الفصل التاسع

Chapter Nine

قياس الطيف الضوئي

Spectrophotometry

obeikandl.com

مقدمة

تعتبر الـ **Spectrophotometry** طريقة تكنيكية لقياس امتصاص الضوء من قبل الاجسام واختراق الضوء للاجسام وانبعاث الضوء من الاجسام. وهي قيمة جدا في الدراسات الفسيولوجية والكيمياوية الحيوية بسبب الفوائد الآتية:

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

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

٣- يمكن تشخيص المركبات بتحديد خصائص اطياف 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- موشور **Prism** لتحليل الضوء إلى موجات ضوئية عدة.

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

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**.

ن الشكل المرقم (٩-١) يوضح مكونات جهاز المطياف.

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

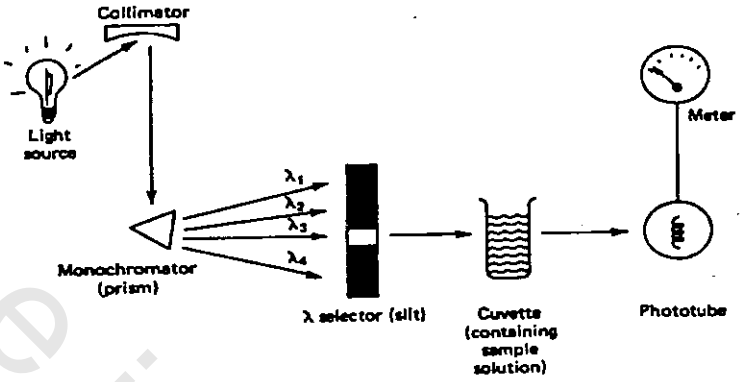
الموجة **Wave**	طولها **Wavelingth**	التأثير على الجزيئة **Effect**
اشعة اكس **(X – ray)**	**0.1- 100 nm**	الالكترونات المسماة **Subvalence** الالكترونات المسماة **Valence** تتهيج إلى مستوى طاقة اعلى
الاشعة فوق البنفسجية **U. V.**	**100 – 300 nm**	تتهيج إلى مستوى طاقة اعلى
الاشعة المرئية **Visible**	**300 - 800 nm**	تتهيج 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 اكثر من الدالة الحسابية أي ان:



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

$$\frac{-dI}{I} \alpha C d l \qquad \ldots.(٩-١)$$

وكذلك

$$\frac{-dI}{I} \alpha l d C \qquad \ldots.(٩-٢)$$

وتحور المعادلتين السابقتين إلى مايأتي:

$$\frac{dI}{I} = -K C d l \qquad \ldots.(٩-٣)$$

وكذلك

$$\frac{dI}{I} = -K l d C \qquad \ldots.(٩-٤)$$

حيث ان **dI** – هو النقصان القليل في الضوء المخترق بسبب زيادة سمك المحلـــول**(dI)** بثبات التركيز **(C)** او النقصان القليل في الــ الضوء المخترق بسبب زيادة التركـيز**(dC)** عند ثبات سمك المحلول **(1)**.

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

وان **K** هي كمية ثابتة لكل مادة.

obeikandi.com

وان **dC** هو التغير في تركيز المحلول.

وان **C** هو تركيز المادة في المحلول الثابت. وان **d1** هو التغير في سمك المحلول.

وان **1** هو سمك المحلول الثابت.

ان المعادلتين التفاضليتين (٩-٣) و(٩-٤) يمكن تكاملهما بين أي سمكين **(I, 0)** او بين أي تركيزين(٥، **c**) كالآتي:

$$\int_0^I \frac{dI}{I} = -KC\int_0^l dl \qquad ....(٩-٥)$$

وكذلك

$$\int_0^I \frac{dI}{I} = -K1\int_0^C dC \qquad ....(٩-٦)$$

وبذلك يكون:

