

الفصل التاسع

Chapter Nine

قياس الطيف الضوئي

Spectrophotometry

مقدمة

تعتبر الـ **Spectrophotometry** طريقةً تكنولوجيةً لقياس امتصاص الضوء من قبل الأجسام واختراق الضوء للأجسام وانبعاث الضوء من الأجسام. وهي قيمةٌ حداث في الدراسات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية بسبب الفوائد الآتية:

١- إذا عرف معامل الامتصاص **Absorbancy Index** للمركب في طول موجة معينة فإن تركيز المركب يمكن تقديره بقياس الكثافة الضوئية (أو الكثافة البصرية، **(Optical Density)**).

٢- ان طور التفاعل يمكن تحديده بقياس معدل تكوين او اختفاء المركب الممتص للضوء.

٣- يمكن تشخيص للمركبات بتحديد خصائص أطيف الامتصاص (**Absorption Spectra**) للمركبات في اشعة الضوء المرئية والاشعة فوق البنفسجية او الاشعة تحت الحمراء. ان الظواهر الطبيعية بسبب امتصاص مختلف اطوال الموجات الضوئية يمكن توضيحها في الجدول المرقم (٩-١).

جهاز المطياف او قياس الالوان

Spectrophotometer or Colorimeter

ان المكونات الاساسية لجهاز المطياف هي:

١- مصدر ضوئي **Light Source**.

٢- مرآة (**Collimator**) تسمح بوصول حزمة ضوئية بصورة مستقيمة.

٣- موشر **Prism** لتحليل الضوء إلى موجات ضوئية عدة.

٤- اداة لاختيار (**Selector**) الموجة الضوئية المعنية.

٥- خلية او انبوبة لوضع العينة.

(Cell Compartment (Cuvette).

٦- خلية ضوئية كاشفة **Photo Tube or Photo Cell**.

٧- مقياس كهربائي لتسجيل ناتج الكاشف **Meter**.

من الشكل المرفق (٩-١) يوضح مكونات جهاز المطياف.

جدول رقم (٩-١): توضيح بعض الظواهر الطبيعية الناتجة عن امتصاص مختلف أطوال الموجات الضوئية.

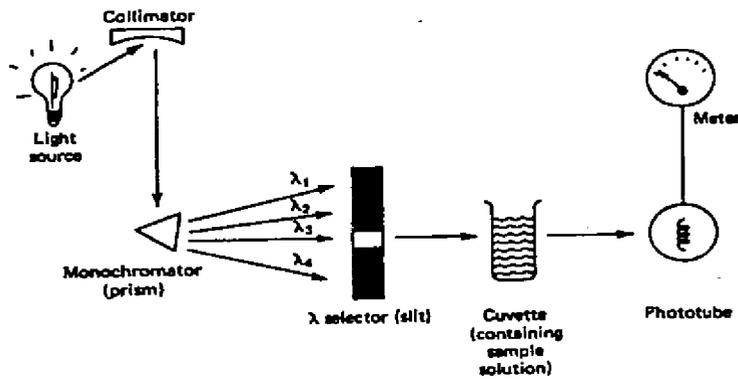
الموجة	طولها	التأثير على الجزيئة
Wave	Wavelingth	Effect
اشعة اكس	0.1- 100 nm	الالكترونات المسماة Subvalence
(X - ray) الاشعة فوق البنفسجية. U. V.	100 - 300 nm	المسماة Valence تهيج إلى مستوى طاقة اعلى
الاشعة المرئية Visible	300 - 800 nm	تهيج إلى مستوى طاقة اعلى
الاشعة تحت الحمراء Far Red Infra Red	800 - 50000 nm	التذبذب الجزيئي
الموجات القصيرة Micro Wave	50 u - 30 cm	الدوران الجزيئي

أساس عمل جهاز المطياف

قانون Lambert - Beer

أي الضوء الممتص من قبل محلول مادة ما يعتمد على سمك المحلول (طول ممر الضوء) وتركيز المادة الممتصة للضوء وطبيعة تلك المادة الممتصة للضوء.

