmanjih kvadrata dobiva matrica molarnih apsorpcijskih koeficijenata \mathbf{E} :

$$(\mathbf{A}/l) \mathbf{C}^T (\mathbf{C}\mathbf{C}^T)^{-1} = \mathbf{E}. \quad (7)$$

Množenjem te matrice s matricom koncentracija i duljinom optičkog puta dobiva se nova matrica apsorbancija A' :

$$A' = ECl. \quad (8)$$

Nakon toga se računa suma kvadrata odstupanja A' od A :

$$SS = \sum_i \sum_j (A'_{ij} - A_{ij})^2. \quad (9)$$

Postupak utočnjavanja konstante ravnoteže svodi se na variranje vrijednosti konstante sve dok suma kvadrata odstupanja SS ne postigne minimalnu vrijednost (tj. dok se ne zadovolji zadani kriterij konvergencije). U ovdje razvijenom programu osim konstante ravnoteže određivana je i vrijednost efektivnog broja veznih mjesta n , koja je uključena u jednadžbe koje odgovaraju pretpostavljenom reakcijskom modelu.

Za traženja minimuma sume kvadrata odstupanja u dvodimenzionalnom prostoru razapetom parametrima K i n korištena je modifikacija algoritma Simplex¹¹. Metoda se temelji na uzastopnom generiranju skupa točaka iz kojeg se u svakoj iteraciji izdvoji ona s najnižom funkcijskom vrijednošću. U njenoj se bliskoj okolini formiraju nove točke, pri čemu se provodi postupna kontrakcija. U konačnici se dobivaju optimalne vrijednosti konstante ravnoteže i efektivnog broja veznih mjesta (u skladu sa zadanim konvergencijskim kriterijem).

2.2. Spektrofotometrijska titracija

Promotrimo reakcijski model $A + B \rightleftharpoons AB$ gdje bilo koji od reaktanata može biti titrans u spektrofotometrijskoj titraciji. Dodatkom titransa u reakcijsku smjesu mijenjaju se ravnotežne koncentracije sudionika reakcije. Ako su $c_{A,h}$ i $c_{B,h}$ početne (analitičke) koncentracije A i B za h -ti dodatak titransa u reakcijsku smjesu, ravnotežne koncentracije A i B dane su jednadžbama:

$$[A_h] = c_{A,h} - [AB_h] \quad (10)$$

$$[B_h] = c_{B,h} - [AB_h], \quad (11)$$

dok je ravnotežna koncentracija vrste AB dana kao (u fizikalnom smislu) realno rješenje jednadžbe:

$$K = \frac{[AB_h]}{(c_{A,h} - [AB_h]) \cdot (c_{B,h} - [AB_h])}, \quad (12)$$

izrazom:

$$[AB_h] = \frac{c_{A,h} + c_{B,h} + 1/K - \sqrt{(c_{A,h} + c_{B,h} + 1/K)^2 - 4 \cdot c_{A,h} \cdot c_{B,h}}}{2}. \quad (13)$$

Iz jednadžbe (5) slijedi da je svaki član matrice apsorbancija jednak zbroju apsorbancija svih komponenata:

$$A_h(\lambda_i) = \varepsilon_A(\lambda_i) \cdot [A_h] + \varepsilon_B(\lambda_i) \cdot [B_h] + \varepsilon_{AB}(\lambda_i) \cdot [AB_h]. \quad (14)$$

Uvede li se efektivni broj veznih mjesta n kao dodatni parametar, potrebno je korigirati gornje jednadžbe. Uzme li se npr. da vrsta B ima n nezavisnih veznih mjesta, jednadžba (13) poprima oblik:

$$[AB_h] = \frac{c_{A,h} + n \cdot c_{B,h} + 1/K - \sqrt{(c_{A,h} + n \cdot c_{B,h} + 1/K)^2 - 4 \cdot n \cdot c_{A,h} \cdot c_{B,h}}}{2}, \quad (15)$$

a jednadžba (14):

$$A_h(\lambda_i) = \varepsilon_A(\lambda_i) \cdot (c_{A,h} - [AB_h]) + \varepsilon_B(\lambda_i) \cdot (n \cdot c_{B,h} - [AB_h]) + \varepsilon_{AB}(\lambda_i) \cdot [AB_h]. \quad (16)$$

Valja napomenuti da u novoj notaciji $[B_h]$ poprima značenje ravnotežne koncentracije slobodnih veznih mjesta, a $[AB_h]$ popunjenih veznih mjesta vrste B.

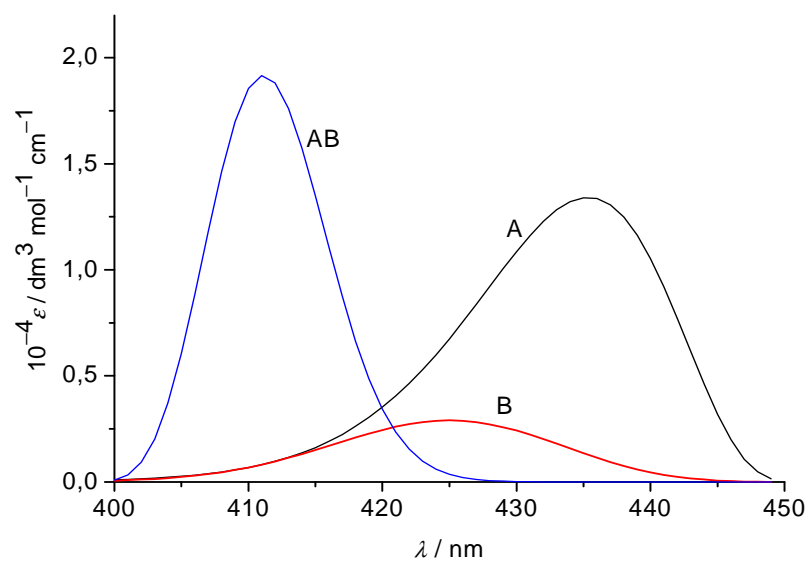
§ 3. Materijali i metode

Provedena je spektrofotometrijska titracija bojila Coomassie Brilliant Blue (CBB) s proteinom albuminom iz goveđeg seruma (Bovine Serum Albumin; BSA). Otopina CBB priređena je otapanjem 16 mg krutog CBB G-250 (Merck) u 250 mL otapala. Otapalo je priređeno dodatkom 20 mL 96% etanola i 40 mL 85% fosforne kiseline u tikvicu od 250 mL, te razrijeđeno vodom do oznake¹². Otopina albumina priređena je otapanjem 167 mg BSA (Sigma-Aldrich) u 10 mL vode te razrijeđena 100 puta. Otopine CBB i BSA pomiješane su u kivetama volumena 4 mL, tako da je koncentracija CBB održavana konstantnom, a koncentracije BSA varirane u rasponu omjera $c(\text{BSA}) / c(\text{CBB})$ od 0 do 0,015. Kako bi se u reakcijskoj smjesi uspostavila ravnoteža nakon miješanja reaktanata potrebno je čekati oko 15 min. Spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm pri temperaturi $(25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ pomoću UV-Vis spektrometra Varian Cary 5 opremljenog termostatom.

§ 4. Rezultati i diskusija

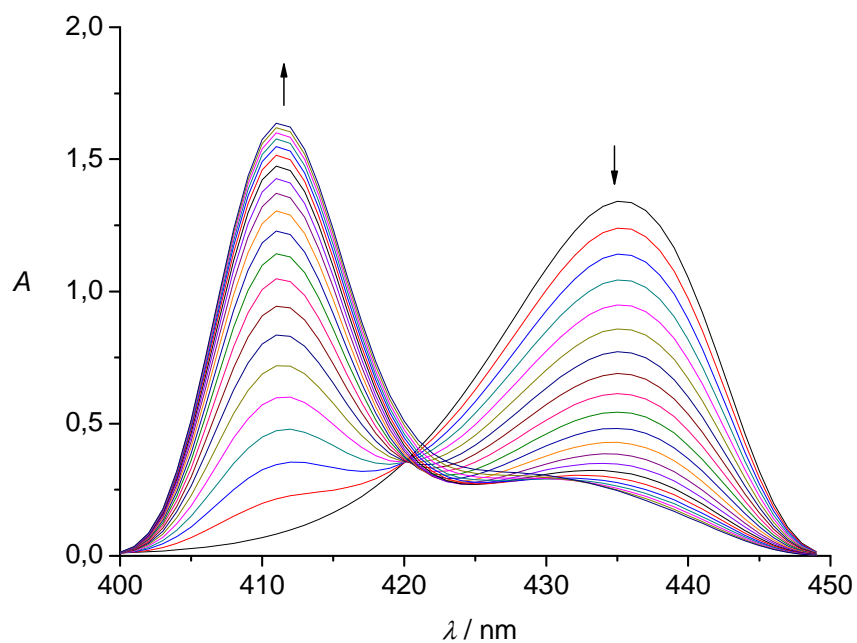
4.1. Testiranje programa pomoću sintetskih podataka

Simulirani svojstveni spektri triju spektralno aktivnih vrsta A, B i AB pri 50 valnih duljina generirani su pomoću programa OriginPro 7.5 (slika 1).



