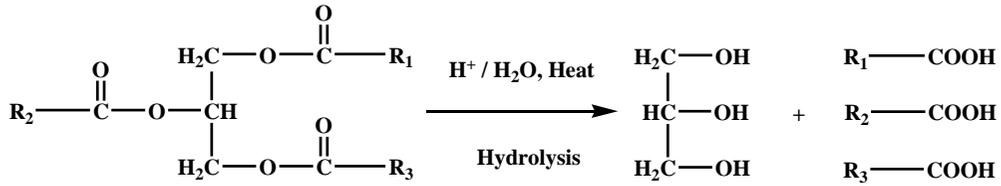




**الكلمات الدليلية Keywords:** تحليل نموذج نشط لـ DNA في وسط قلوي - إضافة نسب

مختلفة من الجليسرول إلى الوسط.

**المقدمة Introduction:** من المعروف أن المواد التي تتكون منها أنسجة الكائنات الحية هي عبارة عن مركبات مختلفة بعضها مركبات عضوية وأخري غير عضوية. وأكثر المواد العضوية انتشاراً في الكائنات الحية هي المركبات التي تنتمي إلى الكربوهيدرات والبروتينات والليبيدات والأحماض النووية، حيث يوجد نوعين من الأحماض النووية في أنسجة الكائنات الحية وهما DNA، RNA، يوجد الحمض النووي على شكل شريطين ملتقين في شكل حلزوني مزدوج، و يفصل هذان الشريطان إذا انخفض الرقم الهيدروجيني المحلول عن 4، أو إذا ارتفع رقم pH عن 11، أما في نطاق pH من 4-11 فإنه توجد شحنة سالبة لكل وحدة نيوكليوتيدية وهذه الشحنة ناتجة عن تأين الفوسفات ثنائي الإستر<sup>(1)</sup> والدهون هي عبارة عن جليسيريدات، وتصنف الجليسيريدات إلى جليسيريدات أحادية وثنائية وثلاثية بناء على عدد وحدات الأحماض الدهنية.



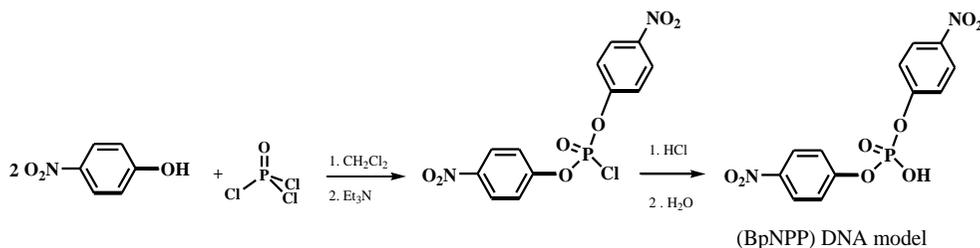
وتوجد الدهون المتعادلة (الجليسيريدات الثلاثية) في أنسجة الكائن الحي، والتي قد تتحلل أحياناً في الدم إلى جليسرول وأحماض دهنية (المعادلة أعلاه) ومنها تتغير كثافة الدم ولزوجته، وذلك بسبب إضافة الجليسرول<sup>(2,3)</sup>. ولهذا السبب تم استخدام الجليسرول لدراسة تأثير تغيير كثافة وسط التفاعل عند دراسة تحليل المادة BpNPP كنموذج نشط لـ DNA. كما تم أيضاً تغيير درجات الحرارة من (20°C - 60) ومعرفة أثرها على معدل التفاعل لـ BpNPP.

**الجزء العملي Experimental part:****Apparatus and chemical materials** الأجهزة والأدوات المستعملة والمواد الكيميائية

1. زجاجيات مختلفة Different glasses (ماصات عادية، ماصات ميكرولترية، مخابير مدرجة، دوارق قياسية حجمية).
2. ميزان كهربائي حساس نوع Sartorius Electronic balance.
3. UV-vis (جهاز الأشعة فوق البنفسجية والمرئية) JENWAY Spectrophotometer.
4. حمام مائي  $\pm 0.1$  °C من نوع D. 30938 Burgwedel.
5. محلول من BpNPP تركيزه 10mM، محلول بارا نيترو فينول (pNP) تركيزه 2.5mM، ماء مقطر، جليسرول، هيدروكسيد الصوديوم.