وقد وجد ان امتصاص الضوء يتبع الدالة اللوغاريتمية لكثير من الدالة الحسابية أي ان:



شكل رقم (١-٩): مكونات جهاز المطياف Spectrophotometer عن: Segel, 1868

$$\frac{-dI}{I} = a C d l \quad \dots(1-9)$$

وكذلك

$$\frac{-dI}{I} = a l d C \quad \dots(2-9)$$

وتحور المعادلتين السابقتين إلى ما يأتي:

$$\frac{dI}{I} = -K C d l \quad \dots(3-9)$$

وكذلك

$$\frac{dI}{I} = -K l d C \quad \dots(4-9)$$

حيث ان $-dI$ هو النقصان القليل في الضوء المخترق بسبب زيادة سمك المحلول (dI)
 بثبات التركيز (C) او النقصان القليل في الـ الضوء المخترق بسبب زيادة التركيز (dC)
 عند ثبات سمك المحلول (l).

وان $\frac{dI}{I}$ هو جزء الضوء الممتص من قبل المادة.

وان K هي كمية ثابتة لكل مادة.

وان dC هو التغير في تركيز المحلول.

وان C هو تركيز المادة في المحلول الثابت. وان dI هو التغير في سمك المحلول.

وان I هو سمك المحلول الثابت.

ان المعادلتين التفاضليتين (٣-٩) و(٤-٩) يمكن تكاملهما بين أي سمكين $(I, 0)$ او بين أي تركيزين $(C, 0)$ كالآتي:

$$\int_0^I \frac{dI}{I} = -KC \int dI \quad \dots(٥-٩)$$

وكذلك

$$\int_0^C \frac{dC}{C} = -KI \int dC \quad \dots(٦-٩)$$

وبذلك يكون:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -KC I \quad \dots(٧-٩)$$

وكذلك

$$\ln \frac{I}{I_0} = -KI C \quad \dots(٨-٩)$$

ويمكن تحويل المعادلتين (٧-٩) و(٨-٩) للتخلص من الاشارة السالبة كالآتي:

$$\ln \frac{I_0}{I} = KC I \quad \dots(٩-٩)$$

وكذلك

$$\ln \frac{I_0}{I} = KI C \quad \dots(١٠-٩)$$

كما تحور المعادلتين (٩-٩) و(١٠-٩) إلى ما يأتي:

$$2.3 \log \frac{I_0}{I} = KC I \quad \dots(١١-٩)$$

وكذلك

$$2.3 \log \frac{I_0}{I} = K l C \quad \dots\dots(12-9)$$

وكذلك ترتب المعادلتان (11-9) و(12-9) إلى ما يأتي:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{K}{2.3} C l \quad \dots\dots(13-9)$$

وكذلك

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{K}{2.3} l C \quad \dots\dots(14-9)$$

وبما أن $\left(\frac{K}{2.3}\right)$ تعد كمية ثابتة أخرى لذلك نعوض بالحد (a_s) وبذلك يكون الآتي:

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s C l \quad \dots\dots(15-9)$$

وكذلك

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s l C \quad \dots\dots(16-9)$$

حيث أن a_s هو معامل الامتصاص الخاص لكل مادة معينة.

هذا ويعد القانون (15-9) و(16-9) كمحصلة لقانوني **Lambert** و **Beer**. فالأول يصرح بأن امتصاص الضوء يتناسب طردياً مع سمك المحلول المار خلاله الضوء بينما الثاني يصرح بأن امتصاص الضوء من قبل المحلول يتناسب طردياً مع تركيز المذاب. ويجمع القانونين نحصل على ما يأتي:

$$A = O.D. = \log \frac{I_0}{I} = a_s l C \quad \dots\dots(17-9)$$

حيث أن a_s يسمى **Specific Extinction Coefficient of Absorbance** وعند التعبير عن تركيز المادة بالمولار (**Molar**) عندئذ تستبدل a_s بالـ a_m وهو **Molar Extinction Coefficient of Absorbance** والذي يعادل الآتي:

$$a_m = a_s \times MW \quad \dots\dots(18-9)$$

حيث أن **MW** هو الوزن الجزيئي للمادة.