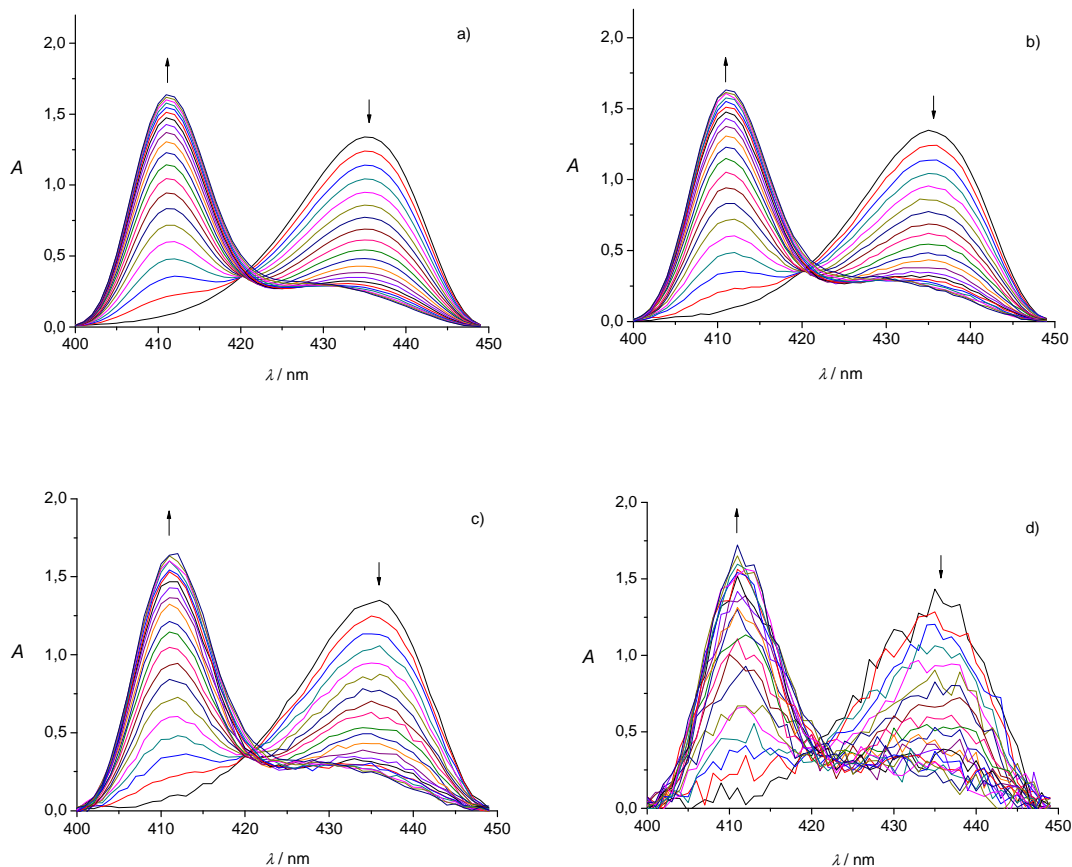
Slika 1. Simulirani svojstveni spektri triju spektralno aktivnih vrsta

Uz pretpostavku da se radi o sudionicima reakcije $A + B \rightleftharpoons AB$ iz svojstvenih spektara simulirani su spektri reakcijskih smjesa koji odgovaraju hipotetskoj spektrofotometrijskoj titraciji (slika 2). Podaci su generirani za vrijednosti konstante ravnoteže $K = 1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i broja veznih mjesta na vrsti B, $n = 2$.



Slika 2. Simulirani spektri za hipotetsku spektrofotometrijsku titraciju za reakciju $A + B \rightleftharpoons AB$; $K = 1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i $n = 2$; svojstveni spektri dani su na slici 1

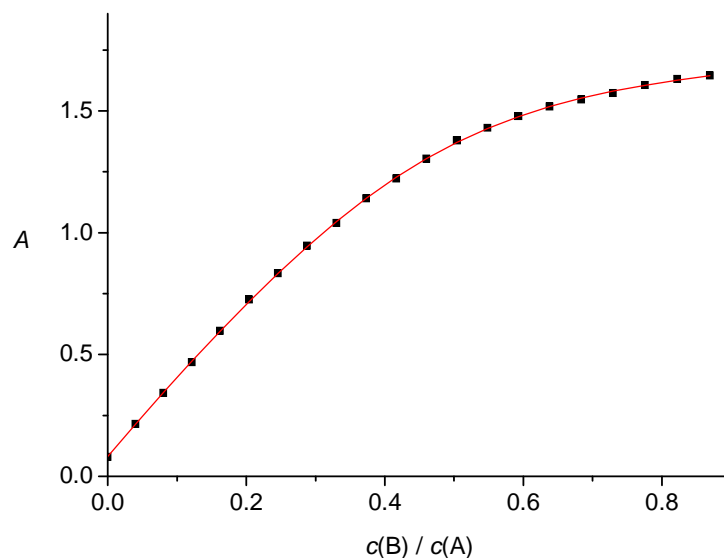
Dodavanjem slučajne pogreške dobiveni su simulirani spektri koji se mogu usporediti sa stvarnim eksperimentalnim podacima. Program SCATCHARD testiran je na spektrima sa superponiranom normalno raspodijeljenom pogreškom s očekivanom vrijednosti 0 i standardnim devijacijama $\sigma = 0,001, 0,005, 0,01$ i $0,05$ (slika 3).



Slika 3. Simulirani spektri spektrofotometrijske titracije sa superponiranim normalno raspodijeljenim pogreškama sa standardnim devijacijama: a) $\sigma = 0,001$, b) $\sigma = 0,005$, c) $\sigma = 0,01$, d) $\sigma = 0,05$; $K = 1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i $n = 2$; svojstveni spektri prikazani su na slici 1

Obradom podataka ovisnosti apsorbancije o koncentraciji titransa pri jednoj valnoj duljini moguće je procijeniti približne vrijednosti konstante ravnoteže i parametra n . Pri tome je poželjno odabrati valnu duljinu pri kojoj je ukupna promjena apsorbancije najveća.

Na slici 4 prikazana je ovisnost apsorbancije o omjeru analitičkih koncentracija titransa i titranda pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije za spektre sa superponiranom pogreškom kojoj je $\sigma = 0,005$.



Slika 4. Ovisnost apsorbancije pri valnoj duljini 411 nm o omjeru analitičkih koncentracija reaktanata za simulirane spektre, $\sigma = 0,005$ (slika 3b); ■ simulirane vrijednosti, — vrijednosti izračunate pomoću programa SCATCHARD

Rezultati obrade spektara simuliranih titracija (slika 3) prikazani su u tablici 1. Vrijednosti konstante ravnoteže i parametra n dane su kao aritmetičke sredine niza izračunatih vrijednosti, pri čemu je za svako “mjerenje“ superponirana različita slučajna pogreška.

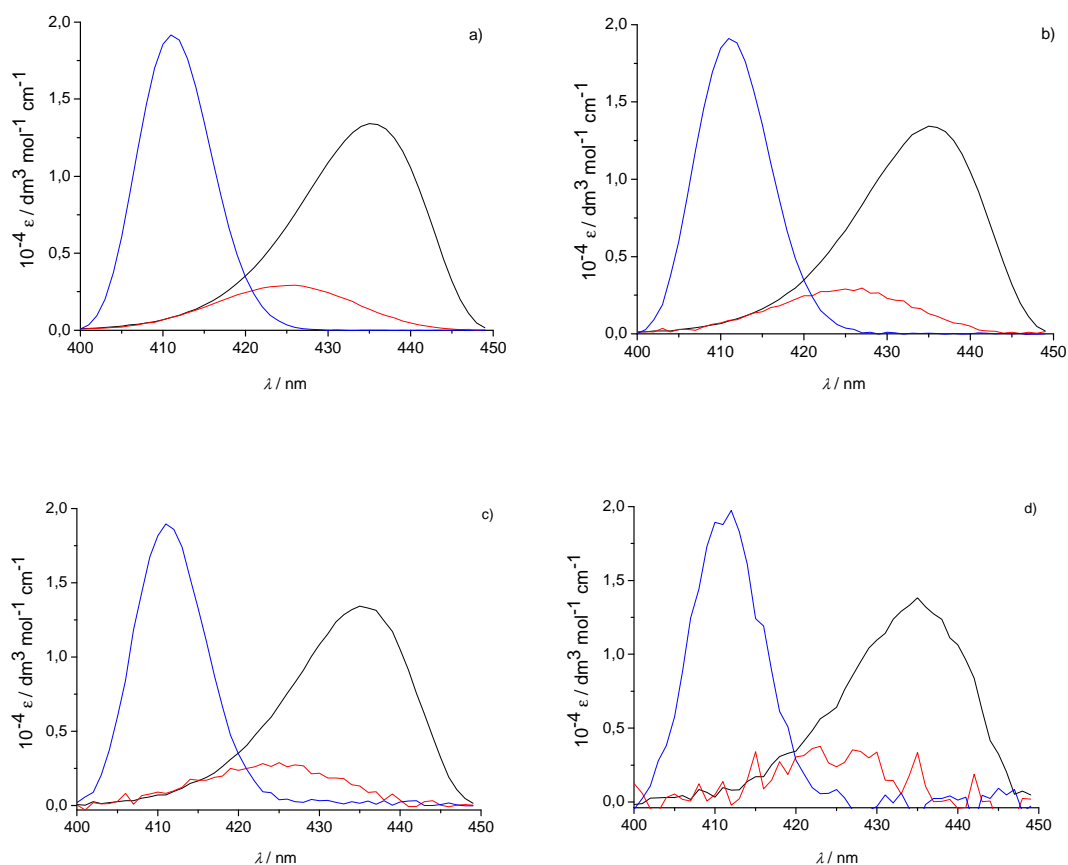
Tablica 1. Rezultati optimizacije konstante ravnoteže i parametra n za simulirane spektre spektrofotometrijske titracije

σ	0,001	0,005	0,01	0,05
$10^5 (K \pm SE) / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	$1,000 \pm 0,002$	$1,01 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,1$
n	$2,000 \pm 0,001$	$2,002 \pm 0,004$	$1,998 \pm 0,006$	$2,01 \pm 0,03$

SE – standardna pogreška aritmetičke sredine

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da program daje zadovoljavajuće vrijednosti konstante ravnoteže i parametra n , čak i za spektre na koje je superponirana prilično velika pogreška ($\sigma = 0,05$) koja nije realna u uobičajenoj spektrofotometriji. Može se zaključiti kako predložena metoda i odgovarajući računalni program daju vrlo točne rezultate, čak i za eksperimentalne podatke manje kvalitete.