$$\ln\frac{I}{I_o} = -KC1 \qquad ....(٩-٧)$$

وكذلك

$$\ln\frac{I}{I_o} = -K1C \qquad ....(٩-٨)$$

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

$$\ln\frac{I_o}{I} = KC1 \qquad ....(٩-٩)$$

وكذلك

$$\ln\frac{I_o}{I} = K1C \qquad ....(٩-١٠)$$

كما تحور المعادلتين (٩-٩) و(٩-١٠) إلى مايأتي:

$$2.3\log\frac{I_o}{I} = KC1 \qquad ....(٩-١١)$$

obeikandl.com

وكذلك

$$2.3\log \frac{I_o}{I} = K1C \qquad \text{.....(٩-١٢)}$$

وكذلك ترتب المعادلتان (٩-١١) و(٩-١٢) إلى مايأتي:

$$\log \frac{I_o}{I} = \frac{K}{2.3} C1 \qquad \text{.....(٩-١٣)}$$

وكذلك

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{K}{2.3} 1C \qquad \text{....(٩-١٤)}$$

وبما ان $\left(\frac{K}{2.3}\right)$ تعد كمية ثابتة اخرى لذلك تعوض بالحد **(a_s)** وبذلك يكون الآتي:

$$\log \frac{I_o}{I} = a_s\, C\, I \qquad \text{.....(٩-١٥)}$$

وكذلك

$$\log \frac{I_o}{I} = a_s\, 1\, C \qquad \text{.....(٩-١٦)}$$

حيث ان a_s هو معامل الامتصاص الخاص لكل مادة معينة.

هذا ويعد القانون (٩-١٥) و(٩-١٦) كمحصلة لقانوني **Beer** و**Lambert**. فالاول يصرح بان امتصاص الضوء يتناسب طرديا مع سمك المحلول المار خلاله الضوء بينما الثاني يصرح بان امتصاص الضوء من قبل المحلول يتناسب طرديا مع تركيز المذاب.
ويجمع القانونين نحصل على مايأتي:

$$A = 0.D. = \log \frac{I_o}{I} = a_s 1C \qquad \text{....(٩-١٧)}$$

حيث ان 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:

$$a_m = a_s \times MW \qquad \text{.....(٩-١٨)}$$

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

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

$$A = 0.D. = \log \frac{I_o}{I} = a_s C \qquad .....(٩-١٩)$$

ومما يذكر ان **A** هي امتصاص الضوء او 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 (٩-٢) يوضح قيم الـ **Molar Extinction Coefficient of Absorbance** لبعض المواد المهمة بايولوجياً وكذلك اطوال الموجات الضوئية التي تمتصها هذه المواد.

مثال (٩-١)

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

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

نحسب اولا قيمة **(a)** او معامل الامتصاص الخاص.

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

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

جدول رقم (٩-٢): قيم الموجات والـ Molar Extinction Coeffinient لبعض المواد الحيوية. عن: Segel, 1968 Absorbance

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 HCI)	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 (in0.1 N HCI)	**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 HCI)	**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**

Log 1.335 = 2 a_s

0.125 = 2 a_s

$$a_s = \frac{0125}{2} = 0.0625$$

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

Log 100 – log I = 0.25

2 – 0.25 = log I

log I = 1.75

I = antilog 1.75

I = 56.2 %

a_m = a_s × MW

a_m = 0.0625 × 250

a_m = 15.63

مثال (٩-٢)

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

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

obeikandl.com

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

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

الحـــل

$$\log \frac{I_o}{I} = a_m \, C \, l$$

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

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

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

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

أ-

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

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

$$2 - \log I = 0.462$$

$$2 - 0.462 = \log I$$

$$\log I = 1.538$$

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

$$I = 34.5\ \%$$

$$\text{0. D.} = A = \log \frac{I_o}{I}$$

ب-

$$\text{0. D.} = \log \frac{100}{70.2} = \log 1.425$$

$$\text{0. D.} = 0.154$$

$$\text{0. D.} = \log \frac{I_o}{I}$$

obeikandl.com

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

$$O.D. = 0.462$$

$$O.D. = a_m Cl$$

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

$$O.D. = 0.77$$

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

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

$$2 - \log I = 0.77$$

$$2 - 0.77 = \log I$$

$$\log I = 1.23$$

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

$$I = 17.0\ \%$$

مثال (٩-٣)

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

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

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

الحـــل

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

٢- نلاحظ بعد الرسم ان الامتصاص **0.25** يقابلـه **0.14 mg/ ml** مـن التركيز.