هذا ويمكن جعل الطول او السمك في الـ **Cuvette** ثابتا بمقدار سم واحد ولذلك يحور للقانون (١٧-٩) كالاتي:

$$A = O. D. = \log \frac{I_0}{I} = a_s C \quad \dots(١٩-٩)$$

ومما يذكر ان **A** هي امتصاص الضوء لو قد تسمى بالكثافة الضوئية او البصرية **Optical (O. D.) Density** والتي تتناسب طرديا مع تركيز المذاب الذي يمتص الضوء بطول موجة معينة. والخلاصة ان الفرق بين كمية الضوء المار خلال المذيب فقط (**Blank**) وكمية الضوء المار خلال المحلول هي بمثابة امتصاص الضوء (او الكثافة الضوئية) من قبل المادة المذابة في المذيب.

هذا وان الجدول المرقم (٢-٩) يوضح قيم الـ **Molar Extinction Coefficient of Absorbance** لبعض المواد المهمة بايولوجياً وكذلك اطوال الموجات الضوئية التي تمتصها هذه المواد.

مثال (١-٩)

محلول يحتوي على 2 ملغم / لتر من مادة تمتص الضوء وموضوع في **Cuvette** يخترقه 75 % من الاشعة الضوئية الساقطة بطول موجة معينة.

أ- احسب نسبة اختراق الضوء للمحلول الحاوي على 4 ملغم / لتر.

ب- إذا كان الوزن الجزيئي للمادة هو 250 فاحسب a_m .

الحل

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s C l$$

نحسب اولاً قيمة (**a**) لو معامل الامتصاص الخاص.

$$\log \frac{100}{75} = (a_s) (2) (1)$$

$$\log \frac{1}{0.75} = 2 a_s$$

جدول رقم (٢-٩): قيم الموجات والـ Molar Extinction Coefficient

Absorbance لبعض المواد الحيوية. عن: Segel, 1968

Compound	λ_{max} (m μ)	Molar extinction Coefficient ^{*)} ($a_m \times 10^{-3}$)
Adenine	260.5	13.3
Adenosine	259.5	14.9
AMP, ADP, ATP	259	15.4
Cytidine	271	9.1
Cytosine	267	6.1
CMP, CDP, CTP	271	9.1
DPN ⁺ , TPN ⁺	259	18
DPNH, TPNH	339	6.2
	259	15
Flavin adenine dinucleotide (FAD)	450	11.3
	375	9.3
	260	37
Guanine	275.5	8.1
	246	10.7
Guanosine	252.5	13.6
Nicotinamide	260	4.6
Phenylalanine (in 0.1 N HCl)	257.5	0.19
Phenylalanine (in 0.1 N aOH)	258	0.206
Pyridoxal Phosphate	388	4.9
	330	2.5
Riboflavin	450	12.2
	375	10.6
	260	27.7
Riboflavin phosphate (FMN)	450	12.2
	375	10.4
	260	27.1
Thiamine hydrochloride	267	9.0
	235	11.5
Thymidine	267	9.7
	207.5	9.6

(*) Extinction coefficients are given for a 1 cm light path.

Thymine		264	7.9
Tryptophan (in 0.1 N HCl)		278	5.6
		218	33.5
Tryptophan (in 0.1 N NaOH)		280.5	5.43
		221.5	34.6
Tyrosine (in 0.1 N HCl)		274.5	1.34
		223	8.2
Tyrosine (in 0.1 N NaOH)		293.5	2.33
		240	11.1
Uracil		259.5	8.2
Uridine		262	10.1
UMP, UDP, UTP		261	8.1

$$\text{Log } 1.335 = 2 a_s$$

$$0.125 = 2 a_s$$

$$a_s = \frac{0.125}{2} = 0.0625$$

$$\log \frac{100}{I} = (0.0625)(4)(1) \quad -1$$

$$\text{Log } 100 - \log I = 0.25$$

$$2 - 0.25 = \log I$$

$$\log I = 1.75$$

$$I = \text{antilog } 1.75$$

$$I = 56.2 \%$$

$$a_m = a_s \times MW$$

$$a_m = 0.0625 \times 250$$

$$a_m = 15.63$$

مثال (٩-٢)

محلول يحتوي على ATP تركيز $(10^{-5}M)$ يخترقه الضوء بنسبة % 70.2 ويطول موجة 260 nm ووضع هذا المحلول في Cuvette ذات طول 1 سم.