Na slici 5 prikazani su izračunati svojstveni spektri. Superponirana pogreška očituje se u povećanom spektralnom šumu, ali se oblik krivulja ne mijenja u odnosu na svojstveni spektar pomoću kojeg je simulacija izvedena (slika 1).

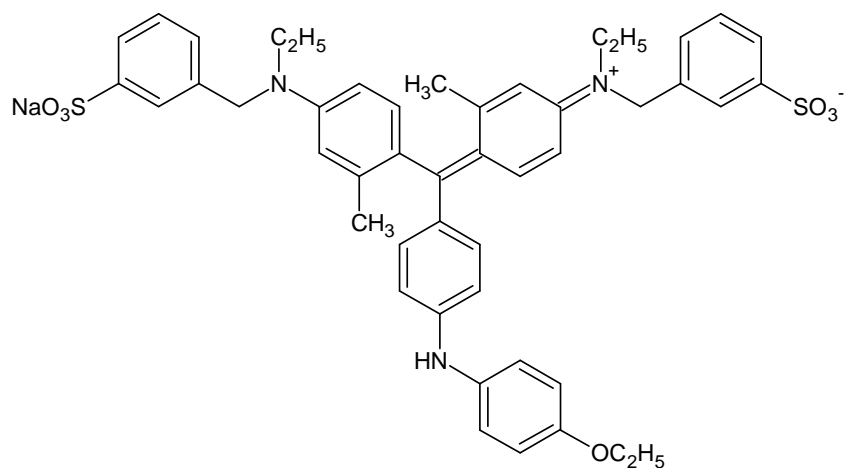


Slika 5. Svojstveni spektri sudionika reakcije $A + B \rightleftharpoons AB$ izračunati iz spektara simuliranih spektrofotometrijskih titracija (slika 3)

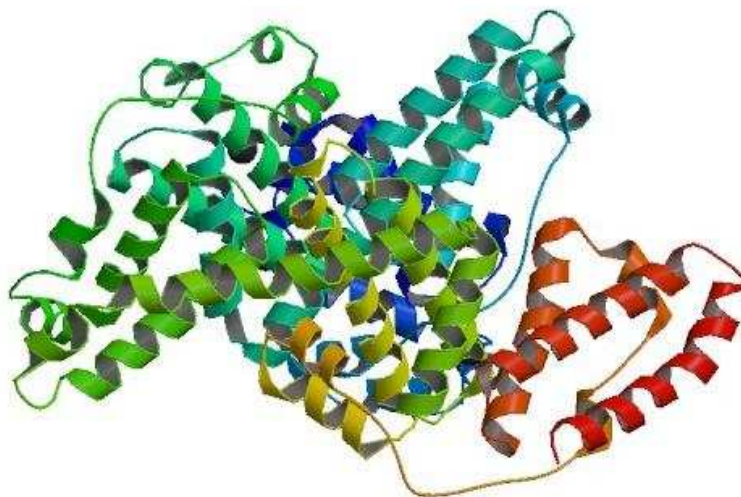
Treba napomenuti da pouzdanost rezultata može ovisiti i o konvergencijskom kriteriju te o početnim parametrima za optimizaciju koje je moguće podesiti preko interaktivnog grafičkog sučelja programa SCATCHARD. Moguće je i ograničiti raspon valnih duljina ukoliko postoji pretpostavka da bi to dalo pouzdaniji rezultat. Ako je vrijednost parametra n za neki istraživani sustav već poznata, ona se može fiksirati tako da se računaju samo vrijednost konstante ravnoteže i molarni apsorpcijski koeficijenti sudionika reakcije.

4.2. Obrada podataka realne spektrofotometrijske titracije

Provedena je spektrofotometrijska titracija bojila Coomassie Brilliant Blue (CBB) s proteinom albuminom iz govedeg seruma (BSA), te su rezultati analizirani pomoću programa SCATCHARD. Strukture liganda (CBB) i proteina (BSA) prikazane su na slikama 6 i 7.

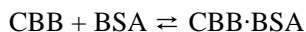


Slika 6. Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB); molekulska masa 854 Da



Slika 7. Albumin iz govedeg seruma (BSA); molekulska masa 68000 Da

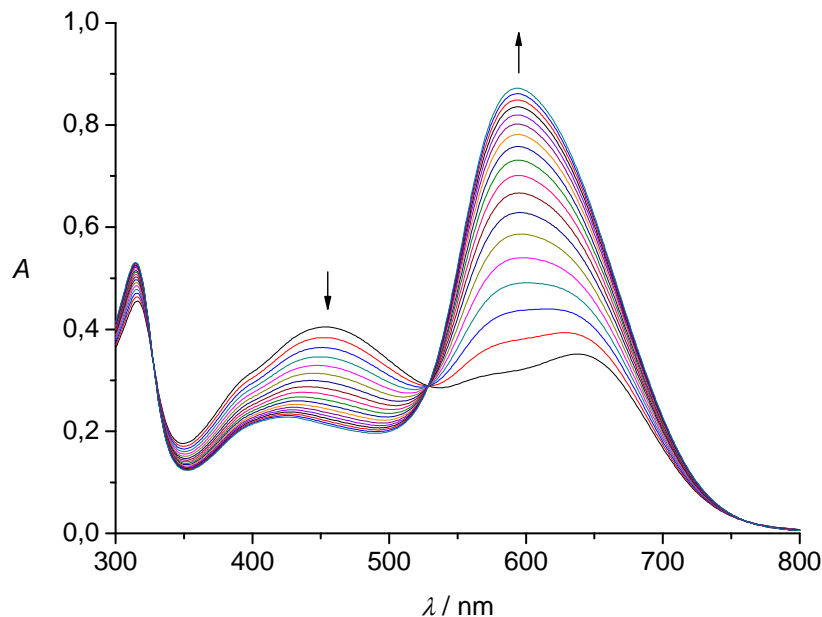
Korištenje CBB za vizualizaciju proteina uobičajeno je u biokemijskim eksperimentima^{13,14}. U kiselom mediju slobodni CBB je crvene boje, a vezanjem na protein boja se mijenja u intenzivno plavu. Interakcije do kojih dolazi su nekovalentne, a vezanje je reverzibilno:



(crvena boja) (plava boja)

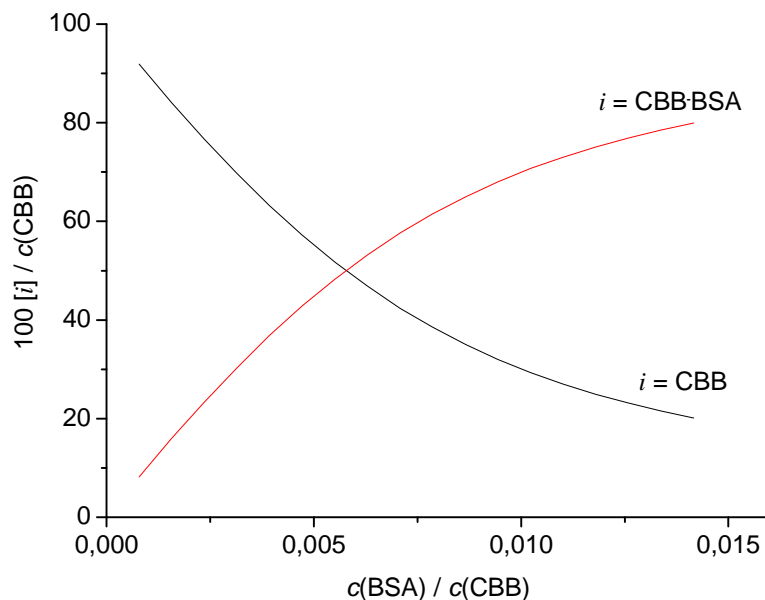
Promjena boje može se pratiti spektrofotometrijski, čak i uz relativno niske koncentracije proteina. CBB se može vezati na gotovo sve proteine¹⁵, a promjena apsorbancije uobičajeno se prati pri valnoj duljini 595 nm, što je valna duljina maksimalne promjene apsorbancije¹⁶. U ovom je radu promjena apsorbancije uslijed vezanja molekula CBB na BSA mjerena u širokom rasponu valnih duljina. Multivarijantnim pristupom su iz cjelokupnih spektralnih podataka izračunati konstanta ravnoteže kompleksiranja, efektivni broj veznih mjesta na BSA te svojstveni spektri svih prisutnih spektralno aktivnih vrsta.

Spektri sakupljeni prilikom titracije otopine CBB s BSA prikazani su na slici 8.

