

جامعة البصرة

كلية الزراعة

قسم علوم الأغذية

محاضرات تحليل الي عملي

دراسات عليا / ماجستير

استاذ المادة :أ.م.د. سوسن علي حميد الحلفي

تجربة رقم (١)

اسم التجربة : كروموتوغرافيا الورق Paper chromatography

تاريخ اجراء التجربة : / /

الأساس النظري :

الكروموتوغرافيا بصورة عامة هي طريقة تستعمل لفصل خليط من المواد الى مكونات نقية اعتمادا على اختلاف ذوبان تلك المواد في مذيب معين وعلى درجة ادمصاصها فوق سطح معين والذي يكون شريحة من ورق ترشيح او طبقة خفيفة من جلاتين السليكا او حبيبات ناعمة من الفحم . ان هذه الطريقة (كروموتوغرافيا الورق) تستعمل لفصل المواد والتعرف عليها اذا كانت موجودة بكميات ضئيلة جدا لا تتجاوز مئة ميكروغرام في النموذج الذي يوضع قرب نهاية شريحة ورق الترشيح وبعدها تغمس نهاية الورقة بصورة عامة في مذيب معين حيث سيرفع ذلك المذيب على تلك الشريحة بواسطة الخاصية الشعرية حاملا معه المحتويات الى الأعلى الى مسافة تعتمد على درجة ذوبانها في ذلك المذيب وقدرتها على الامتصاص على الشريحة . ويستمر المذيب في مساره الى اعلى من المسافة التي سارها المذاب فمن قياس المسافة التي سارها المذاب (سم) والمسافة التي سارها المذيب (سم) يمكن حساب قيمة الازاحة R_f

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المذاب}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب}}$$

حيث ان لكل مادة معينة قيمة معينة من R_f تختلف عنها لمادة اخرى تحت نفس الظروف لطريقة التحليل

المواد والأجهزة المستخدمة :

١- مذيب المزيج Elute solvent ويتكون من ايثانول ٢ : ماء ٣

العينات صبغات غذائية -

٢- شرائح من ورق الترشيح

٣- مسطرة

٤- انابيب شعرية

طريقة العمل :

تجربة رقم (٢)

اسم التجربة : الكشف عن مكونات مزيج من الأحماض الأمينية بطريقة الكورماتوغرافيا الورقية

ملاحظة :تفاعل الأحماض الامينية مع النيهيدرين

المرحلة الأولى :الننيهيدرين مؤكسد قوي يؤدي عن طريق نزع مجموعة الأمين التأكسدية (dissemination oxidative) وتحرير النشادر وغاز ثاني اوكسيد الكاربون وفقا للتفاعل الاتي

المرحلة الثانية : يتفاعل غاز الامونيا مع الننيهيدرين المتبقي ليعطي مركب ازرق بنفسجي يدعى ارجوان الرمان pourper ruhmann ويستغل هذا التفاعل في الفصل الكرموتوغرافيا والمعايرات اللونية للأحماض الأمينية .

الهدف من التجربة : الكشف على الأحماض الأمينية بالفصل الكروماتوغرافيا

الاساس العلمي : كروماتوغرافيا الورق تستعمل بكثرة من اجل فصل الأحماض الأمينية وتعتمد على اختلاف هجرة المكونات بين طور ثابت وهو الورقة وطور متحرك عبارة عن مزيج من المذيبات العضوية يوضع المزيج المراد فصله على الورقة (ورق Watchman او ورق السليلوز) ثم يغمس طرفها في المذيب بعد مدة يصعد المذيب ويحرك معه مكونات الخليط لتنتقل على مسافات مختلفة حسب نوع كل مكون وقابلية ذوبانه في المذيب

المواد اللازمة :

- مذيب يتكون من (5مل بيوتانول ، 5مل حامض الخليك الثلجي ، 1مل ماء مقطر)
- محلول العينة يحضر مائتا من الاحماض الامينية المتوفرة
- كاشف ننهيدرين يحضر بتركيز 1, 90 في 10 مل ماء مقطر
- ورق ترشيح .انابيب شعرية، وعاء الفصل

خطوات العمل :