أ- احسب اختراق الضوء للمحلول الموضوع في Cuvette ذات طول 3 سم.

ب- احسب الكثافة الضوئية (Optical Density) للمحلول الموضوع في Cuvette ذات طول 1 سم و 3 سم.

ج- احسب للكثافة الضوئية واختراق الضوء لمحلول ATP بتركيز $5 \times 10^{-5} M$ في 1 سم Cuvette.

الحل

$$\log \frac{I_0}{I} = a_m C l$$

$$\log \frac{100}{70.2} = (a_m) (10^{-5}) (1)$$

$$\log 1.425 = 10^{-5} a_m$$

$$0.154 = 10^{-5} a_m$$

$$a_m = \frac{0.154}{10^{-5}} = 1.54 \times 10^4$$

$$\log \frac{100}{I} = (1.54 \times 10^4) (10^{-5}) (3) \quad -أ$$

$$\log 100 - \log I = 4.62 \times 10^{-1}$$

$$2 - \log I = 0.462$$

$$2 - 0.462 = \log I$$

$$\log I = 1.538$$

$$I = \text{antilog } 1.538$$

$$I = 34.5 \%$$

$$O. D. = A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$O. D. = \log \frac{100}{70.2} = \log 1.425 \quad -ب$$

$$O. D. = 0.154$$

$$O. D. = \log \frac{I_0}{I}$$

$$\text{O. D.} = \log \frac{100}{34.5}$$

$$\text{O. D.} = 0.462$$

$$\text{O. D.} = a_m \text{ Cl}$$

$$\text{O. D.} = (1.54 \times 10^4) (5 \times 10^{-5}) (1)$$

$$\text{O. D.} = 0.77$$

$$\log \frac{100}{I} = 0.77$$

$$\log 100 - \log I = 0.77$$

$$2 - \log I = 0.77$$

$$2 - 0.77 = \log I$$

$$\log I = 1.23$$

$$I = \text{antilog } 1.23$$

$$I = 17.0 \%$$

مثال (٩-٣)

المعلومات الآتية من امتصاص للتركيز القياسية لمحلول البروتين Bovine serum albumin (BSA).

A at 750 nm	(BSA) بطول موجة BSA mg / ml
0.09	0.05
0.18	0.10
0.27	0.15
0.37	0.20
0.46	0.25

واستعمل 25 ml من مستخلص فلق البزاليا الحاوي على البروتين وقدر الامتصاص بـ 0.25. احسب مقدار البروتين في فلق البزاليا.

الحل

١- نرسم المنحني البياني حيث ان **Y axis** يمثل الامتصاص و**X axis** يمثل التركيز.

٢- نلاحظ بعد الرسم ان الامتصاص **0.25** يقابله **0.14 mg/ ml** من التركيز.

٣- يكون مقدار البروتين كالتالي **0.25 × 0.14 = 3.5 mg protein**.

مثال (٩-٤)

ان معامل الامتصاص (**E₁ % 1cm**) لمعقد الـ **Glycogen - Iodine** بطول موجة **450 nm** هو **0.20**. احسب تركيز الـ **Glycogen** في محلول **Glycogen - Iodine** الذي يمتلك كثافة ضوئية بمقدار **0.38** في **Cuvette** سمكها **3** سم.

الحل

$$O. D. = (E_1 \% 1 \text{ cm}) (C \%) (1 \text{ cm})$$

$$0.38 = (0.2) (C \%) (3)$$

$$C \% = \frac{0.38}{0.2 \times 3} = 0.634 \%$$

مثال (٩-٥)

معلق البكتريا الحاوي على **300** ملغم وزن جاف يمتلك كثافة ضوئية بمقدار **1.0** في **Cuvette** طولها **1** سم بطول موجة **450 nm**. ما كثافة الخلية في معلق يخترقه الضوء بنسبة **30 %** في **Cuvette** ذات طول **3** سم.