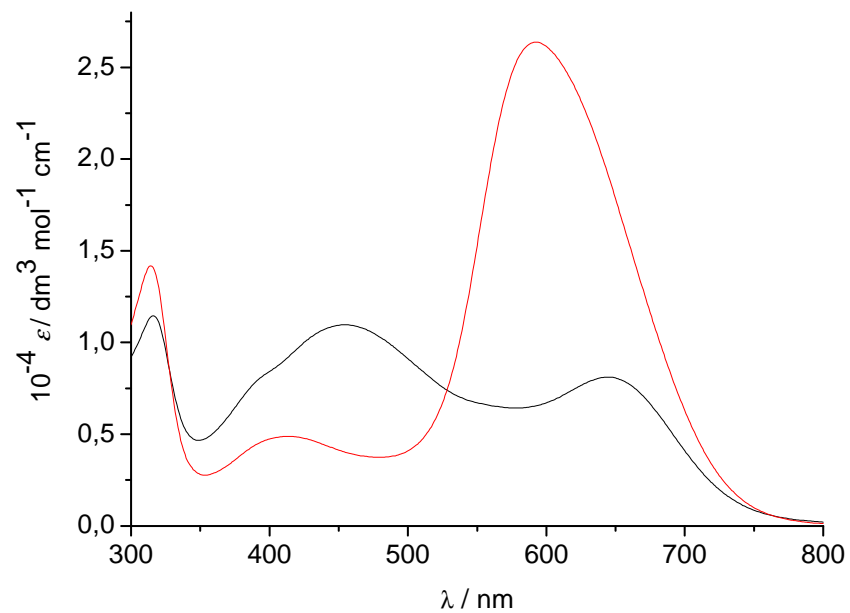


Slika 8. Spektrofotometrijska titracija CBB s BSA; $c_0(\text{CBB}) = 3,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Obradom podataka pomoću programa SCATCHARD dobivene su vrijednosti konstante ravnoteže kompleksiranja $K = 9,2 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i broja veznih mjesta $n = 135$. Odgovarajući distribucijski dijagram prikazan je na slici 9. Izračunati su i svojstveni spektri CBB i kompleksa CBB·BSA, koji su prikazani na slici 10. Treba napomenuti da protein BSA ne apsorbira u području valnih duljina korištenom u ovom radu¹⁷.

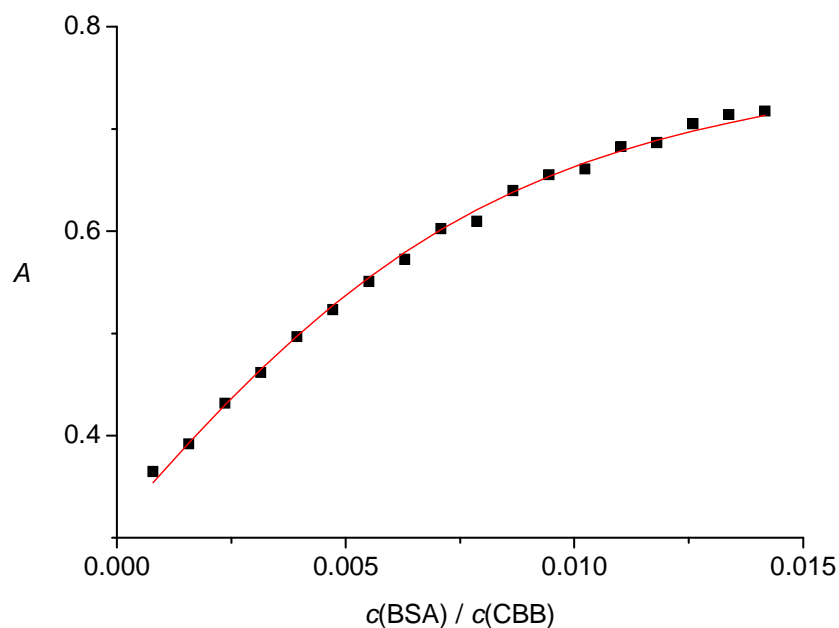


Slika 9. Distribucijski dijagram za spektrofotometrijsku titraciju CBB s BSA; $c_0(\text{CBB}) = 3,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



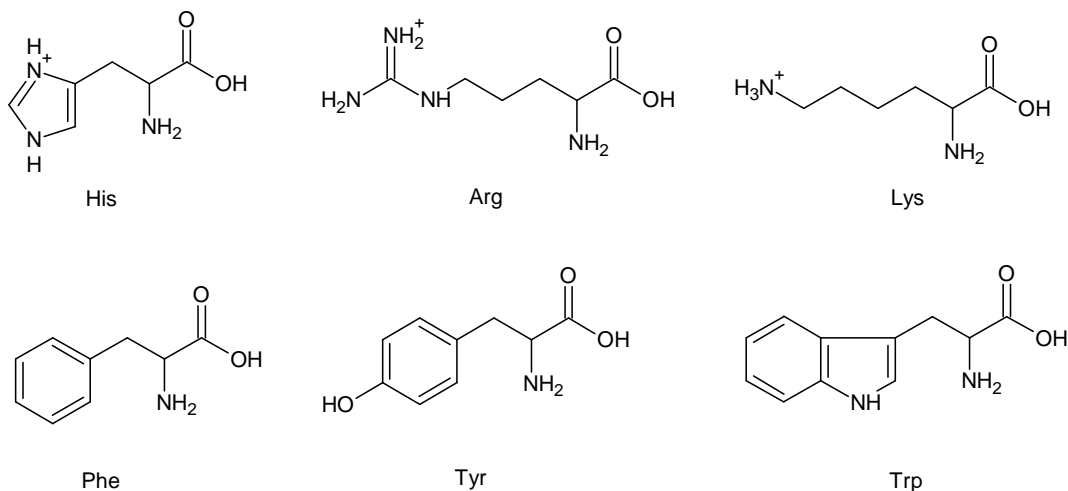
Slika 10. Izračunati svojstveni spektri CBB (—) i kompleksa CBB·BSA (—) obradom spektara prikazanih na slici 8

Na slici 11 prikazana je ovisnost apsorbancije o omjeru analitičkih koncentracija BSA i CBB pri valnoj duljini 637 nm. Može se uočiti vrlo dobro slaganje između eksperimentalnih i izračunatih podataka.



Slika 11. Ovisnost apsorbancije pri 637 nm o omjeru analitičkih koncentracija BSA i CBB; $c_0(\text{CBB}) = 3,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; ■ izmjereni podaci, — vrijednosti izračunate pomoću programa SCATCHARD

Kako bi se rastumačili dobiveni rezultati potrebno je detaljnije razmotriti samu reakciju. Općenito očekujemo da je vezanje malih molekula (liganada) na makromolekule vrlo složen proces⁵. Makromolekule uobičajeno imaju veći broj veznih mjesta na koja se ligandi vežu različitom jačinom i specifičnošću. Vezanje može dovesti do konformacijskih promjena koje utječu na druga vezna mjesta^{5,6}. Tako u slučaju vezanja molekula CBB na BSA Sohl i Splittgerber¹⁸ razlikuju jaka (primarna) i slaba (sekundarna) vezna mjesta. Smatra se da CBB stvara jaku interakciju s pozitivno nabijenim aminokiselinama lizinom, histidinom i argininom, a slabiju interakciju s aromatskim aminokiselinama fenilalaniom, tirozinom i triptofanom (strukture su prikazane na slici 12). U prvom slučaju dolazi do ionske interakcije pozitivno nabijenih lanaca aminokiselina i negativno nabijenih sulfonatih skupina CBB, dok se u drugom slučaju ostvaruju hidrofobne interakcije između aromatskih prstenova.



Slika 12. Strukture histidina, arginina, lizina, fenilalanina, tirozina i triptofana

U koncentracijskom području u kojem su u ovom radu snimljeni spektri mogu se očekivati obje vrste vezanja. Stoga ima smisla govoriti o prosječnoj konstanti ravnoteže kompleksiranja i efektivnom broju veznih mjesta. Proteini imaju složenu trodimenzionalnu strukturu te se vezna mjesta nalaze na površini ili blizu površine. Ipak, treba imati na umu da tijekom procesa vezanja CBB dolazi do značajne denaturacije proteina¹⁹, pri čemu su aminokiseline izloženije u odnosu na nativnu strukturu. Primarna struktura BSA²⁰ sadrži 16 His, 26 Arg, 60 Lys, 30 Phe, 21 Tyr i 3 Trp, tj. ukupno 156 aminokiselinskih ostataka koji mogu tvoriti interakciju s molekulama CBB. Taj se broj može povezati s izračunatim efektivnim brojem veznih mjesta^{21,22}, $n = 135$, koji se zbog složenosti promatranog sustava nešto razlikuje.

§ 5. Struktura programa SCATCHARD

5.1. Unos podataka

Eksperimentalni podaci učitavaju se pomoću tekstualnih datoteka. Datoteka *spektri.txt* (tablica 2) sadrži podatke o apsorbcijama. Retci predstavljaju apsorbcije pri jednoj valnoj duljini, a stupci apsorbcije pri različitim valnim duljinama za isti omjer analitičkih koncentracija titransa i titranda.

Tablica 2. Format datoteke *spektri.txt*; u prvom stupcu su zapisane valne duljine, a u nastavku matrica apsorbcija

401	0,018001	0,015169	0,012718	0,010664	
402	0,056198	0,047356	0,0397	0,033291	
403	0,127053	0,107064	0,089763	0,07526	
404	0,234208	0,197362	0,165469	0,138743	...
405	0,375014	0,316016	0,264949	0,222156	
406	0,541651	0,456436	0,382678	0,320871	
407	0,723092	0,609333	0,51086	0,428356	
408	0,907179	0,764458	0,640925	0,537407	
		...			