ضع المذيب داخل وعاء الفصل قبل ٢٤ ساعة من بدء التجربة ، قطع الورق بالحجم المناسب ارسم خط البداية في اسفل الورقة بقلم الرصاص يبعد ٢سم عن الحافة ضع قطرات من محاليل العينات في الاماكن المخصص لها ضع الورقة في وعاء الفصل واتركها لمدة حدوث الهجرة جفف الورقة ثم رشها بالكاشف ثم جففها لحين ظهور بقع ملونه

وتستخدم في عمليات الفصل السريع و في تحليل الكميات القليلة من المواد و يعود ذلك للأسباب التالية :

- ١- بساطة الطريقة و عدم الحاجة الى اجهزة معقدة .
 - ٢- إمكانية الوصول الى جودة الفصل نفسها التي تعطيها الطرق الكروماتوغرافيا الاخرى .
 - ٣- إمكانية الوصول الى فصل انتقائي باستخدام كواشف خاصة .
- و تتم عملية الفصل على طبقة رقيقة من مادة الوسط الثابت المفروشة على الواح مصنوعة من الزجاج او البلاستيك او الالمنيوم . و يعتمد الفصل في هذه الطرق اما على ظاهرة الادمصاص او ظاهرة الاستبدال الايوني . و هذه الظاهر تعتمد على تركيب كل طبقة من الوسط الثابت و الوسط المتحرك . الا ان تطبيقاتها المعتمدة على ظاهرة الادمصاص هي الشائعة حيث ينظر الى كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على انها كروماتوغرافيا ادمصاص .

التجربة رقم (٣)

اسم التجربة: الكشف عن الصبغات الطبيعية في اوراق النبات بكروماتوغرافيا الورق

الكلوروفيل

الكلوروفيل كلمة مشتقة من كلمة يونانية حيث "كلوروس" تعني اخضر و " فيلون "تعني ورقة .وهو مادة صبغية خضراء ملونة للنبات باللون الأخضر، تتواجد عند النباتات الخضراء و تتعدم عند الفطريات .يوجد اليخضور داخل الخلايا النباتية في الأغشية على هيئة أقراص تسمى تلاكويدات.

اهمية الكلوروفيل

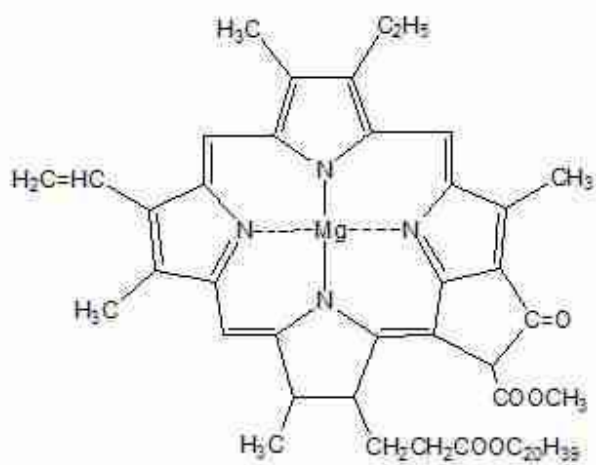
لا تكمن أهمية الكلوروفيل في إعطاء اللون الأخضر للنبته، إنما يلعب دورا هاما في عملية التركيب الضوئي حيث تتولى البلاستيدات الخضراء القيام بهذه العملية داخل أوراق النبات حيث توجه الطاقة الضوئية التي يتم امتصاصها الى مراكز تفاعل خاصة في التيلاكويدات وتتولى هذه المراكز و معها الجزيئات حاملة الالكترونات تحويل الطاقة الضوئية للحصول غاز ثاني أكسيد الكربون من الهواء و في نهايتها تؤدي إلى إنتاج المواد السكرية و غيرها من المواد الغذائية كالنشاء الدهن و البروتين و الفيتامينات .

اشكال الكلوروفيل

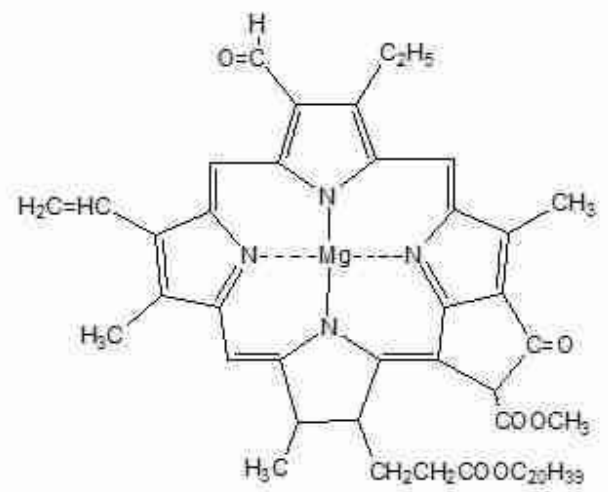
يوجد الكلوروفيل في عدة أشكال وهي ذات تركيبات كيميائية متقاربة. الكلوروفيل A, B يتواجد عند النباتات الراقية و الطحالب الخضراء بنسب متباينة وذلك حسب النوع النباتي .