الحل

نحسب اولاً الكثافة الضوئية في **Cuvette** ذات طول **١** سم.

$$O. D_{3 \text{ cm}} = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{30} = \log 3.33$$

$$O. D_{3 \text{ cm}} = 0.522$$

$$O. D_{1 \text{ cm}} = \frac{O. D_{3 \text{ cm}}}{3} = \frac{0.522}{3} = 0.174$$

Density	O. D.
300	1
X	0.174

$$x = \frac{300 \times 0.174}{1} = 52.2 \text{ mg/liter}$$

مثال (٦-٩)

محلول بروتيني حجمه 0.3 ml خفف مع 0.9 ml من الماء. اضيف إلى 0.5 ml من المحلول المخفف 4.5 ml من كاشف Biuret وظهر اللون. قيست الكثافة الضوئية لهذا الخليط في طول موجة 450 nm وكانت 0.18. لما المحلول القياسي (0.5 ml حاوياً على 4 mg of Protein / ml) مع 4.5 ml من كاشف Biuret فقد اعطى كثافة ضوئية قدرها 0.12 لحجم الـ Cuvette نفسه. احسب تركيز البروتين في المحلول المجهول غير المخفف.

الحل:

نحسب اولاً معامل الامتصاص كالاتي:

$$O. D. = (a_1 \text{ mg / ml}) (C \text{ mg / ml}) (1 \text{ cm})$$

وبسبب تشابه طول ممر الضوء (Cuvette) فيمكن اهمال المصطلح 1 وكذلك بسبب تشابه الحجم الكلي لكل من مزيجي التفاعل وهو 5 سم³ فيمكن ابدال مصطلح التركيز مع وزن البروتين كالاتي:

$$O. D. = a \text{ mg} \times Wt \text{ mg}$$

$$0.12 = a_1 \text{ mg} \times 2 \text{ mg}$$

$$a_1 \text{ mg} = \frac{0.12}{2} = 0.06$$

اما وزن البروتين في 0.5 سم³ من المحلول المخفف المجهول فيعادل الاتي:

$$O. D. = a_1 \text{ mg} \times Wt \text{ mg}$$

$$0.18 = 0.06 \times Wt \text{ mg}$$

$$Wt \text{ mg} = \frac{0.18}{0.06} = 3 \text{ mg}$$

ان كمية البروتين (3 mg) موجودة في 0.5 ml لما تركيز البروتين في 1 سم² فيعادل

$$3 \times \frac{1}{0.5} = 3 \times 2 = 6 \text{ mg / ml}$$

اما نسبة التخفيف فتعادل:

$$\frac{0.3}{0.3 + 0.9} = \frac{0.3}{1.2} = \frac{1}{4}$$

لذا يكون التركيز الاصلي كالاتي:

$$C_{\text{original}} = C_{\text{final}} \times \text{Dilution Factor}$$

$$C_{\text{original}} = 6 \text{ mg / ml} \times 4 = 24 \text{ mg / ml}$$

مثال (٩-٧)

محلول يحتوي على NADH , NAD^+ يمتلك كثافة ضوئية قدرها 0.311 في Cuvette ذات طول اسم بطول موجة 340 nm و 1.2 بطول موجة 260 nm. احسب نسبة الشكل المؤكسد إلى المختزل في قرين الانزيم NAD علماً بأن كل من NAD^+ و NADH يمتصان طول موجة 260 nm ولكن NADH تمتص الضوء بطول موجة 340 nm كما ان معامل الامتصاص للمادتين كالاتي:

	a_m 1 cm		المركب
	340 nm	260 nm	
0	15400		NAD^+
6220	15400		NADH

الحل

ان تركيز كل مادة تحسب كالاتي؛

أ- نحسب تركيز NADH بطول موجة 340 nm حيث لا تمتصه NAD^+ .

$$O. D. = a_m C l$$

$$0.311 = (6.22 \times 10^3) (C) (1)$$

$$C = \frac{0.311}{6.22 \times 10^3} = 0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$C_{\text{NADH}} = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

ب- نحسب الـ O. D. بطول موجة 260 nm لامتناص NADH.