Pripadne koncentracije unose se u datoteci *koncentracije.txt* (tablica 3).

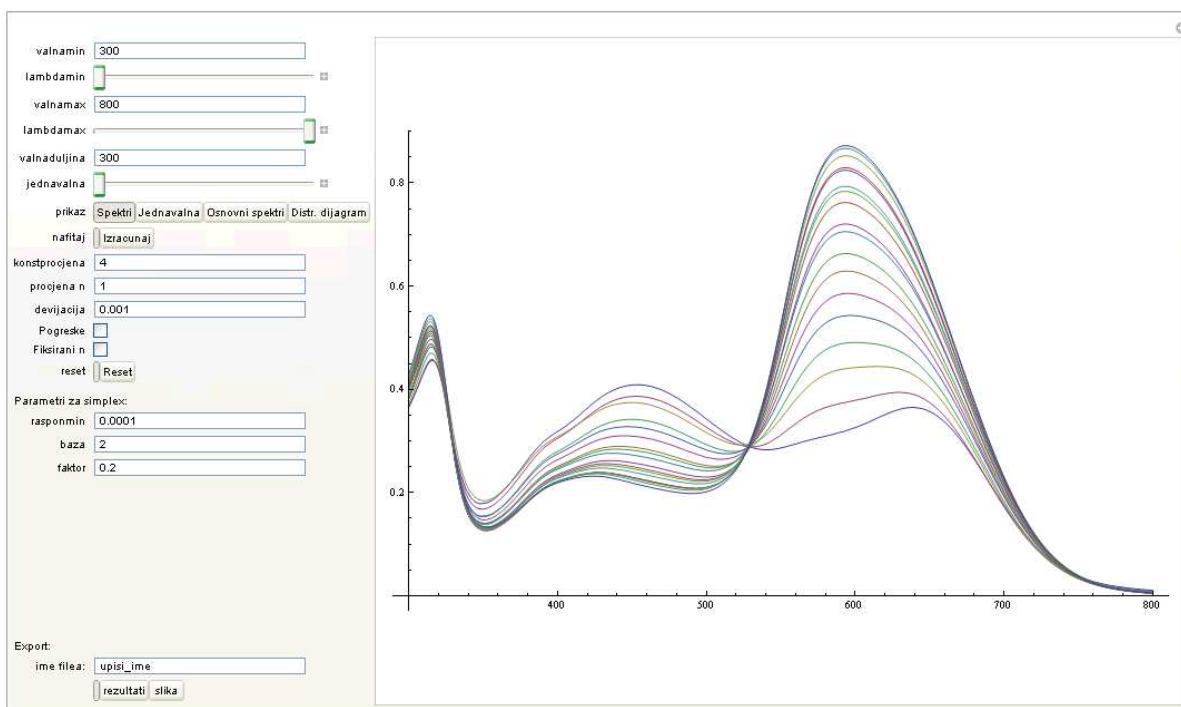
Tablica 3. Format datoteke *koncentracije.txt*; u prvom stupcu su analitičke koncentracije titranda, a u drugom titransa

0,0002	0
0,0001999	0,000024988
0,000199800	0,00004995
0,000199700	0,000074888
0,000199601	0,000099800
0,000199501	0,000124688
0,000199402	0,000149551
0,000199302	0,00017439
...	...

Prilikom učitavanja podataka potrebno je definirati u kojem se direktoriju nalaze datoteke.

5.2. Grafičko sučelje

Grafičko sučelje programa sastoji se od izbornika i grafičkog prikaza (slika 13).



Slika 13. Grafičko sučelje programa SCATCHARD

Izbornik:

valnamin i *valnamax* – granične vrijednosti raspona valnih duljina za koji želimo provesti račun optimizacije; vrijednosti se namještaju pomoću *slidera* (*lambdamin* i *lambdamax*)

valnaduljina – valna duljina za procjenu početnih vrijednosti konstante ravnoteže i efektivnog broja veznih mjesta; vrijednost se namješta pomoću *slidera* (*jednavalna*), a kriterij izbora temelji se na prikazu promjene apsorbancije pri jednoj valnoj duljini

prikaz – grafički prikaz spektara (*Spektri*), promjene apsorbancije u ovisnosti o omjeru analitičkih koncentracija titransa i titranda (*Jednavalna*), svojstvenih spektara sudionika reakcije (*Osnovni spektri*) te distribucijskog dijagrama (*Distr. Dijagram*); prikazani su redom na slikama 13 - 16

nafitaj – odabirom *Izračunaj* pokreće se optimizacijski račun uz početne procjene ovisno o položaju *slidera Jednavalna* i vrijednostima *konstprocjena* i *procjena n*

konstprocjena – procjena konstante ravnoteže reakcije na dekadskoj logaritamskoj skali

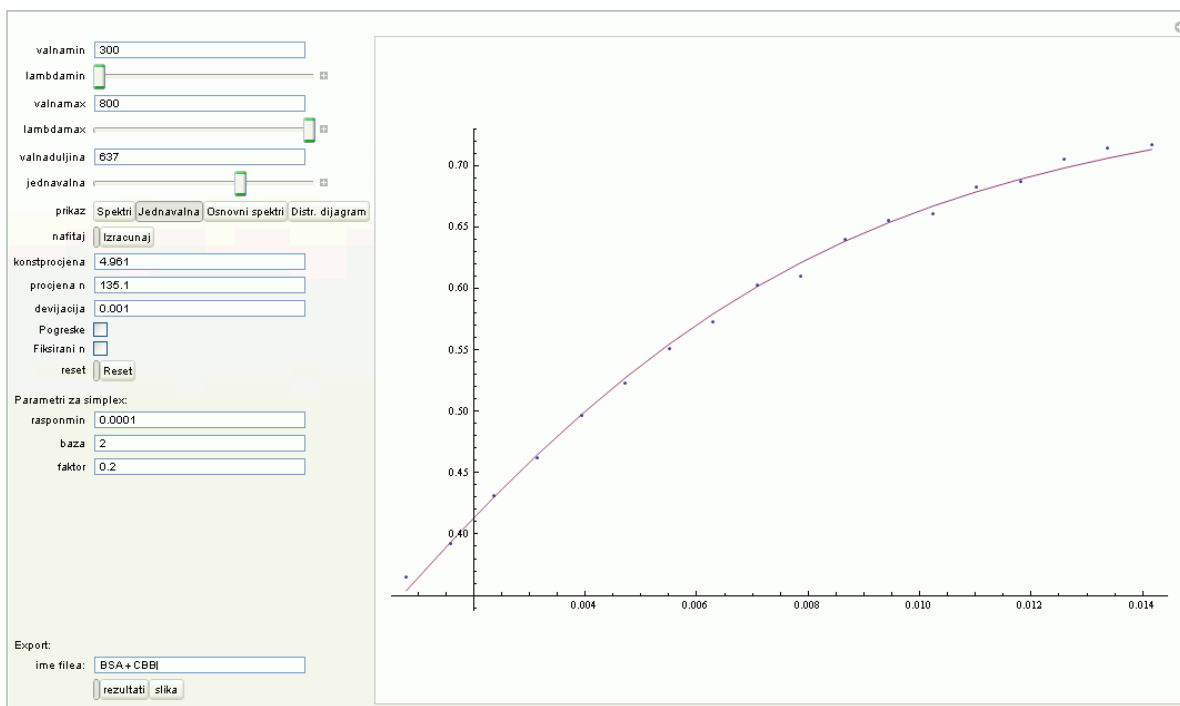
procjena n – procjena vrijednosti parametra n ; ako je vrijednost već poznata moguće ju je fiksirati (*Fiksirani n*) te se u tom slučaju računaju samo vrijednosti konstante ravnoteže i molarnih apsorpcijskih koeficijentata