٣- يكون مقدار البروتين كالآتي **25 × 0.14 = 3.5 mg protein**.

مثال (٩-٤)

ان معامل الامتصاص **(E_1 % 1cm)** لمعقـد الـــ **Iodine - Glycogen** بطـول موجة**450 nm** هو **0.20**. احسب تركيز الـــ **Glycogen** فــي محلــول**Glycogen Iodine-** الذي يمتلك كثافة ضوئية بمقدار **0.38** في **Cuvette** سمكها **3** سم.

الحـــل

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

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

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

مثال (٩-٥)

معلق البكتريا الحاوي على **300** ملغم وزن جاف يمتلــك كثافــة ضوئيــة بمقــدار**1.0** في **Cuvette** طولها **1** سم بطول موجة **450 nm**. ما كثافة الخلية في معلـــق يخترقــه الضوء بنسبة **30 %** في **Cuvette** ذات طول **3** سم.

الحـــل

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

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

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

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

Density	O. D.
300	1
X	0.174

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

مثال (٩-٦)

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**. اما 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.

الحـــل:

نحسب اولا معامل الامتصاص كالآتي:

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

وبسبب تشابه طول ممر الضوء **(Cuvette)** فيمكن اهمال المصطلح **1** وكذلك بسبب تشابه الحجم الكلي لكل من مزيجي التفاعل وهو **5** سم^3 فيمكن ابدال مصطلح التركيز مع وزن البروتين كالآتي:

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

$$0.12 = a_{1\,mg} \times 2 \text{ mg}$$

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

اما وزن البروتين في **0.5** سم^3 من المحلول المخفف المجهول فيعادل الآتي:

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

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

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

ان كمية البروتين **(3 mg)** موجودة في **0.5 ml** اما تركيز البروتين في **1** سم^3 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 كالآتي:

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

مثال (٩-٧)

محلول يحتوي على **NADH, NAD$^+$** يمتلك كثافة ضوئية قدرهـا **0.311** فـي **Cuvette** ذات طول ١سم 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** يمتصـان طول موجة **260 nm** ولكن **NADH** تمتص الضوء بطول موجة **340 nm** كما ان معامل الامتصاص للمادتين كالآتي:

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

الحـــل

ان تركيز كل مادة تحتسب كالآتي؛

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

$$O.D. = a_m C l$$
$$0.311 = (6.22 \times 10^3)(C)(1)$$
$$C = \frac{0.311}{6.22 \times 10^3} = 0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

obeikandl.com

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

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

$O.D. = a_m C l$

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

$O.D. = 0.77$

اما بقية الامتصاص بطول موجة 260 nm فيرجع إلى NAD^+ كالآتي:

$NAD^+ = 1.2 - 0.77 = 0.43$

جـ- نحسب تركيز NAD^+ بطول موجة 260 nm كالآتي:

$O.D. = a_m C l$

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

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

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

$O.D. = a_m C l$

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

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

اما 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^3 من محلول الكلكوز أضيف 1 سم^3 من محلول يحتوي ATP و $NADP^+$ و $MgCl_2$ وانزيم الـ hexokinase وانزيم aseglucose - 6 - p dehydrogena وكانت الكثافة الضوئية للمحلول النهائي في 1 سم Cuvette قد ازدادت إلى 0.91 بطول موجة 340 nm.

لحسب تركيز الكلكوز في المحلول الاصلي.

الحـــل

تحدث التفاعلات الآتية:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow[mg^{+2}]{\text{hexokinase}} \text{Glucose} - 6P + \text{ADP} \quad \ldots(٩-٢٠)$$

$$\text{Glucose} - 6 - P + NADP^{+} \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{Glucose} - 6 - P} NADPH_2 + \text{6} - \text{Phosphogluconicaced} - \delta - \text{lactone} \quad \ldots..(٩-٢١)$$

نحسب تركيز $NADPH_2$ لانها تمتص فقط بطول موجة **340 nm**.