$$\text{O. D.} = a_m C l$$

$$\text{O. D.} = (15.4 \times 10^3) (5 \times 10^{-5})$$

$$\text{O. D.} = 0.77$$

لما بقية الامتناص بطول موجة 260 nm فيرجع إلى NAD⁺ كالآتي:

$$\text{NAD}^+ = 1.2 - 0.77 = 0.43$$

ج- نحسب تركيز NAD⁺ بطول موجة 260 nm كالآتي:

$$\text{O. D.} = a_m C l$$

$$0.43 = (15.4 \times 10^3) (C) (1)$$

$$C = \frac{0.43}{15.4 \times 10^3} = 2.79 \times 10^{-5} \text{ M}$$

هذا ويمكن حساب تركيز الاثنين معاً بسبب تشابه الـ a_m بطول موجة 260 nm.

$$\text{O. D.} = a_m C l$$

$$1.2 = (15.4 \times 10^3) (C_{\text{total}}) (1)$$

$$C_{\text{total}} = \frac{1.2}{15.4 \times 10^3} = 7.79 \times 10^{-5} \text{ M}$$

لما نسبة NADH فتكون:

$$\frac{5 \times 10^{-5}}{7.79 \times 10^{-5}} \times 100 = 64.2\%$$

ونسبة NAD⁺ كالآتي:

$$\frac{2.79 \times 10^{-5}}{7.79 \times 10^{-5}} \times 100 = 35.8\%$$

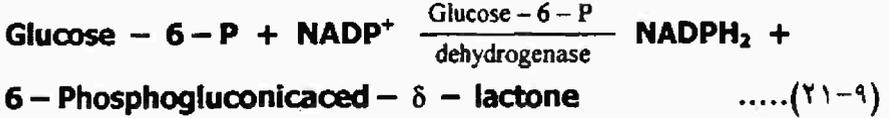
مثال (٩-٨)

إلى 2 سم^٢ من محلول الكوكوز أضيف 1 سم^٢ من محلول يحتوي ATP و NADP⁺ و MgCl₂ وانزيم الـ hexokinase وانزيم الـ 6 - p dehydrogenase - a وكانت الكثافة الصوتية للمحلول النهائي في 1 سم Cuvette قد ازدادت إلى 0.91 بطول موجة 340 nm.

احسب تركيز الكلوز في المحلول الاصلي.

الحل

تحديث التفاعلات الآتية:



نحسب تركيز NADPH_2 لانها تمتص فقط بطول موجة 340 nm.

$$\text{O. D.} = a_m C L$$

$$\text{O. D.} = (6.22 \times 10^3)$$

$$0.91 = (6.22 \times 10^3) (C) (1)$$

$$C_{\text{NADPH}_2} = \frac{0.91}{3.22 \times 10^3} = 1.465 \times 10^{-4} \text{ M}$$

وبما ان مول واحد من NADPH يجب توفيره لكل مول واحد من الكلوز حسب المعادلة (21-9) لذا يكون تركيز الكلوز يعادل $(1.465 \times 10^{-4} \text{ M})$ ايضا.

اما تركيز الكلوز الاصلي فيكون كالآتي:

$$C_{\text{original glucose}} = (1.465 \times 10^{-4}) (\text{Dilution Factor})$$

$$= (1.465 \times 10^{-4}) \times \frac{3}{2} = 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$$

مثال (9-9)

إذا كان الكلوروفيل يمتلك معامل امتصاص خاص extinction Coefficient بمقدار $36 \text{ ml cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ بطول موجة 652 nm عندما يذاب في الاستيون 80%. فإذا كان امتصاص محلول الكلوروفيل في 1 سم cuvette هو 0.32 فما هو تركيز

الكوروفيل في المحلول ؟ إذا كان المستخلص الاصلى هو 50 سم² ناتجاً عن 1 غم ورقة
 فما هو تركيز الكوروفيل بالغرام ورقة ؟ وإذا كانت المساحة الخاصة هي 0.02 g / cm²
 فما هو تركيز الكوروفيل على اساس وحدة المساحة ؟

الحل

$$A = a_s (1) (C)$$

$$0.32 = 36 \times 1 \times C$$

$$C = \frac{0.32}{36} = 0.009 \text{ mg / ml}$$

$$50 \times 0.009 = 045 \text{ mg chl. / g leaf} \quad -$$

b

0.02 gram

c- إذا كان 1 سم² مساحة وزن

1 gram

x

$$x = \frac{1}{0.02} = 50 \text{ cm}^2$$

إذا كان 50 cm² تحتوي على 0.45 gm كلوروفيل

x

1 cm²

$$x = \frac{0.45}{50} = 0.009 \text{ mg chl. / cm}^2.$$

الاسئلة

(١-٩) ماهي وحدة الامتصاص.