reset – vraća *konstprocjena* i *procjena n* na zadane početne vrijednosti

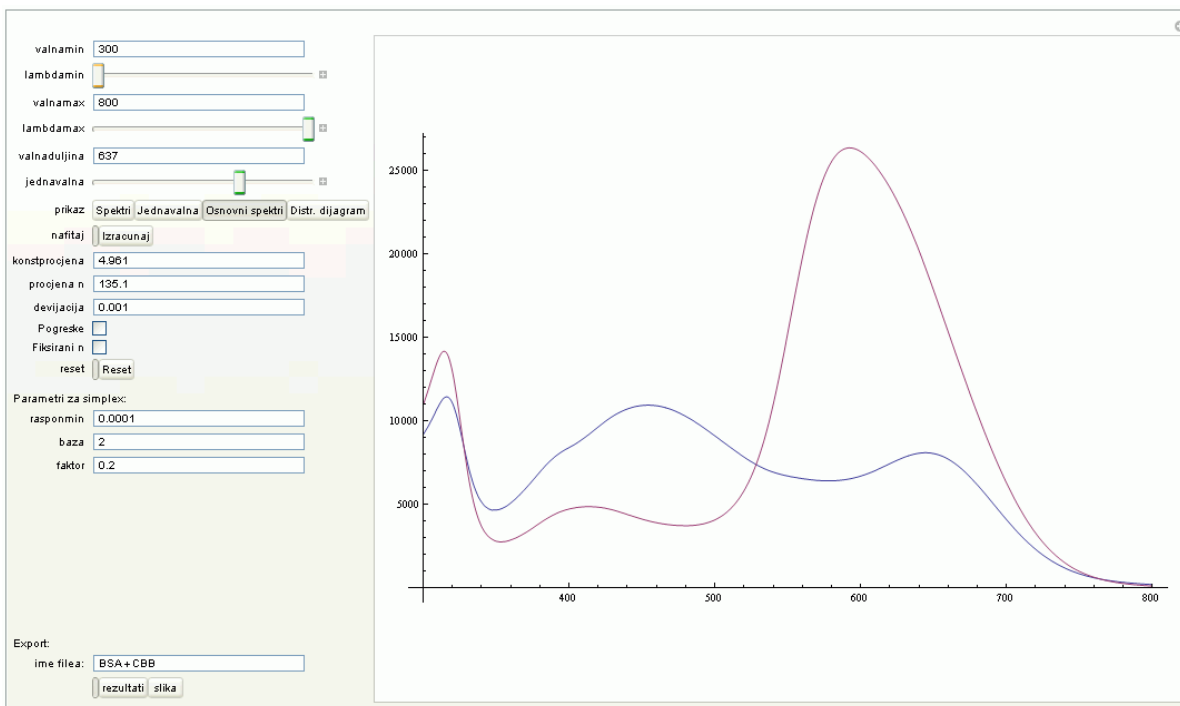
rasponmin – kriterij konvergencije

baza i *faktor* – definiraju brzinu optimizacije

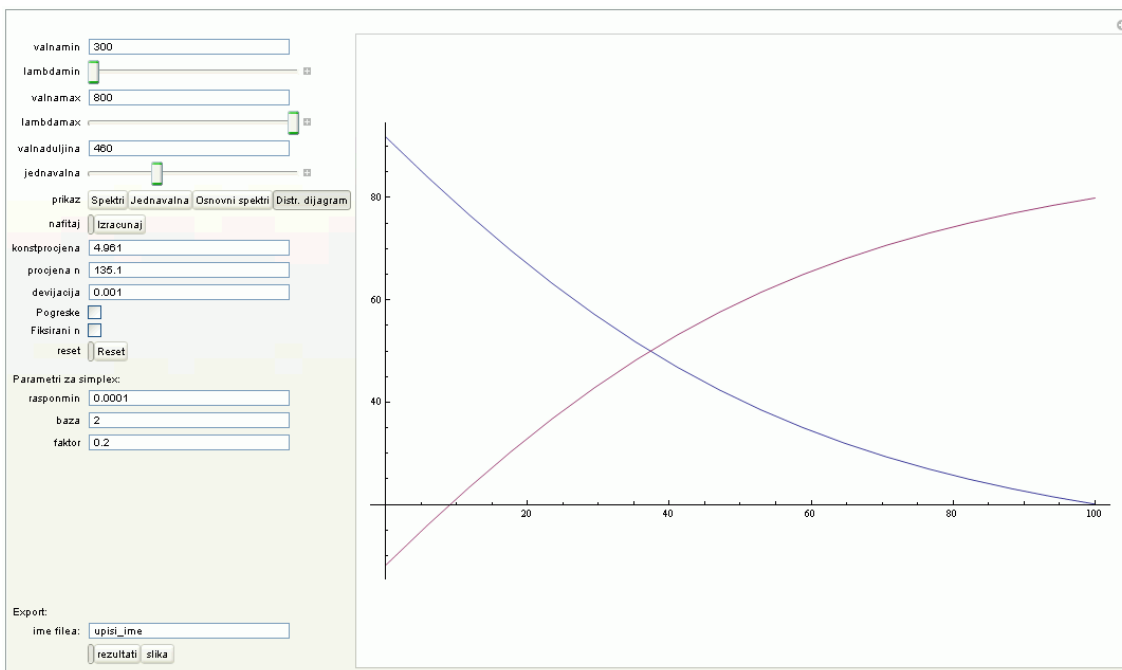
Export – omogućuje ispis rezultata optimizacije u obliku ASCII datoteka; potrebno je upisati ime datoteke (*ime filea*) te odabrati *rezultati* za ispis rezultata, odnosno *slika* za ispis podataka za sliku koja je trenutno prikazana na sučelju u ASCII datoteku u radnom direktoriju



Slika 14. Prikaz promjene apsorpcije pri odabranoj valnoj duljini u ovisnosti o omjeru analitičkih koncentracija titransa i titranda



Slika 15. Prikaz izračunatih svojstvenih spektara sudionika reakcije



Slika 16. Distribucijski dijagram

§ 6. Zaključak

Pomoću razvijenog računalnog programa SCATCHARD moguće je provesti multivarijatnu analizu podataka prikupljenih spektrofotometrijskom titracijom. Posebna značajka programa je mogućnost obrade podataka koji odgovaraju složenim biokemijskim sustavima koji uključuju vezanje malih molekula na makromolekule. To je u ovom radu ilustrirano na primjeru vezanja molekula bojila Coomassie Brilliant Blue na protein albumin iz govedeg seruma, pri čemu je izračunata prosječna konstanta ravnoteže kompleksiranja i efektivni broj veznih mjesta na proteinu.

Detaljna analiza primjene programa na simulirane spektre za hipotetsku titraciju s tri spektralno aktivne vrste pokazala je njegove vrlo dobre karakteristike. Dobiveni rezultati odlično se slažu s vrijednostima pomoću kojih je simulacija izvedena. Program SCATCHARD je relativno brz i jednostavan za korištenje zbog interaktivnog grafičkog sučelja. Velike su i mogućnosti nadogradnje trenutne verzije programa u smislu uključivanja složenijih modela i usavršavanja optimizacijske metode.

§ 7. Literatura

1. P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 8th ed., Oxford University Press, New York, 2006, pp. 202–209.
2. F. J. C. Rossotti, H. Rossotti, *The Determination of Stability Constants: and Other Equilibrium Constants in Solution*, McGraw Hill, New York, 1961
3. M. Nishimura, S. Noriki, *Anal. Chim. Acta* **65** (1973) 357–362.
4. E. H. Adema, H. Bos, H. S. Vrinssen, *Recl. Trav. Chim. Pay. B.* **79** (1960) 1282–1288.
5. L. Stryer, *Biochemistry*, 3rd ed., W. H. Freeman, New York, 1988, pp. 154–155.
6. D. L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman, New York, 2004, pp. 157–162.
7. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
8. G. Puxty, M. Maeder, K. Hungerbühler, *Chemometr. Intell. Lab.* **81** (2006) 149–164.
9. Wolfram Research, Inc., *Mathematica*, Version 7.0, Champaign, IL (2008).
10. V. Tomišić, *Određivanje specijacije vodenih otopina jakih elektrolita faktorskom analizom elektronskih i ramanskih spektara*, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1997.
11. R. G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002, pp. 97–102.
12. G. L. Peterson, *Anal. Chem.* **100** (1979) 201–220.
13. S. Fazekas de St. Groth, R. G. Webster, A. Dwyer, *Biochim. Biophys. Acta* **71** (1963) 377–391.
14. T. S. Meyer, B. L. Lambert, *Biochim. Biophys. Acta* **107** (1965) 144–145.
15. J. J. Sedmak, S. E. Grossberg, *Anal. Biochem.* **79** (1977) 544–552.
16. S. M. Read, D. H. Northcote, *Anal. Biochem.* **116** (1981) 53–64.
17. T. Peters Jr., *All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 39–40.
18. J. L. Sohl, A. G. Splittgerber, *J. Chem. Ed.* **68** (1991) 262–264.
19. H. J. Chial, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.* **213** (1993) 362–369.
20. K. Hiroyama, S. Akashi, M. Furuya, K. I. Fukuhara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** (1990) 639–646.
21. B. A. Atherton, E. L. Cunningham, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.* **233** (1996) 160–168.
22. Y. Wei, K. Li, S. Tong, *Talanta* **44** (1997) 923–930.

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Nova metoda multivarijatne analize podataka spektrofotometrijske titracije

Antonio Prlj

Zavod za fizikalnu kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Razvijen je program SCATCHARD koji služi određivanju vrijednosti konstante ravnoteže reakcije i svojstvenih spektara sudionika reakcije iz podataka dobivenih spektrofotometrijskom titracijom. Njegova glavna prednost u odnosu na slične komercijalne programe je mogućnost određivanja broja veznih mjesta na nekom od reaktanata (makromolekuli), što je često važno u biokemijskim aplikacijama. Primijenjena metoda multivarijatne analize spektralnih podataka uključuje optimizaciju spomenutih parametara pomoću modificiranog algoritma Simplex, a kôd programa napisan je u komercijalnom programskom paketu MATHEMATICA 7.0.

Program je uspješno testiran na sintetskim podacima, odnosno simuliranim spektrima za hipotetsku titraciju s tri spektralno aktivne vrste. Kako bi se potvrdila mogućnost njegove primjene na realne biokemijske sustave, provedena je spektrofotometrijska titracija liganda Coomassie Brilliant Blue s proteinom albuminom iz govedeg seruma. Pomoću programa SCATCHARD izračunata je vrijednost konstante ravnoteže kompleksiranja ($9,2 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$) i efektivni broj veznih mjesta na proteinu (135).