**تحضير المادة المدروسة في البحث BpNPP:**

حضرت المادة المدروسة BpNPP من تفاعل مولين من البارا نيترو فينول مع مول من ثلاثي كلورو فوسفات، في وجود ثلاثي إيثيل أمين وثنائي كلورو ميثان، ثم أجريت عملية تحلل المائي بإضافة الماء و خروج الكلور كمجموعة مغادرة في صورة HCl. وبعد إجراء عملية التنقية باستخدام عمود الكروماتوجرافيا تم الحصول على المركب النقي من BpNPP وفقاً للمعادلة المبينة أدناه:



وتعتبر المادة المدروسة BpNPP هي نموذج نشط لـ DNA و محاكاة طبيعية لتحلل الحيوي للفوسفات الثنائية في جزيئه DNA الطبيعية. وقد استخدمت هذه المادة في هذا البحث لأنها تعطي بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة والتي لها  $pK_a = 7.14$  وتمتص الأشعة المرئية عند طول موجي 400nm مما يجعل تتبع التقدم في هذا التفاعل سهلاً. (4,5,6)

**تحضير المحاليل:**

1. تحضير محاليل من 1M NaOH تحتوي على نسب مختلفة من الجليسرول (0%، 10%، 25%). ثم توزن 4 جرام من NaOH وتوضع في دورق سعة 100 مل، ثم أضيف الجليسرول حسب النسبة المطلوبة ويكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة.

2. تحضير محلول من بارا نيتروفينول تركيزه 2.5 mM في 1M NaOH و 10% جليسرول.

3. تحضير محلول قياسي من مركب BpNPP:

- يوزن 0.068g من مركب BpNPP ثم يذاب في 2 ml من الماء المقطر للحصول على محلول BNPP تركيزه 100 mM.

- يحضر بالتخفيف محلول قياسي تركيزه 10 mM، حيث يسحب 100µL بواسطة ماصة ميكرولتريية من المحلول الذي تركيزه 100 mM ونضع هذا الحجم في وعاء صغير بغطائه سعته 1000 µL ويكمل الحجم بالماء المقطر وذلك للحصول على محلول BpNPP تركيزه 10 mM وهو (المحلول الأم) وتحسب الامتصاصية العظمى لهذا التركيز من خلال قانون (لامبيرت بير):

$$A = \epsilon \times C \times L = 19711 \times 10/1000 \times 1 = 197.11$$

ونظراً لأن هذه القيمة 197.11 لا يمكن قياسها بجهاز UV-vis و بالتالي يخفف هذا المحلول.

- يخفف المحلول الذي تركيزه 10 mM إلى محلول تركيزه 0.05mM.

- تحسب الامتصاصية العظمى لهذا التركيز من قانون (لامبيرت بير).

$$A = \epsilon \times C \times L = 19711 \times (0.05/1000) \times 1 = 0.985$$

وعليه فإن التركيز 0.05mM تكون امتصاصية العظمى 0.985، وتعتبر هذه القيمة ملائمة للجهاز المستخدم UV-vis.

- يسحب بالماصة الميكرولتريية 5 µL من المحلول الذي تركيزه 10 mM وتوضع في خلية حجمها 1ml ثم يضاف إليها 995 µL من محلول يحتوي في كل مرة على نسب مختلفة من الجليسرول في وجود NaOH تركيزه 1M للحصول على محلول من BpNPP تركيزه 0.05 mM.

**حساب معامل الامتصاصية المولارية (Epsilon) للبارا نيتروفينول:**

- بعد تشغيل جهاز UV-vis لمدة كافية، يثبت الطول الموجي عند 400 nm.

- تملأ الخلية Cuvette بمحلول (1M NaOH، 10% جليسرول)، ويصفر امتصاص الجهاز.

