لجان الدفعات

PHARMACEUTICAL ANALYSIS

MORPHINE ACADEMY

Ruba Mohammad

Instrumental Analysis

Fundamentals of Spectrophotometry

Objectives

- **Fundamentals of Spectrophotometry**
  - **Properties of light**
  - **Regions of the electromagnetic spectrum**
  - **Absorption of light**
- **What happens when molecules absorb light?**
  - **Electronic energy states**
  - **Vibrational and rotational energy states**
- **Beer's Law**
- **Limitations and Deviations from Beer's Law.**

التحليل الطيفي

Spectroscopy is any procedure that uses the interaction of **Electromagnetic Radiation** (الإشعاع الكهرومغناطيسي) **(EMR)** with **matter** to ***identify*** and/or to ***estimate*** an analyte.

للتعرف على المادة

تقدير كميتها

Quantitative Analysis

molecules	solid
ions	liquid
atoms	gas
Mixtures	solutions

Qualitative Analysis

Quantitative. ← تقدير الكمية

Qualitative. ← التعرف على المادة

Electromagnetic radiation (light)

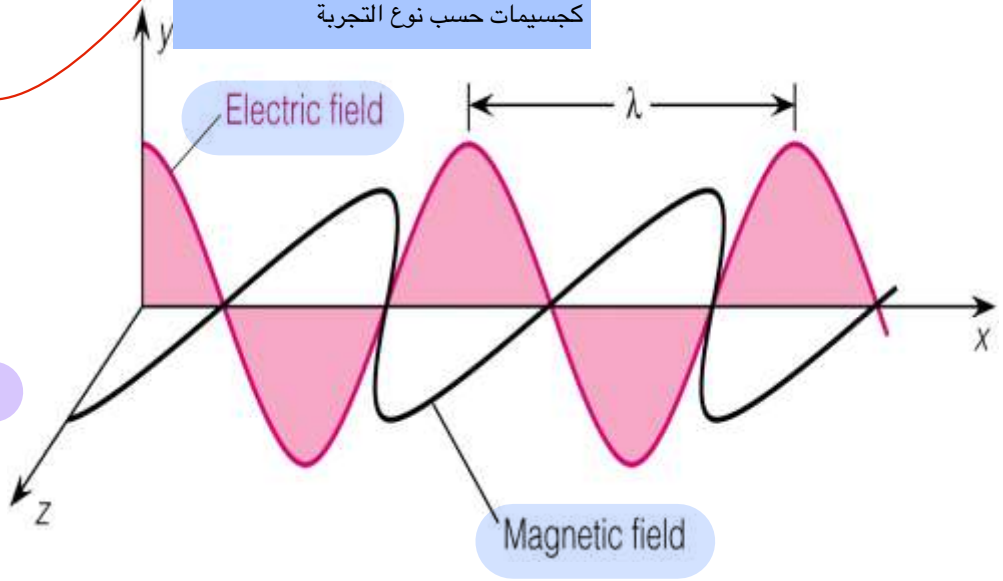
الضوء له طبيعة مزدوجة، فهذا يعني أن الضوء يتصرف أحيانًا كموجة وأحيانًا كجسيمات حسب نوع التجربة

- EMR can be described in terms of both **particles** and **waves** (Dual nature of light)

الطبيعة المزدوجة للضوء

- Light waves consist of **perpendicular and oscillating electric** and **magnetic** fields

تتكون موجات الضوء من مجالين كهربائي ومغناطيسي متعامدين ومتذبذبين.



Light waves can be characterized By:

طول الموجي (λ)

Wavelength (λ, ***Greek lambda***):
Distance from one wave peak to the next.
المسافة من قمة موجة إلى القمة التي تليه

Units: m, cm, μm, nm or Å

التردد (ν)