(٢-٩) محلول Adenine في الماء بتركيز (6.0 mg / ml) يمتلك امتصاص ضوئي قدره 0.590 بطول موجة 261 nm في 1 سم Cuvette. احسب a_m كذلك a_m علماً بأن الوزن الجزيئي للـ Adenine يعادل 135.1.

(٣-٩) محلول (BSA) Bovine Serum Oerm Albumin من 1.0 mg / ml (موضوع في محلول Phosphate Buffer المتعادل يمتلك كثافة ضوئية قدرها 0.600 بطول موجة 280 nm. وإذا كان الوزن الجزيئي للـ BSA هو 66000. احسب a_m .

(٤-٩) إن معامل الامتصاص المولاري a_m لمادة الـ Guanosine بطول موجة 275 nm هو 8400 ويطول موجة 245 nm هو 9150 وان المادة مذابة في 0.1M HCl. وفي نفس المذيب فإن مادة Tyrosine تمتلك معامل امتصاص مولاري بطول موجة 275 nm بمقدار 1340 ويطول موجة 245 بمقدار 170. اما محلول هاتين المادتين في 0.1 M HCl فيمتلك كثافة ضوئية قدرها 0.69 بطول موجة 275 nm و0.49 بطول موجة 245 nm. احسب التراكيز المولارية لهاتين المادتين.

(٥-٩) احسب الضوء المخترق والكثافة الضوئية بطول موجة 260 nm و340 nm للمحاليل الآتية:

. 1 cm Cuvette

أ- 2.2×10^{-6} M NADPH في

.3 cm Cuvette

ب- 2.8×10^{-5} M NADH في

.1 cm Cuvette

ج- 1.5×10^{-4} M NADP⁺ في

.1 cm Cuvette مع 7.0×10^{-6} M NADH

- 4.5×10^{-5} M ATP

(٦٩) احسب الضوء المخترق والكثافة الضوئية بطول موجة 260 nm و 340 nm لكل

محلول مذكور في السؤال (٥-٩) بعد إجراء التخفيضات الآتية:

أ- ضعفان.

ب- ثلاثة اضعاف.

ج- اربعة اضعاف.

(٧-٩) احسب تركيز **ATP** و **NADPH** في المحاليل ذات الكثافة الضوئية (في 1 cm

Cuvette) الآتية:

أ- 0.9 بطول موجة 260 nm و 0.15 بطول موجة 340 nm .

ب- 0.75 بطول موجة 260 nm وصفر بطول موجة 340 nm .

ج- 0.545 بطول موجة 260 nm و 0.22 بطول موجة 340 nm .

(٨-٩) احسب تركيزي المركبين الممتصين **A** و **B** إذا كان الكثافة الضوئية لهذا المحلول

(في **Cuvette 3 cm**) هي 0.62 بطول موجة 450 nm و 0.54 بطول

موجة 485 nm علماً بأن المركب **A** يمتلك معامل امتصاص مولاري

يقدر 12000 بطول موجة 450 nm و 4000 بطول موجة 485 nm . أما

المركب **B** فيمتلك معامل امتصاص مولاري يقدر 5000 بطول موجة 450 nm

و 11600 بطول موجة 485 nm .

(٩-٩) احسب تركيز حامض الستريك (**Citrate**) والـ (**Isocitrate**) في الخليط بعد

اعطائك المعلومات الآتية:

أ- بعد إضافة 1.5 سم^3 من المحلول الحاوي على مقدار من NADP^+

وانزيم **Isocitrate Dehydrogenase** إلى 2 سم^3 من المحلول الاصللي وكانت

الكثافة الضوئية بطول موجة 340 nm في **Cuvette 1 cm** قد ازدادت

إلى 0.48 .

ب- بعد اضافة 3.5 سم^3 من المحلول الحاوي على الانزيم **Aconitase** فإن

الكثافة الضوئية قد بقيت ثابتة بمقدار 0.48 .