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

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

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

$$C_{NADPH_2} = \frac{0.91}{3.22 \times 10^3} = 1.465 \times 10^{-4}\ M$$

وبما ان مول واحد من **NADPH** يجب توفيره لكل مول واحد من الكلكوز حسب المعادلة (٩-٢١) لذا يكون تركيز الكلكوز يعادل **(1.465×10^{-4} M)** ايضا.

اما تركيز الكلكوز الاصلي فيكون كالآتي:

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

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

مثال (٩-٩)

إذا كان الكلوروفيل يمتلك معامل امتصاص خاص **extinction Coefficient** بمقدار **36 ml cm^{-1} 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

الكلوروفيل في المحلول ؟ إذا كان المستخلص الاصلي هو 50 سم٣ ناتجاً عن 1 غم ورقـة فما هو تركيز الكلوروفيل بالغرام ورقة ؟ وإذا كانت المساحة الخاصة هي $0.02\ g\ /\ cm^2$ فما هو تركيز الكلوروفيل على اساس وحدة المساحة ؟

الحـــل

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

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

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

b – $50 \times 0.009 = 045$ mg chl. / g leaf

c– إذا كان 1 سم٢ مساحة يزن 0.02 gram

x 1 gram

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

إذا كان $50\ cm^2$ تحتوي على 0.45 gm كلوروفيل

x $1\ cm^2$

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

obeikandl.com

الأسئلة

(٩-١) ماهي وحدة الامتصاص.

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

(٩-٣) محلول **1.0 mg / ml** من الـ **Bovine Serum Oerm Albumin (BSA)** (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 الـ a_m.

(٩-٤) إن معامل الامتصاص المولاري a_m لمادة الـ **Guanosine** بطول موجة **275 nm** هو **8400** وبطول موجة **245 nm** هو **9150** وان المادة مذابة في **0.1MHCl**. وفي نفس المذيب فأن مادة **Tyrosine** تمتلك معامل امتصاص مولاري بطول موجة **275 nm** بمقدار **1340** وبطول موجة **245** بمقدار **170**. اما محلول هاتين المادتين في **0.1 M HCl** فيمتلك كثافة ضوئية قدرها **0.69** بطول موجة **275 nm** و **0.49** بطول موجة **245 nm**. احسب التراكيز المولارية لهاتين المادتين.

(٩-٥) احسب الضوء المخترق والكثافة الضوئية بطول موجة **260 nm** و **340 nm** للمحاليل الآتية:

أ- 2.2×10^{-6} M NADPH في . 1 cm Cuvette

ب- 2.8×10^{-5} M NADH في .3 cm Cuvette

جـ- 1.5×10^{-4} M $NADP^+$ في .1 cm Cuvette

د- 4.5×10^{-5} M ATP مع 7.0×10^{-6} M NADH .1 cm Cuvette

(٩ ٦) احسب الضوء المخترق والكثافة الضوئية بطول موجة **260 nm** و**340 nm** لكل محلول مذكور في السؤال (٩-٥) بعد إجراء التخفيضات الآتية:

أ- صعفان.

ب- ثلاثة اضعاف.

جـ- اربعة اضعاف.

(٩-٧) 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 **340nm**.

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

جـ- **0.545** بطول موجة **260 nm** و**0.22** بطول موجة **340nm**.

(٩-٨) احسب تركيزي المركبين الممتصين **A** و**B** إذا كان الكثافة الضوئية لهذا المحلول (في **3 cm Cuvette**) 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**. اما 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 الاصلي وكانت الكثافة الضوئية بطول موجة **340 nm** في **1 cm Cuvette** قد ازدادت إلى0.48.

ب- بعد اضافة **3.5** سم^3 من المحلول الحاوي على الانزيم **Aconitase** فإن الكثافة الضوئية قد بقيت ثابتة بمقدار **0.48**.