الكلوروفيل C, D متوفر عند الطحالب البنية و البكتيريا الزرقاء. وصبغتا كلوروفيل A و B تمتصان بشده في الأشعة البنفسجية والزرقاء وفي الأشعة البرتقالية والحمراء ولا تمتصان الأشعة الخضراء الا بكفاه منخفضه بل تقوم بعكس او انفاذ هذه الأشعة.





Chlorophyll a



Chlorophyll b

تجربة رقم (٤)

اسم التجربة : كروماتوغرافيا الورق Paper chromatography

تاريخ اجراء التجربة : / /

التحليل الكروماتوغرافي chromatographic

يعتمد هذا النوع من التحليل على اختلاف المواد بعضها عن البعض في ميلها للامتزاز Adsorption او التجزئة Exchange خلال سطح مغلف بمذيب مناسب او خلال مادة كيميائية ومن ثم يمكن ان تنفصل تلك المواد وتنقسم طرق التحليل الكروماتوغرافي الى :

- ١- الادمصاص Adsorption : ويقصد به التحليل عن طريق الادمصاص على السطح
- ٢- التبادل الايوني Ion- exchange : ويقصد به التحليل عن طريق تبادل الايونات بين مادة التقدير وبين ايونات السطح الذي يحدث عليه التبادل وهي مادة كيميائية راتنجية .
- ٣- التجزئة Partition: ويقصد به الفصل عن طريق التجزيئي لمخلوط من عدة مواد تنقسم الى كروماتوغرافي العمود وفيه يتم التحليل على عمود معبأة بمادة معينة .
- ٤- الطبقة الرقيقة Thin layer: وفيه يتم التحليل بالادمصاص او التوزيع على الواح زجاجية تنثر عليها مادة مسامية يجري عليها الفصل والتحليل .
- ٥- كروماتوغرافيا الغاز Gas chromatography : يتضمن الفصل هنا استخدام غاز ناقل يقوم بحمل ابخرة المواد المحللة فيتم انفصال هذه المواد تبعا لدرجات غليانها أي تظهر اولا المواد ذات درجات الغليان المنخفضة يتبعها ذات الدرجات الغليان المرتفعة .
وتعد طريقة الفصل بالورقة طريقة لفصل مكونات المخلوط كالحبر السائل بالاعتماد على قابلية انجذاب كل مكون من مكونات المخلوط لسطح مادة اخرى (الطور الثابت) كورق الترشيح .
حيث يتباعد اولا مكون المخلوط الذي جاذبيته اقل على الورقة ثم يليه المكون الذي جاذبيته اكثر فأكثر .

الهدف من هذه التجربة : فصل الاصباغ المختلفة من قلم الحبر

المواد والادوات :

اسم التجربة التحليل الكروماتوغرافيا ذو الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography تاريخ التجربة : / /

هذا النظام من التحليل الكروماتوغرافي تابع لتحليل كروماتوغرافيا الأدمصاص ويعتبر النظام الثابت Stationary phase عبارة عن مادة ادمصاص مثل ثاني اوكسيد الألمونيوم السيلكا جيل مخلوط بمادة لاصقة يتم فرد مادة الأدمصاص على طبقة رقيقة على شريحة زجاجية مقاس ٢٠*٢٥ سم اما النظام المتحرك mobile phase عبارة عن مذيب مناسب او مخلوط من المذيبات المناسبة قبل استعمال الشرائح يتم وضعها في فرن للتخلص من الرطوبة ولتنشيط مادة الأدمصاص . يتم وضع العينة التي يراد فصلها بواسطة انبوبة شعرية مايكروبيبيت على هيئة بقع وعلى احد اطراف الشريحة ويوضع خط ويسمى نقطة البداية على بعد ٢ سم وقبا انتهاء الشريحة بمسافة ٢ سم يرسم خط يسمى خط النهاية .