- قياس الامتصاصية للتراكيز المختلفة (20، 30، 40، 50، 60M،  $\mu$ ) والتي تم تحضيرها من تخفيف حجوم مناسبة من المحلول القياسي 2.5 mM حسب العلاقة:
- $$M1 \times V1 = M2 \times V2$$
- نرسم العلاقة البيانية بين التركيز على المحور السيني وامتصاصية المحاليل السابقة على المحور الصادي كما في الشكل 1.
- حساب معدلات التفاعل لتحلل BpNPP بإضافة نسب مختلفة من الجليسرول:
- يتم متابعة تحلل BpNPP من خلال تتبع زيادة تركيز pNP في الوسط القلوي.
- تشغيل جهاز UV-vis ويثبت الطول الموجي عند 400 nm.
- تملأ الخلية (Cuvette) بمحلول 1M NaOH، يحتوي على 25% جليسرول و 75% ماء مقطر.
- توضع الخلية و بها المحلول (وسط التفاعل) في جهاز UV-vis و يتم تصفير الجهاز بطرح امتصاص الخلية و الوسط.
- تضاف إلى الخلية التي تحتوي على 995L  $\mu$  من المحلول (وسط التفاعل) 5L  $\mu$  من محلول BpNPP 10mM بواسطة الماصة الميكرولتريية حيث يتم الحصول على محلول BpNPP 0.05mM ثم تغلق الخلية بغطائها و يتم تنظيفها من الخارج بمنديل الورق الناعم و خصوصا من الجهة الشفافة.
- توضع الخلية في جهاز UV-vis و تؤخذ الامتصاصية عند الزمن صفر وهو الزمن الذي يبدأ فيه التفاعل بمجرد إضافة 5L  $\mu$  من محلول BpNPP 10 mM إلى وسط التفاعل ثم يتم تتبع إنجاز التفاعل و ذلك بقراءة الامتصاصية عند فترات زمنية مختلفة، وبعدها يتم رسم العلاقة بين الامتصاصية و الزمن وذلك لحساب معدل التفاعل.
- تكرر الخطوات السابقة مرة أخرى باستخدام وسط التفاعل يحتوي على 10% و 0% جليسرول ونحسب  $k_{obs}$  في كل مرة.

## تأثير درجة الحرارة على معدلات تحليل BpNPP مع 1M NaOH 10% جليسرول:

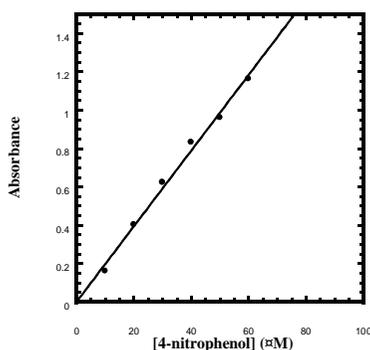
- يجهز الحمام المائي وثنثته عند درجة حرارة  $30^{\circ}\text{C}$ .
- يؤخذ دورق قياسي سعته 25ml ثم نضع فيه 10ml من المحلول (10% جليسرول و 1M NaOH) ويغلق بإحكام.
- يوضع الدورق القياسي لمدة 10 دقائق في الحمام المائي، وذلك حتى يأخذ المذيب درجة حرارة الحمام المائي.
- يضاف إلى وسط التفاعل في الدورق وهو في الحمام المائي  $50\ \mu\text{l}$  من محلول 10mM BpNPP بواسطة ماصة ميكرولترية للحصول على محلول من BpNPP تركيزه 0.05mM ثم يسحب بالقطارة وبسرعة من هذا المحلول ويوضع في خلية 1ml ثم توضع الخلية بسرعة في جهاز UV-vis وتتؤخذ الامتصاصية عند الزمن صفر وهو الزمن الذي يبدأ فيه التفاعل بمجرد إضافة  $50\ \mu\text{L}$  من محلول BpNPP إلى وسط التفاعل مع الحفاظ على درجة حرارة  $30^{\circ}\text{C}$  و ذلك بإرجاع المحلول الذي أخذت امتصاصيته بسرعة إلى الدورق الذي في الحمام المائي بواسطة القطارة ويتم قراءة الامتصاصية عند فترات زمنية مختلفة وترسم العلاقة بين الامتصاصية والزمن وذلك لحساب معدل التفاعل  $k$  لـ BpNPP كما سبق ذكره.
- نكرر الخطوات السابقة نفسها مع تغيير درجة الحرارة من  $30^{\circ}\text{C}$  إلى  $40^{\circ}\text{C}$  ثم  $50^{\circ}\text{C}$  وأخيراً إلى  $60^{\circ}\text{C}$ .
- عند  $60^{\circ}\text{C}$  تم تتبع تقدم إنجاز التفاعل تقريباً إلى نهايته بقراءة الامتصاصية عند فترات زمنية مختلفة مع الحفاظ على درجة حرارة  $60^{\circ}\text{C}$  حتى وصلنا تقريباً إلى الامتصاصية العظمى 0.915 كما في الشكل (8). وبعدها رسمت العلاقة البيانية بين الامتصاصية والزمن للحصول على معدل التفاعل.