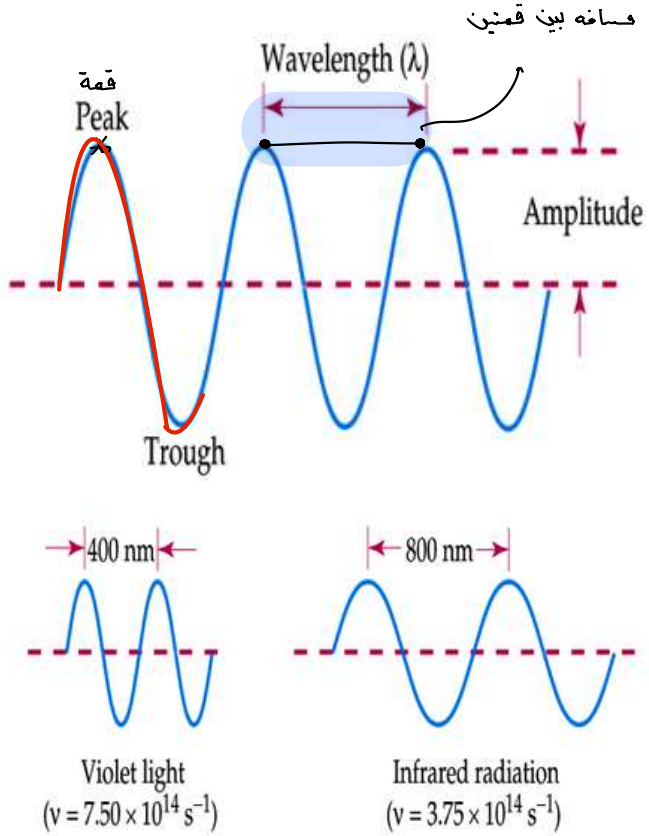
Frequency (υ, ***Greek nu***):
Number of peaks that pass a given point per second.

Units: Cycles/second or s^{-1} or Hertz (Hz)
دورة/ثانية
عدد القمم التي تمر بنقطة معينة خلال ثانية واحدة
الموجات

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$
ثابت — التردد — الطول الموجي

Wavenumber العدد الموجي
Number of waves per cm.
* عدد الموجات في كل سنتيمتر

$$\bar{\upsilon} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{cm}^{-1}$$



* الطول الموجي (λ): يخبرنا كم طول الموجة.
* التردد (ν): يخبرنا كم موجة تمر في ثانية واحدة.
* العدد الموجي: هو مقلوب الطول الموجي

* هناك علاقة عكسية بين الطول الموجي والتردد:
* إذا زاد الطول الموجي ← قل التردد. + عدد القمم
* إذا قل الطول الموجي ← زاد التردد + عدد القمم

* طول موجي ↓ , تردد ↑ , عدد موجي ↑ , طاقة ↑

Wave nature of light can explain phenomena such as reflection, refraction and diffraction. الانعكاس، والانكسار، والحيود كلها ناتجة عن الطبيعة الموجية للضوء

الدكتور حكى من أصل 30 سؤال يجي 3 أسئلة عليه !!!

Wave Calculation

The wavelength of a laser pointer is reported to be 663 nm. What is the frequency of this light?

لازم بـ m

انتبه دائمًا إلى تحويل nm إلى m قبل التعويض في القانون

نضرب بـ 10^{-9}

$$\upsilon = \frac{c}{\lambda}$$

سرعة الضوء (ثابت حفظ)

$$\lambda = 663\ \text{nm} \times \frac{10^{-9}\ \text{m}}{\text{nm}} = 6.63 \times 10^{-7}\ \text{m}$$

ثابت سرعة الضوء

$$\upsilon = \frac{3.00 \times 10^{8}\ \text{m/s}}{6.63 \times 10^{-7}\ \text{m}} = 4.52 \times 10^{14}\ \text{s}^{-1}$$

تعويض مباشر

Calculate the wavelength of light, in nm, of light with a frequency of $3.52 \times 10^{14}\ s^{-1}$.

هون العكس يعطي التردد ويطلب الطول الموجي يعني فكرتين نركز أهم شي على الوحدات والتحويل

$$\lambda = \frac{c}{\upsilon}$$

$$\lambda = \frac{3.00 \times 10^{8}\ m/s}{3.52 \times 10^{14}\ s^{-1}} = 8.52 \times 10^{-7}\ m$$

الجواب يلي رح يطلع رح يكون بـ m ويجب التحويل الى nm في النهاية (الضرب بـ 10^9)

$$\lambda = 8.52 \times 10^{-7}\ m \times \frac{10^{9}\ nm}{m} = 852\ nm$$

يتكون الإشعاع الكهرومغناطيسي من حزم منفصلة من الطاقة تُسمى الفوتونات

- Electromagnetic radiation consists of discrete packets of energy, which we call photons.
- Photons are the particles of light or the quanta of light.
- Each photon carries the energy, E (Joule).