التعرف او الكشف على اماكن الفصل :

ترش الشرائح بكواشف لظهور المركبات المختلفة وقياس المسافة التي سارها المذيب والمسافة التي سارتها المكونات يمكن حساب عامل الإعاقة Rf التقدير الكمي بعد الاستخلاص :

تقشط كل منطقة Zone وتوضع في انبوبة اختبار وتذاب في مذيب مناسب وترشح للتخلص من مادة الأدمصاص ثم يجري عليها التقديرات الآتية :

- استخدام الأشعة فوق البنفسجية UV
- استخدام الكواشف وقياس كثافة الضوء المار باستخدام Spectrophotometer

مميزات TLC عن كروماتوغرافي الورق Paper chromatography

- ١- الوقت الذي يأخذه بواسطة TLC سريع جدا لايحتاج الى اكثر من نصف ساعة
 - ٢- تكون البقع مندمجة Compact في الورق
 - ٣- تستعمل مواد ادمصاص اكثر مثل السيليلوز او السيليلوز المحور او مواد غير عضوية مثل السيليكاجيل اما في الورق يكون معتمد فقط على الطبقة الرقيقة السيليلوزية.
 - ٤- تستعمل كميات قليلة من المواد تعينها كما انها تستخلص كل مكونات العينة .
 - ٥- تستعمل مواد لتعين موضع المركبات المفصولة مثل حمض الكبريتيك وترش على السيلكا جيل او الومنيوم دون ان تتأثر على العكس التحليل الكروماتوغرافي الورق .
- حجم المذيب الذي يستخدم في slurry = ٢,٥ * عدد الألواح * سمك اللوح سم * بعد اللوح (سم).
- النسبة بين الماء والسليكا جيل = ٢:١
 - السليكا تحتوي على كبريتات الكالسيوم ١٠% من وزنها .

خطوات العمل

١- تجهيز الواح الطبقة الرقيقة .

٢-اختيار الوسط المتحرك المناسب.

٣- وضع عينة على لوح الطبقة الرقيقة .

٤- تطهير البقع المفصولة و التعرف على مكوناتها.

٥- حساب معامل الاعاقة (Rf (Refractive index

(١) تجهيز الواح الطبقة الرقيقة (الوسط الثابت) :

ان المواد المدمصة في TLC هي نفسها المدمصة في كروماتوغرافيا الاعمدة .

هذه الالواح تكون مصنوعة و مجهزة للاستخدام مباشرة .

(٢) اختيار المذيب المناسب (الوسط المتحرك)

يعتمد اختيار المذيب على نوع المادة المراد فصلها و قد يكون ضروريا اختيار عدد من المذيبات لأجراء عملية الفصل و يكون الاختيار التقريبي سهلا .فالمذيب الذي له قطبية عالية يؤدي الى تحريك البقع مع جبهة المذيب، في حين ان المذيب غير القطبي لا يؤدي الى تحريك البقع مع المذيب ، و يعتبر الكلوروفورم و البنزين من المذيبات المتوسطة القطبية التي تستخدم بصورة واسعة لفصل العديد من المركبات .

(٣) وضع العينة

يتم وضع حجم معين في حدود ٥-٢٠ ميكرو لتر من العينة التي تركيزها ٠,١-٥% بواسطة ماصة دقيقة او محقن دقيق على خط نقطة البداية الذي يبعد ٢ سم من احد اضلاع اللوح .

و ينبغي الا يزيد قطر البقعة عن اسم . و للمحافظة على بقاء البقعة صغيرة توضع العينة بأحجام صغيرة عدة مرات مع التجفيف بعد كل اضافة.

(٤) طرق تطهير البقع المفصولة (Visualization Method)

طرق الفصل سهلة في حالة المواد المفصولة ملونة ، الا انه في اغلب الحالات تكون المواد المفصولة عديمة اللون و يجب جعلها في هذه الحالة ملونة باستعمال بعض الكواشف ، و تسمى هذه بكواشف التطهير يعتبر اليود من اكثر كواشف التطهير استخداما حيث يتفاعل مع اغلب المواد العضوية معطيا متراكبات لها اللون اما بنية او صفراء . و هناك طرق اخرى مثل تطهير هاليدات المالكي برش لوح الطبقة الرقيقة بمحلول مخفف من نترات الفضة حيث تتكون هاليدات الفضة التي تتفكك بتأثير الضوء معطية بقع سوداء من رقائق الفضة على الطبقة الرقيقة . ايضا هناك استخدام مصباح الاشعة فوق البنفسجية و هي غالبا ما تظهر المركبات المفصولة على شكل بقع براقعة ساطعة على الطبقة الرقيقة و بعضها يظهر عليه فقط خاصية التألق (Fluorescence) .