## النتائج والمناقشة Results and discussion

تم حساب معامل الامتصاصية المولارية (Epsilon) للبارا نيتروفينول وذلك من ميل الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه من الشكل (1) كالآتي:

$$\epsilon = \text{Slope} \times 10^6 = 0.019711 \times 10^6 = 19711$$

وهذا القيمة قريبة جداً مما هو منشور في دراسة سابقة ولكن بدون الجليسرول حيث كانت قيمة الامتصاصية المولارية  $\epsilon$  للبارا نيترو فينوليت  $18320$ .<sup>(5)</sup>



الشكل (1) امتصاصية محاليل مختلفة من بارا نيتروفينول في وسط من 1M NaOH، 10% جليسرول ودرجة حرارة 20°C، الميل 0.019711، التقاطع 0.00027، معامل الارتباط 0.996.

ومن الشكل (2) تم حساب معدل التفاعل  $k$  لـ 0.05 mM BpNPP مع 1M NaOH ونسبة الجليسرول فيه كانت 25% تحت درجة حرارة 20 °C من العلاقة التالية:

$$k_{\text{obs}} = \text{Slope} / A$$

حيث أن Slope = الميل الذي يتم الحصول عليه من خلال هذا الشكل،  $A =$  الامتصاصية

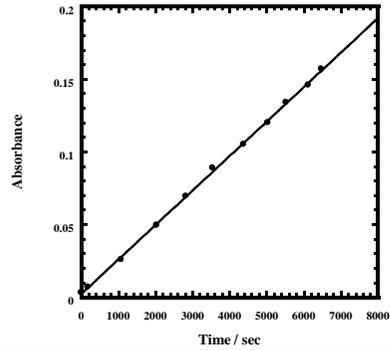
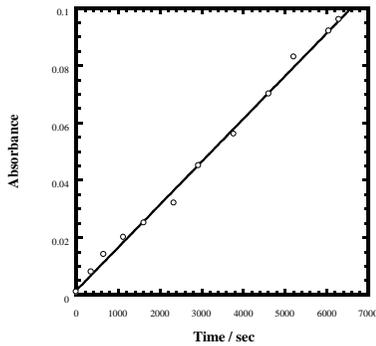
العظمى وهي 0.985،  $k_{\text{obs}}$  = معدل التفاعل الملاحظ.

$$k_{\text{obs}} = 2.371 \times 10^{-5} / 0.985$$

$$= 2.407 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} / 2$$

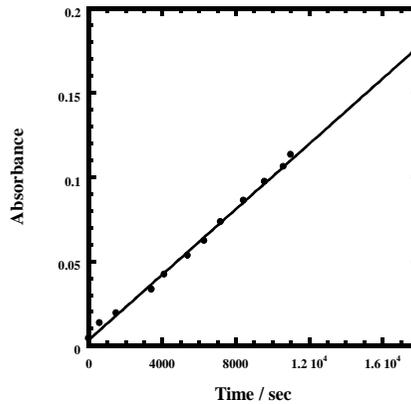
$$k_{\text{obs}} = 1.2035 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

ونظراً لأن المادة المدروسة BpNPP تحتوي على مجموعتين مغادرتين متماثلتين ولهما نفس  $pK_a$  و لذلك فإن معدل التفاعل قسم على 2.