$$E = h\upsilon$$

ثابت بلانك — تردد

- الفوتونات هي جسيمات الضوء أو كمّات الضوء.
- يحمل كل فوتون طاقة مقدارها E (بوحدة الجول)

where h is the Planck's constant (=6.626x10^{-34} J.s)

- The all characteristics of light can be related as follows:

$$E = h\upsilon = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\upsilon}$$

$\bar{\upsilon} = \frac{1}{\lambda}$ العدد الموجي

The greater the energy, the higher the frequency and wavenumber and the shorter the wavelength

كلما زادت الطاقة، زاد التردد والعدد الموجي، وقل الطول الموجي

The particle nature can explain phenomena like absorption and emission of light. تفسر الطبيعة الجسيمية للضوء ظواهر مثل امتصاص الضوء وانبعاثه.

توضح معادلة بلانك العلاقة بين تردد الضوء وطاقة الفوتون

Planck's Equation: The relationship between frequency ν of light and energy E,

$$E = h\nu$$

h = Planck's constant = 6.6×10^{-27} $cm^2.g.\ s^{-1}$ = 6.6×10^{-34} joule.sec

In vacuum, velocity of light = $c = \nu\lambda = 3 \times 10^{10}$cm/s which gives, $\nu = c/\lambda$

$E = h(c/\lambda) = hc\bar{\nu}$ (where, $\bar{\nu} = 1/\lambda$ = wavenumber)

Energy directly proportional to wavenumber

الطاقة تتناسب طرديًا مع العدد الموجي.

Calculate the energy (in joules) of a photon with a wavelength of 700.0 nm

شو ما كان لازم الطول الموجي ب m !!!!!! (ضرب 10^{9}) *

لاختصار الوحدات

$$\frac{J \cdot s * m/s}{m} = J$$

$$\lambda = 700.0\ \text{nm} \times \frac{10^{-9}\ \text{m}}{\text{nm}} = 7.00 \times 10^{-7}\ \text{m}$$

$$\upsilon = \frac{3.00 \times 10^{8}\ \text{m/s}}{7.00 \times 10^{-7}\ \text{m}} = 4.29 \times 10^{14}\ \text{s}^{-1}$$

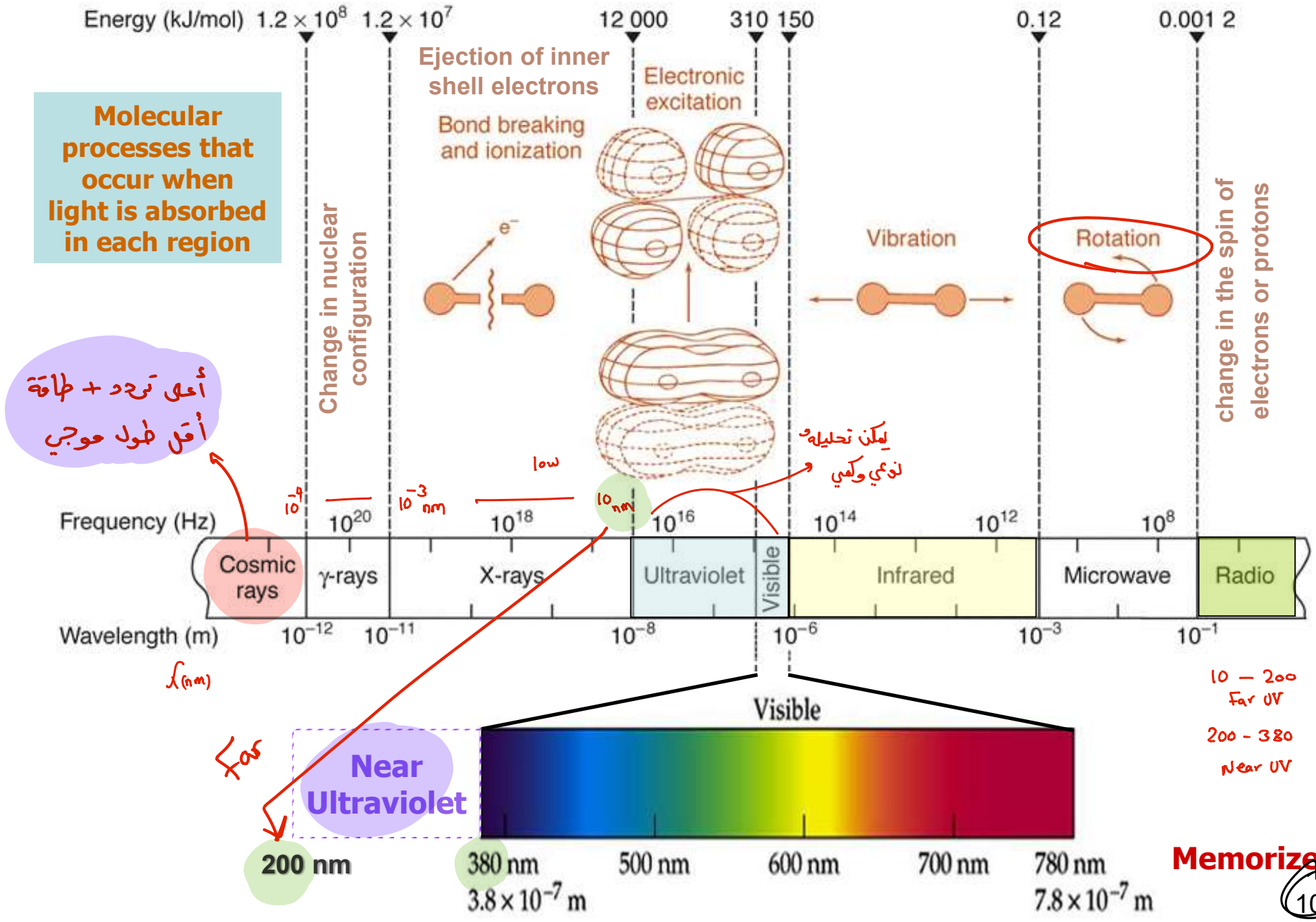
$$E = (6.63 \times 10^{-34}\ \text{J} \cdot \text{s})(4.29 \times 10^{14}\ \text{s}^{-1})$$