و هناك ايضا اضافة مادة متألقة الى الوسط الثابت في الطبقة الرقيقة مثل خليط من كبريتات الزنك و الكادميوم . و اذا كانت المركبات المفصولة تسبب اخماد التألُق (quenching fluorescence) فأنها ستظهر على هيئة بقع سوداء على الصفيحة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية .

(٥) معامل الاعاقة

عند تثبيت كل الظروف على الطبقة الرقيقة و التي تشمل :

١-المذيب المستخدم.

٢- المادة المدمصة المستخدمة كوسط ثابت .

٣- سمك الطبقة الرقيقة

٤ - كمية العينة.

فإن اي مركب سيقطع مسافة ثابتة بالنسبة الى المسافة التي تقطعها جبهة المذيب . و تعرف النسبة بين المسافة التي تقطعها المادة المفصولة و المسافة التي تقطعها الجبهة المذيب بمعامل الاعاقة و يرمز لها بالرمز R_f و معامل الاعاقة = المسافة التي تقطعها المادة المسافة التي تقطعها جبهة المذيب و يكون معامل الاعاقة ثابتا للمركب المعطى عندما تكون كل ظروف التجربة هي نفسها و هو يمثل احد الصفات الفيزيائية لهذا المركب . و يمكن التعرف الى المادة المجهولة عن طريق حساب تلك المسافات من نقطة البداية الى مركز القطعة

تقنية الفصل:

يتم الفصل بهذه الطريقة بوضع قطرة من المحلول الذي يحتوي على الخليط المراد فصل مكوناته على بعد ٢سم من احد اضلاع اللوح . ثم يوضع اللوح في وعاء مغطى يحتوي على كمية من المذيب المستخدم بحيث لا يزيد ارتفاع المذيب في الوعاء عن ١سم . و بعد وقت قصير يبدأ المذيب في التحرك الى اعلى مارا بالبقعة التي تحتوي على الخليط و يبدا فصل مكوناته حسب قوة ادمصاص كل منها على سطح الوسط الثابت ، و ينتج عن ذلك فصل بقعة الخليط الى عدة بقع . و عندما تقترب جبهة المذيب من نهاية اللوح نخرج اللوح من الوعاء و نقوم بتحديد المكان الذي وصلت اليه جبهة المذيب لمعرفة المسافة التي قطعها المذيب . ثم نحدد مواقع البقع المفصولة . و تقاس المسافة التي قطعتها البقع مباشرة اذا كانت هذه المواد المفصولة ملونة اما اذا كانت غير ملونة فلا بد من اتباع احد الطرق المذكورة سابقا لتظهير البقع .

فصل مكونات نبات السبانخ الاخضر بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

تعتمد طريقة فصل مكونات النبات الاخضر على اختلاف ادمصاص المادة الخضراء على سطح هلام السليكا الموجودة على شكل طبقة رقيقة . و تشبه هذه الطريقة الى حد كبير طريقة الفصل الكروماتوغرافي بواسطة العمود .

المواد المطلوبة و تحضير المحاليل :

١- هلام السليكا

٢- كلوروفورم

٣- اسيتون

٤- بنزين

٥- حضر ٢٥ مل من كل من الكلوروفورم و الكروتين و الكازينوفيل في الكلوروفورم بتركيز ١٠% وزن لوزن . w/w

خطوات العمل

(٣) ضع على لوح الطبقة الرقيقة و على مسافة ٢ سم من حافتها مستخلص السبانخ على شكل قطرات متتالية.

(٤) ضع على لوح الطبقة الرقيقة نفس وعلى بعد ٢ سم من حافة محاليل كل من الكلوروفيل و الكروتين و الكازينوفيل على شكل قطرات متتالية بحيث تكون المسافة ما بين البقع الناتجة عن المكونات بحدود ٢ سم .