**الشكل (3)** العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل 0.05mM BpNPP مع 1M NaOH نسبة الجليسرول 10% تحت درجة حرارة 20°C، الميل  $1.4943 \times 10^{-5}$ ، التقاطع 0.002، معامل الارتباط 0.998، ومعدل  $7.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

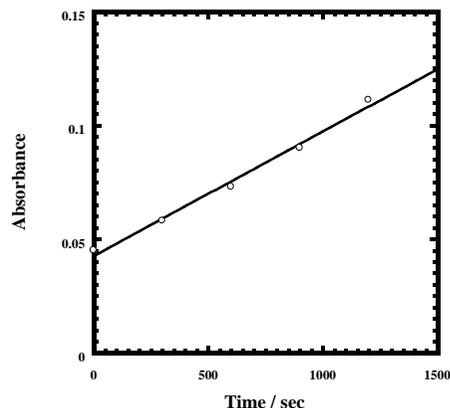
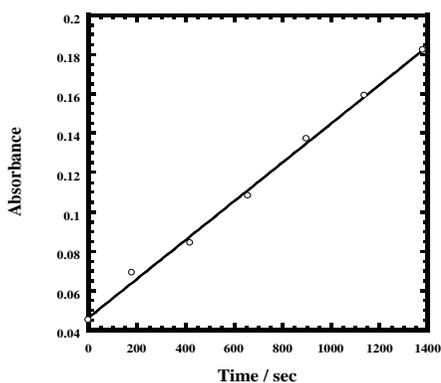
**الشكل (2)** العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل 0.05mM BpNPP مع 1M NaOH نسبة الجليسرول فيه 25% تحت درجة حرارة 20°C، الميل  $2.3705 \times 10^{-5}$ ، التقاطع 0.002181، معامل الارتباط 0.999.



**الشكل (4)** العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينو ليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل 0.05 mM BpNPP مع 1M NaOH نسبة الجليسرول 0% تحت درجة حرارة 20 °C، الميل  $9.6824 \times 10^{-6}$ ، التقاطع 0.003، معامل الارتباط 0.998، ومعدل التفاعل  $4.9 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .<sup>1</sup> وهذا المعدل قريب جداً مما هو منشور حول نفس التفاعل ولكن بدون الجليسرول حيث كانت  $4.996 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .<sup>(7)</sup>

## تأثير درجة الحرارة على معدلات تحليل BpNPP مع 10% NaOH جليسرول:

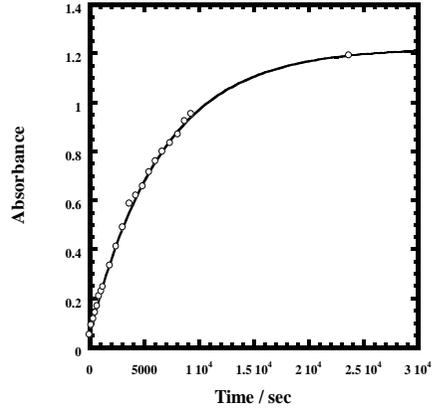
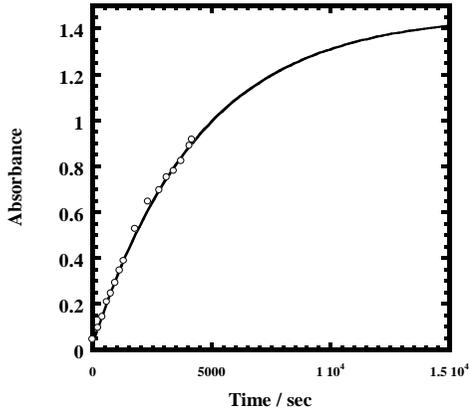
من خلال تتبع التقدم في التفاعل عند درجات حرارة مختلفة وذلك بقياس الامتصاص الناتج عن زيادة تركيز PNP مع الزمن و برسم العلاقة بين الامتصاص مقابل الزمن تحصلنا على الأشكال 5، 6 والتي من خلالها تم حساب  $k_{obs}$  حيث كانت عند  $30^{\circ}\text{C}$   $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  وعند  $40^{\circ}\text{C}$   $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .



**الشكل (6)** العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل 0.05mM BpNPP مع 10% NaOH 1M نسبة الجليسرول فيه 10% تحت درجة حرارة  $40^{\circ}\text{C}$ ، الميل  $9.8425 \times 10^{-5}$ ، التقاطع 0.046، معامل الارتباط 0.998، ومعدل التفاعل  $4.996 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

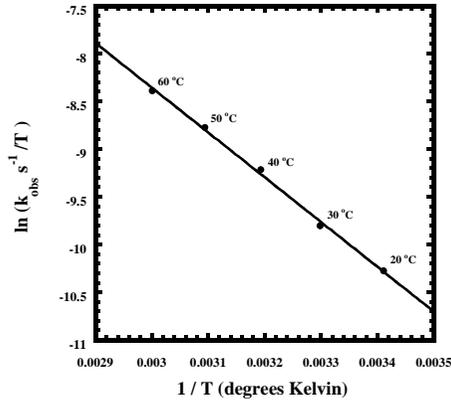
**الشكل (5)** العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل 0.05mM BpNPP مع 10% NaOH 1M نسبة الجليسرول فيه 10% تحت درجة حرارة  $30^{\circ}\text{C}$ ، الميل  $5.4667 \times 10^{-5}$ ، التقاطع 0.0426، معامل الارتباط 0.996، ومعدل التفاعل  $2.775 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

أما في الأشكال 7، 8 فقد تم تتبع التفاعل كاملاً، ومن خلالها كان  $k_{obs}$  يساوي  $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  عند  $50^{\circ}\text{C}$  و يساوي  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  عند  $60^{\circ}\text{C}$ .



الشكل (8) العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينو ليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل BpNPP (0.05mM) مع NaOH 1M نسبة الجليسرول 10% عند درجة حرارة 60°C، الميل 0.024، التقاطع 1.461، معامل الارتباط 0.999، ومعدل  $0.00022479 \text{ s}^{-1}$ .

الشكل (7) العلاقة بين امتصاصية بارا نيترو فينو ليت كمجموعة مغادرة مع الزمن في تفاعل BpNPP (0.05mM) مع NaOH 1M نسبة الجليسرول 10% عند درجة حرارة 50°C، الميل 0.050، التقاطع 1.221، معامل الارتباط 0.999، ومعدل  $0.000154 \text{ s}^{-1}$ .



الشكل (9) العلاقة بين  $(\ln k_{obs} S^{-1}/T)$  مع  $(1/T)$  حيث إن  $T$  درجة الحرارة المطلقة بينما  $1/T$  مقلوب درجة الحرارة المطلقة،  $k_{obs}$  معدل التفاعل الملاحظ حيث أن الميل -4693، التقاطع 5.723، معامل الارتباط 0.999.

ومن الشكل (9) تم حساب الانثالبي والانتروبي لهذا التفاعل (التحلل القلوي لـ BpNPP) وذلك باستخدام معادلة إيرينج: (8)

$$\ln k / T = (-\Delta H^\ddagger / R) (1/T) + (\ln k_B / h) + (\Delta S^\ddagger / R)$$

$k$  ثابت معدل التفاعل،  $T$  درجة حرارة المطلقة،  $\Delta H^\ddagger$  إنثالبي التنشيط،  $R$  الثابت العام للغازات،  $k_B$  ثابت بولتزمان،  $h$  ثابت بلانك،  $\Delta S^\ddagger$  إنتروبي التنشيط. وتم حساب الانثالبي  $\Delta H^\ddagger$  من

$$\text{Slope} = -\Delta H^\ddagger / R$$

حيث إن Slope هو ميل الخط المستقيم لهذا الشكل وهو -4693،  $R$  ثابت الغاز المثالي ويساوي  $8.314 \text{ J K mol}^{-1}$

$$\Delta H^\ddagger = 39.02 \text{ kJ mol}^{-1}$$

بينما تم حساب الانتروبي  $\Delta S^\ddagger$  من خلال هذه العلاقة:  $197.5 - \text{التقاطع} \times R = \Delta S^\ddagger$