Ključne riječi: multivarijatna analiza podataka, spektrofotometrijska titracija, konstanta ravnoteže, efektivni broj veznih mjesta

Abstract

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

A new method for multivariate analysis of spectrophotometric titration data

Antonio Prlj

Laboratory of Physical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia

The program SCATCHARD for the multivariate analysis of the spectrophotometric titration data was developed. It allows for the determination of the reaction equilibrium constant and the absorption spectra of the reactants and products involved. The main advantage of the program over similar commercially available programs is the possibility of the determination of the number of macromolecule binding sites, which is often important in biochemical applications. The applied multivariate analysis of the spectra involves optimization of the above mentioned parameters employing a modified Simplex algorithm. It was implemented in the commercial computational software package MATHEMATICA 7.0.

The program was successfully tested using simulated spectra corresponding to the hypothetical spectrophotometric titration with three spectrally active species. To verify the applicability of the program to real biochemical systems, spectrophotometric titration of the ligand Coomassie Brilliant Blue with the protein Bovine Serum Albumin was carried out. The binding constant and the effective number of the binding sites on the protein were calculated by means of the program SCATCHARD, and were found to be $9.2 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ and 135, respectively.

Keywords: multivariate data analysis, spectrophotometric titration, equilibrium constant, effective number of binding sites

Dodatak

Kôd programa SCATCHARD:

```
direktorij="C:\\radni_direktorij"; (* radni direktorij *)
spektriimefile="spektri.txt";      (* ime datoteke sa spektrima *)
koncimefile="koncentracije.txt";   (* ime datoteke s koncentracijama *)
SetDirectory[direktorij];
tablica=Import[spektriimefile,"TSV"];
konc=Import[koncimefile,"TSV"];
spektri=Reverse[Transpose[Transpose[tablica][[2;]]]];
spektripravi=spektri;
valne=Transpose[tablica][[1]];

nonlinear={ };
epsilon={ };
spektrifit={ };
epsilonfit={ };
concmatrica={ };
omjer={ };
alfa={ };

omjer=Transpose[konc][[2]]/Transpose[konc][[1]];
jednavalna=1;
lambdafitmin=1;
lambdafitmax=Length[spektri];
```

```
iteracija=1;
```

```
nafitanokraj=0;
```

```
defaultK=4;
```

```
defaultn=1;
```

```
fiksiranin=False;
```

```
AB:=1/(2 konst) (1+ A0 konst+n B0 konst-Sqrt[-4 n A0 B0 konst^2+(1+A0 konst+n B0 konst)^2]);
```

```
ABfix:=1/(2 konst) (1+ A0 konst+nfix B0 konst-Sqrt[-4 nfix A0 B0 konst^2+(1+ A0 konst+nfix B0 konst)^2]);
```

```
Manipulate[
```

```
  If[nafitaj==1,
```

```
    If[pogreska==True,
```

```
      pogreske=Array[RandomReal[NormalDistribution[0,devijacija]]&,Dimensions[spektri]];

```

```
      spektri=spektripravi + pogreske,
```

```
      spektri=spektripravi];
```

```
    dataspektri=spektri[[IntegerPart[lambdamin];;IntegerPart[lambdamax]]];
```

```
    lambdafitmin=lambdamin;
```

```
    lambdafitmax=lambdamax;
```

```
  If[nafitanokraj==0,
```

```
    nonlinear={};
```

```
    data={};
```

```

spektrifit={};

epsilonfit={};

(* reakcijski modeli *)

If[fiksiranin==False,

model:=epsilonA (A0-AB) +epsilonB ( n B0-AB)+ epsilonAB AB,

nfix=nprocjena;

model:=epsilonA (A0-ABfix) +epsilonB ( nfix B0-ABfix)+ epsilonAB ABfix;];

data=Transpose[{Transpose[konc][[1]],Transpose[konc][[2]],dataspektri[[jednavalna]]}];

(* procjena vrijednosti molarnih apsopijskih koeficijenata spektralno aktivnih vrsta *)

If[epsilonfit!={ }&&Min[epsilonfit]>-100,

epsAprocjena=epsilonfit[[jednavalna,1]];

epsBprocjena=epsilonfit[[jednavalna,2]];

epsABprocjena=epsilonfit[[jednavalna,3]],

epsAprocjena=dataspektri[[jednavalna,1]]/(konc[[1,1]]);

If[Min[dataspektri[[jednavalna]]]==dataspektri[[jednavalna,-1]], epsBprocjena=0];

If[Min[dataspektri[[jednavalna]]]==dataspektri[[jednavalna,1]], epsBprocjena=epsAprocjena*2];

If[Min[dataspektri[[jednavalna]]]!=dataspektri[[jednavalna,-1]]&&Min[dataspektri[[jednavalna]]]!=dataspektri[[jednavalna,1]],

epsBprocjena=Min[dataspektri[[jednavalna]]]/(nprocjena*0.8*konc[[1,1]]);

epsABprocjena=dataspektri[[jednavalna,-1]]/konc[[1,1]];

];

```



```

prolaz=0;

brojacpomak=1;

konstpocetna=2.5;

(* fitanje pomoću modela *)

While[prolaz==0,

If[fiksiranin==False,

    nonlinear=FindFit[data,model,{ {epsilonA,epsAprocjena},{epsilonB,epsBprocjena},{epsilonAB,epsABpr
ocjena},{n,nprocjena},{konst,10^konstprocjena}},{A0,B0},MaxIterations->1000],

    nonlinear=FindFit[data,model,{ {epsilonA,epsAprocjena},{epsilonB,epsBprocjena},{epsilonAB,epsABpr
ocjena},{konst,10^konstprocjena}},{A0,B0},MaxIterations->1000]];

If[fiksiranin==False,vrijednostK=nonlinear[[5,2]],vrijednostK=nonlinear[[4,2]];

If[fiksiranin==False,vrijednostn=nonlinear[[4,2]],vrijednostn=nprocjena];

If[vrijednostK<100,

    konstprocjena+=0.5*brojacpomak+konstpocetna;

    brojacpomak++;

    If[fiksiranin==False,

        If[vrijednostn<0 Or vrijednostn>15,

            nprocjena+=0.2*brojacpomak-0.6;

            brojacpomak++];];

If[vrijednostK>100&&0<vrijednostn,prolaz=1];

];

];

(* 2D optimizacija *)

```

```

If[fiksiranin==False,

matrica:=

{{(vrijednostK/broj),(vrijednostn*broj)},

{vrijednostK,(vrijednostn*broj)},

{(vrijednostK*broj),(vrijednostn*broj)},

{(vrijednostK/broj),vrijednostn},

{vrijednostK,vrijednostn},

{(vrijednostK*broj),vrijednostn},

{(vrijednostK/broj),(vrijednostn/broj)},

{vrijednostK,(vrijednostn/broj)},

{(vrijednostK*broj),(vrijednostn/broj)}},

matrica:={vrijednostK/broj,vrijednostK,vrijednostK*broj}];

broj=baza;

iteracijasimplex=1;

While[(broj-1)>rasponmin,

devetorka={};

For[i=1,i<=Length[matrica],

If[fiksiranin==False,ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit ,n->matrica[[i,2]],konst->matrica[[i,1]]},

ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit ,n->nprocjena,konst->matrica[[i]]}];

(* generiranje matrice koncentracija za jedan par vrijednosti parametara iz matrice *)

concmatrica={};

```

```

For[j=1, j<=Length[konc],

  A0fit=Transpose[konc][[1,j]];

  B0fit=Transpose[konc][[2,j]];

  AppendTo[concmatrix, {(A0fit-ABfit),(vrijednostn*B0fit-ABfit),ABfit}];

j++];

epsilonfit=dataspektri.PseudoInverse[Transpose[concmatrix]];

spektrifit=epsilonfit.Transpose[concmatrix];

sumakvadrata=Total[(dataspektri-spektrifit)^2,2];

AppendTo[devetorka,sumakvadrata];

i++];

(* traženje parametara za koje je suma kvadrata odstupanja najmanja *)

vrijednostmin=Position[devetorka,Min[devetorka]][[1,1]];

If[fiksiranin==False,

  vrijednostK=matrica[[vrijednostmin,1]];

  vrijednostn=matrica[[vrijednostmin,2]],

  vrijednostK=matrica[[vrijednostmin]]

];

brojnovi=1+baza*Exp[-faktor*iteracijasimplex];

broj=brojnovi;

iteracijasimplex++;

];

(* konačno određivanje vrijednosti konstante ravnoteže i n *)

```

```

deltaK=SetPrecision[Abs[vrijednostK-vrijednostK*broj],30];

If[fiksiranin==False,deltan=SetPrecision[Abs[vrijednostn-vrijednostn*broj],30]];

If[fiksiranin==False,matricamin={ {vrijednostK-
deltaK,vrijednostn},{vrijednostK+deltaK,vrijednostn},{vrijednostK,vrijednostn-
deltan},{vrijednostK,vrijednostn+deltan},{vrijednostK,vrijednostn}},

matricamin={vrijednostK-2*deltaK,vrijednostK-
deltaK,vrijednostK,vrijednostK+deltaK,vrijednostK+2*deltaK}

];

petorka={};

For[i=1,i<=5,

If[fiksiranin==False,ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit,n->matricamin[[i,2]],konst->matricamin[[i,1]]},

ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit,n->nprocjena,konst->matricamin[[i]]}];

concmatrixa={};

For[j=1,j<=Length[konc],

A0fit=Transpose[konc][[1,j]];

B0fit=Transpose[konc][[2,j]];

AppendTo[concmatrixa,{(A0fit-ABfit),(vrijednostn*B0fit-ABfit),ABfit}];

j++];

epsilonfit=dataspektri.PseudoInverse[Transpose[concmatrixa]];

spektrifit=epsilonfit.Transpose[concmatrixa];

sumakvadrata=Total[(dataspektri-spektrifit)^2,2];

AppendTo[petorka,sumakvadrata];

i++];