(٥) ضع لوح الطبقة الرقيقة في الخزان الكروماتوجرافي الذي يحوي المذيب المكون من البنزين والاستون

١ : ٩ على التوالي . وينبغي ألا يصل مستوى سطح المذيب في الخزان الى بقعة العينة المراد فصل مكوناتها .

(٦) اترك لوح الطبقة الرقيقة في الخزان حتى تصل جبهة المذيب الى ما قبل نهاية الطرف العلوي .

(٧) أخرج لوح الطبقة الرقيقة ولاحظ انفصال مكونات العينة إلى عدة بقع ملونة ، رتب هذه البقع حسب قوة ادمصاصها و احسب معامل الاعاقة لكل منها . وتعرف على مل مكون تم فصله من السبانخ بمقارنة لونه و معامل إعاقه بلون و معامل الاعاقه لكل من الكلوروفيل و الكروتين و الكازينوفيل .

تجربة رقم (٦)

اسم التجربة : فصل الكربوهيدرات باستخدام الطبقة الرقية

تاريخ التجربة : / /

تستخدم الواح السليكا جيل بنجاح في فصل مزيج من الكربوهيدرات وعملية الفصل والتظهير لا تستغرق سوى ٤٠ دقيقة

المحاليل والكواشف

- ١- محلو مزيج يحوي كل ١مل منه على ١ملغم من الكربوهيدرات التالية:
كلوكوز , Glucose , فركتوز , Fructose , سكروز Sucrose
- ٢- لوحة جاهزة مغطاة بطبقة رقيقة من السليكا جيل
- ٣- مذيب مكون من المزيج التالي (٩مل بيوتانول + ٦مل حامض خليك + ٣مل ايثر اثيلي + ١ مل ماء مقطر).
- ٤- كاشف رش مكون من (١٨ مل ايثانول + ١مل حامض كبريتك + ١ مل p-anisaldehyde methoxybenzaldehyde

طريقة العمل

- يوضع النموذج على شكل قطرات في نقطة مؤشرة على بعد ٢سم من احدى نهايتي اللوح كما في التجارب السابقة
- يوضع المذيب في قعر الحوض الفصل ثم يوضع اللوح الجاهز فيه .
- يترك اللوح لمدة ٤٠-٦٠ دقيقة .
- يرفع اللوح من الحامض ويجفف لمدة ٥-١٠ دقائق
- يرش اللوح بكاشف الرش حيث تظهر البقع الملونة كالاتي :

المركب	لون البقعة	Rf
كلوكوز	ازرق خفيف	٠,٥٥
فركتوز	بنفسجي	٠,٤٥
سكروز	بنفسجي	٠,٣١

تجربة رقم (٧)

اسم التجربة: تعيين الطول الموجي الاكبر لامتصاص (max) لمحلول برمنغنات البوتاسيوم
(KMno4)

تاريخ التجربة : / /

الهدف من التجربة : قياس الطول الموجي الاعلى امتصاص لمحلول برمنغنات البوتاسيوم لمدى من
الاطوال الموجية يتراوح بين (٤٨٠ - ٥٨٠)
الاساس العلمي :

أن الاجزاء الرئيسية المكونة لجهاز قياس الامتصاص الكهروضوئي Spectrophotometer هي مصدر
الضوء المرشح لأعطاء ضوء احادي اللون ، خلايا زجاجية للمحاليل او المذيب و خلية كهروضوئية مربوطة
الى جهاز القياس وعلية يقاس الكهروضوئي الناتج من قبل الضوء بعد مروره خلال المذيب او المحلول
ويجب اجراء عملية المعايرة calibration للتأكد من ان قياس الجهاز يعمل بصورة صحيحة . يحدث
الامتصاص للاشعاع من قبل المادة المار خلالها عندما يكون تردد الأشعاع مكافئا للطاقة لإيصال النظام
الإلكتروني للمادة الى مستوى عالي مسموح به حيث يقصد بالامتصاص ازالة ترددات معينة من الأشعاع
الكهرومغناطيسي خلال نفاذه من طبقة شفافة الى صلبة او سائلة او غازية لقد تبين ان شدة الاشعاع
تتناقص مع تركيز المادة المار خلالها . اي كلما زاد عدد دقائق الماصة للاشعاع كما عبر عنها قانون بير
- لامبرت اذ يتناسب الامتصاص A طرديا مع التركيز وكمالي :

$$A = \epsilon \cdot C \cdot X$$

الأجهزة والمواد الكيميائية :

جهاز المطياف الضوئي ، دورق ١٠٠مل ، برمنغنات البوتاسيوم ، ماصة ١٠ مل ، ماصة ٥ مل

طريقة العمل :

١- يحضر محلول مائي من برمنغنات البوتاسيوم بإذابة ٠,٠١٣غم في ١٠٠ مل ماء مقطر ثم يجري سحب ٥ مل منه ويخفف لحد العلامة .