حيث إن التقاطع يتم الحصول عليه من خلال الشكل وهو يساوي 5.723

$$\Delta S^\ddagger = -149.9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

**الاستنتاجات: Conclusions**

من النتائج المتحصل عليها من خلال قياس الامتصاصية لبارا نيترو فينول كما هو مبين في الشكل (1) تم الحصول على معامل الامتصاصية المولارية Epsilon للمجموعة المغادرة بارا نيترو فينوليت والتي قيمته تساوي 19711 وبمقارنة هذه القيمة مع الدراسات السابقة<sup>(5)</sup> التي كانت فيها قيمة الامتصاصية المولارية 18300 مما يدل على أن تغيير كثافة الوسط (بإضافة الجليسرول) أثرت قليلاً على قيمة Epsilon لبارا نيترو فينول، ومن المعلوم أن تحليل BpNPP في الوسط القاعدي سيعطي بارا نيترو فينوليت (pNP) كمجموعة مغادرة وبارا نيترو فينايل فوسفيت أحادي (pNPP) والذي هو ثابت في الوسط القلوي.

ويعتبر هذا التفاعل الذي تم من خلاله الحصول على بارا نيترو فينوليت كمجموعة مغادرة من تفاعلات الرتبة الأولى الكاذبة؛ نظراً لأن تركيز NaOH لم يتغير مع مرور الزمن. لاحظنا من الأشكال (2، 3، 4) أن تغيير كثافة الوسط القاعدي بنسب مختلفة من الجليسرول (0%، 10%، 25%) أثرت على معدل التفاعل لـ BpNPP مما يستدل على أن زيادة كثافة الوسط تؤدي إلى زيادة معدل تحليل BpNPP في الوسط القلوي. ومن الأشكال (5، 6، 7، 8) لاحظنا أثر تغيير درجات الحرارة من (20°C - 60) على معدل التفاعل لـ BpNPP حيث وجد أن معدل التفاعل يزداد بزيادة درجة الحرارة مما يدل على أن التفاعل ماص للحرارة.

ومن الشكل (9) وباستخدام معادلة إيرينج تم حساب الانتالبي و الانتروبي حيث كانت قيمة الانتالبي  $39.02 \text{ kJ mol}^{-1}$  مما يدل على أن التفاعل ماص للحرارة. وهذه القيمة قريبة جداً من قيمة منشورة لتحلل مركب Bis 2,4-DNPP في الوسط القلوي حيث كانت قيمة الانتالبي  $42.5 \text{ k J mol}^{-1}$ .<sup>(10)</sup> وحسبت قيمة الانتروبي لهذا التفاعل فكانت  $-149.9 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$  مما يدل على أن النواتج أقل فوضى من المتفاعلات. ووجدت هذه القيمة قريبة جداً من قيمة الانتروبي المنشورة لتحلل مركب Bis 2,4-DNPP في الوسط القلوي حيث كانت القيمة  $-135 \text{ k J mol}^{-1}$ .<sup>(10)</sup>

**المراجع**

1. Faculty.mu.edu.sa/public/uploads/الأحماض النووية/
2. شعبان نجم دراز وآخرين: مبادئ في الكيمياء الحيوية، منشورات جامعة قار يونس، بنغازي، الطبعة الأولى، 1999.
3. إبراهيم مصطفى وآخرون: الكيمياء العضوية والحيوية، المركز الوطني للتخطيط التعليمي والتدريس، 2003 - 2004.
4. Zalatan, J. G.; Herschlag, D., Alkaline Phosphatase Mono- and Diesterase Reactions: Comparative Transition State. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (4), 1293-1303.
5. Kirby, A. J.; Younas, M., The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1970**, 510-513.
6. Williams, N. H.; Wyman, P., Base catalysed phosphate diester hydrolysis. *Chemical Communications* **2001**, (14), 1268-1269.
7. Younas, M. R., Abdur Iqbal, M. , Hydroxide Ion Catalysed Hydrolysis of Diaryl Phosphates. *J. CHEM. SOC. PA.* **1981**,3 (3).
8. <https://ar.wikipedia.org/wiki/>
9. Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F., Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**.