```

```

If[fiksiranin==False,

tockeK=SetPrecision[{{matricamin[[1,1]],petorka[[1]]},{matricamin[[5,1]],petorka[[5]]},{matricamin[[2,1
]],petorka[[2]]}},30];

token=SetPrecision[{{matricamin[[3,2]],petorka[[3]]},{matricamin[[5,2]],petorka[[5]]},{matricamin[[4,2
]],petorka[[4]]}},30];

,

tockeK=SetPrecision[Transpose[{matricamin,petorka}],30];

SetPrecision[parabolaK=Fit[tockeK,{1,x,x^2},x],30]; (* fitanje parabole *)

If[fiksiranin==False,SetPrecision[parabolan=Fit[token,{1,x,x^2},x],30];

Kmin=SetPrecision[-parabolaK[[2,1]]/(2*parabolaK[[3,1]]),30];

If[fiksiranin==False,nmin=SetPrecision[-parabolan[[2,1]]/(2*parabolan[[3,1]]),30],

nmin=nprocjena];

(* računanje matrice koncentracija iz parametara koji odgovaraju minimumu sume kvadrata odstupanja *)

concmatrix={};

alfa={};

If[fiksiranin==False,

ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit ,n->nmin,konst->Kmin},

ABfit:=AB/.{A0->A0fit,B0->B0fit ,n->nprocjena,konst->Kmin}];

For[j=1, j<=Length[konc],

  A0fit=Transpose[konc][[1,j]];

  B0fit=Transpose[konc][[2,j]];

  AppendTo[concmatrix,{(A0fit-ABfit),(vrijednostn*B0fit-ABfit),ABfit}];

j++];

```

```

epsilonfit=dataspektri.PseudoInverse[Transpose[concmatrix]];

spektrifit=epsilonfit.Transpose[concmatrix];

alfa=SetPrecision[{100*Transpose[concmatrix][[1]]/(Transpose[konc][[1]]),
100*Transpose[concmatrix][[3]]/(Transpose[konc][[1]])},10];

konstprocjena=N[Log[10,Kmin],4];

nprocjena=N[nmin,4];

nafitanokraj=1;

Print[];

Print["Iteracija ", iteracija];

Print["Valna duljina "-> Reverse[valne][[jednavalna]]," nm "];

Print[nonlinear];

Print["SIMPLEX od ",Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmin]]]," nm do
",Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmax]]]," nm "];

Print[" K = ",SetPrecision[Kmin,8]," LogK = ", SetPrecision[Log[10,Kmin],8]," n = "
,SetPrecision[nmin,8], " 1/n = ",SetPrecision[1/nmin,8]];

iteracija++;

nafitaj=0;

];

If[reset==True,

nafitanokraj=0;

konstprocjena=defaultK;

nprocjena=defaultn;

```

```

epsilonfit={ };

spektrifit={ };

alfa={ };

reset=False;

];

(* spektri *)

If[prikaz==0,

  dataplot=Transpose[spektri[[IntegerPart[lambdamin];;IntegerPart[lambdamax]]]];

  spojeno=True;

  prikaztemp=prikaz;

  range={ Min[Reverse[valne][[IntegerPart[lambdamin];;IntegerPart[lambdamax]]],Max[Reverse[valne][[IntegerPart[lambdamin];;IntegerPart[lambdamax]]]]];

  intorder=1;

];

(* promjena apsorbancije na jednoj valnoj duljini bez podataka fita *)

If[prikaz==1[And]spektrifit=={ },

  dataplot=Transpose[{ omjer,spektri[[jednavalna]]}];

  spojeno=False;

  prikaztemp=prikaz;

  range={ Min[omjer],Max[omjer]};

];

(* promjena apsorbancije na jednoj valnoj duljini s podacima fita *)

pozicijaekran=0;

```

```

If[prikaz==1 \[And]spektrifit!={}\[And]lambdafitmin<=jednavalna<=lambdafitmax,

  dataplot={Transpose[{omjer,dataspektri[[jednavalna-
  lambdafitmin+1]]},Transpose[{omjer,spektrifit[[jednavalna-lambdafitmin+1]]}]]};

  spojeno={False,True};

  prikaztemp=prikaz;

  pozicijaekran=1;

  range={Min[valne],Max[valne]};

  intorder=2;

];

```

```

If[prikaz==1 \[And]spektrifit!={},

  If[ lambdafitmin>jednavalna \[Or] lambdafitmax<jednavalna,

    dataplot=Transpose[{omjer,spektri[[jednavalna]]}];

    spojeno=False;

    prikaztemp=prikaz;

    range={Min[valne],Max[valne]};

  ];

];

```

```

If[jednavalna<lambdamin,jednavalna=lambdamin];

If[jednavalna>lambdamax,jednavalna=lambdamax];

```

(* prikaz izračunatih svojstvenih spektara *)

```

If[prikaz==2 \[And]epsilonfit!={},

  dataplot=Transpose[epsilonfit];

  prikaztemp=prikaz;

```



```

spojeno=True;

range={Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmin]]],Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmax]]]};

intorder=2;

];

If[prikaz==2 \[And]epsilonfit=={ }, prikaz=prikaztemp];

(* distribucijski dijagram *)

If[prikaz==3 \[And] alfa!={ },

  dataplot=alfa;

  spojeno=True;

  prikaztemp=prikaz;

  range={Min[omjer],Max[omjer]};

  intorder=3;

];

If[prikaz==3 \[And] alfa=={ }, prikaz=prikaztemp];

(* eksport rezultata *)

If[exportfile==1,

  rasponfita="SIMPLEX od " <> ToString[Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmin]]]] <> " nm do
  " <> ToString[Reverse[valne][[IntegerPart[lambdafitmax]]]] <> " nm ";

  Export[StringJoin[ToString[imefilea],"_rezultati.txt"],rasponfita <> ToString["      K =
  " <> ToString[SetPrecision[Kmin,8]] <> " LogK = " <> ToString[ SetPrecision[Log[10,Kmin],8]] <> " n =
  " <> ToString[SetPrecision[nmin,8]] <> " 1/n = " <> ToString[SetPrecision[1/nmin,8]],"String"];

  (* izračunati spektri *)

```

```

spektrifitT=Transpose[spektrifit];

Export[StringJoin[ToString[imefilea],"_spektrifit.txt"],Transpose[PrependTo[spektrifitT,Reverse[valne]][[IntegerPart[lambdafitmin];IntegerPart[lambdafitmax]]]],"TSV"];

(* izračunati molarni apsorpcijski koeficijenti *)

epsilonifitT=Transpose[epsilonifit];

sviepsiloni=Transpose[PrependTo[epsilonifitT,Reverse[valne]][[IntegerPart[lambdafitmin];IntegerPart[lambdafitmax]]]];

Export[StringJoin[ToString[imefilea],"_epsilonifit.txt"],sviepsiloni,"TSV"];

Export[StringJoin[ToString[imefilea],"_alfafit.txt"],Transpose[PrependTo[alfa,omjer]],"TSV"];

exportfile=0];

If[exportfile==2\{And} pozicijaekran==0,

Export[StringJoin[ToString[imefilea],".txt"],dataplot,"TSV"];

exportfile=0];

If[exportfile==2\{And} pozicijaekran==1,

Export[StringJoin[ToString[imefilea],".txt"],Transpose[{ omjer,spektri[[jednavalna]],spektrifit[[jednavalna]]}], "TSV"];

exportfile=0];

ListPlot[dataplot, Joined->spojeno, ImageSize->700, PlotRange->All,DataRange->range,InterpolationOrder->intorder]

,

{ valnamin,Reverse[valne][[lambdamin]],ControlType->InputField},

{lambdamin,1,Length[spektri]-1,1},

```

```

{ valnamax,Reverse[valne][[lambdamax]],ControlType->InputField},

{{ lambdamax,Length[spektri]},lambdamin+1,Length[spektri],1},

{ valnaduljina,Reverse[valne][[jednavalna]],ControlType->InputField},

{{ jednavalna,1},IntegerPart[lambdamin],IntegerPart[lambdamax],1},{prikaz,0},{0->"Spektri",1->"Jednavalna",2->"Osnovni spektri",3->"Distr. dijagram"}},

{{ nafitaj,0,"nafitaj"},{0->"",1->"Izracunaj"}},

{{ konstprocjena,defaultK},ControlType->InputField},

{{ nprocjena,defaultn,"procjena n"},ControlType->InputField},

{{ devijacija,0.001},ControlType->InputField},

{{ pogreska,False,"Pogreske"},{False,True}},

{{ fiksiranin,False,"Fiksirani n"},{True,False}},

{{ reset,False,"reset"},{False->"",True->"Reset"}},

"", "Parametri za simplex:",

{{ rasponmin,0.0001,"rasponmin"},ControlType->InputField},

{{ baza,2,"baza"},ControlType->InputField},

{{ faktor,0.2,"faktor"},ControlType->InputField},

"", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "", "Export:",

{{ imefilea,upisi_ime,"ime filea:"},ControlType->InputField},

{{ exportfile,0,""},{0->"",1->"rezultati",2->" slika "}},

TrackedSymbols->{lambdamin,lambdamax,jednavalna,prikaz,nafitaj,konstprocjena,lambdamin,lambdamin,max,nprocjena,rasponmin,baza,faktor,imefilea,exportfile, valnaduljina,fiksiranin,reset}}

```