٢- يتم تهيئة الجهاز

٣- نملا احدى الخليتين بالماء المقطر للتصفير (بلانك) .

٤- نقوم بوضع الخلية الاخرى الحاوية على محلول برمنغنات في الجهاز ونقيس الامتصاصية على مدى من الاطوال الموجية يتراوح بين (٤٨٠-٥٨٠) nm

تجربة رقم (٨)

اسم التجربة : ايضاح قانون بير - لامبرت

تاريخ التجربة : / /

الهدف من التجربة : تطبيق قانون بير - لامبرت باستخدام برمنغنات البوتاسيوم

الأساس العلمي :

يعتبر قانون بير - لامبرت من اهم القوانين الرياضية التي تتضمن معالجة الكمية لامتصاص الطاقة الأشعاعية من قبل المادة فعندما نوجه شعاع احادي اللون monochromatic شدته (IO) بصورة عمودية على خلية من الزجاج او الكوارتز وبعد مرور مسافة b خلال العينة التي تحتوي على N من الدقائق الماصة للاشعاع تقل شدة الأشعاع النافذ من الجهة الأخرى الى a حيث ان النقصان في شدة الشعاع يتناسب طرديا مع عدد الدقائق الممتصة الموجودة في المحلول والتي تعترض طريق الشعاع .
ينص القانون على : ان الزيادة المنتابفة في عدد الجزيئات المتماثلة الماصة للاشعاع والواقعة في طريق حزمة من اشعاع احادي اللون تمتص اجزاء متساوية من الطاقة الأشعاعية التي تمر بها . ويعبر عنه رياضيا بالصيغة التالية :

$$\text{Log } IO/I = a \cdot \epsilon \cdot bc$$

$$A = abc$$

او

حيث ان :

IO شدة الضوء الساقط على المحلول

I شدة الضوء النافذ

ϵ ثابت التناسب ويسمى بالامتصاصية المولية Molar Absorptivity

a ثابت التناسب ويسمى بالامتصاصية النوعية Specific Absorptivity

B طول ممر الضوء خلال المحلول

C تركيز المحلول

النسبة I/O تعرف بالنفاذية Transmittance ويرمز لها ب T اما Log تعرف بالامتصاصية

Absorbance ويرمز لها بالرمز A نظريا فان رسم العلاقة بين A و C يجب ان تكون علاقة خطية تمر

بنقطة الاصل وعمليا وجد ان العلاقة بين الامتصاص والتركيز يمكن حصول انحراف مع ثبات مسار الأشعاع بما يعني عدم مطاوعة قانون بير او الأنحراف عنه وحينئذ تتحرف القيمة الحقيقية انحرافا موجبا او انحرافنا سالباً .

طريقة العمل

١- يتم تحضير عدد من المحاليل القياسية من مادة برمنغنات البوتاسيوم والتي تركيزها ٠,٠٠٢ مولاري وذلك بسحب ١,٢,٣,٤,٥ مل بواسطة الماصة ووضعها في قنينة حكيمة سعة ٢٥ مل ونكمل الحجم للعلامة .

٢- يشغل الجهاز ويثبت على طول موجي 520nm

٣- يصفر الجهاز بالماء المقطر

٤- نملأ الخلية بالمحلول الاول المحضر في الخطوة الاولى ونسجل الامتصاصية A

٥- نعيد الخطوة السابقة على المحاليل

٦- نأخذ المحلول المجهول ونكمل الحجم للعلامة ويتم قياس الامتصاص له

٧- نرسم بيانيا العلاقة بين قيم الامتصاص ومقابلها تركيزها

٨- نستخرج تركيز المحلول المجهول من الرسم البياني

يتم حساب تراكيز المحاليل المحضرة من خلال العلاقة

$$C1V1=C2V2$$

ولإيجاد تركيز المجهول Unknown نرسم العلاقة بين الامتصاصية ٥٢٠ مقابل التركيز

التركيز	الامتصاصية	