$$E = 2.84 \times 10^{-19}\ \text{J}$$

إذا أعطاك السؤال:

* التردد ← استخدم. $E = h\upsilon$
* الطول الموجي ← استخدم. $E = \frac{hc}{\lambda}$
* العدد الموجي ← استخدم $E = hc\bar{\upsilon}$

Regions of electromagnetic radiation



Regions of electromagnetic radiation

* الانتقال من اليسار الى اليمين
$E \downarrow$ و $\nu \downarrow$ و $\lambda \uparrow$

* كلما زادت طاقة الإشعاع: طاقة أعلى

ترتيب المناطق من الأعلى طاقة إلى الأقل طاقة

Cosmic rays → γ – rays → X – rays → UV → Visible → IR → Microwave → Radio

كلما اتجهنا إلى اليسار:
الطاقة ↑ ، التردد ↑ ، الطول الموجي ↓

كلما اتجهنا إلى اليمين:
الطاقة ↓ ، التردد ↓ ، الطول الموجي ↑

الأشعة السينية X-rays
* طاقتها عالية.
* طولها الموجي قصير.
تستطيع التفاعل مع الإلكترونات الداخلية للذرة

الأشعة الكونية Cosmic rays
الطاقة: عالية جدًا جدًا
الطول الموجي: قصير جدًا جدًا.

هذه أعلى منطقة تقريبًا من حيث الطاقة، لذلك يمكنها إحداث تغيرات قوية جدًا في المادة.

IR
هذه مهمة جدًا أيضًا.
وتنقسم تقريبًا إلى:
تحت الحمراء القريبة
780-2500{nm}
تحت الحمراء المتوسطة
2500-25000{nm}
تحت الحمراء البعيدة
تقريبًا:
25000-300000{nm}

موجات الراديو Radio waves

* أقل طاقة.
* أطول طول موجي.

تسبب تغيرًا في:

دوران الإلكترونات أو النوى

UV
هذه مهمة جدًا في التحليل الطيفي.
وتنقسم تقريبًا إلى:
far
الأشعة فوق البنفسجية البعيدة
10-200nm
near
الأشعة فوق البنفسجية القريبة
200-380nm

أشعة غاما γ-rays
* طاقة عالية جدًا.
* طول موجي قصير جدًا.
* تردد مرتفع جدًا.
تُستخدم في عمليات مثل التأين، وقد تسبب تغيرات في النواة

Microwaves
طولها الموجي أكبر من الأشعة تحت الحمراء.
عند امتصاصها، تسبب:
تغيرًا في دوران الجزيئات

يعني الجزيء يبدأ بالدوران بطريقة مختلفة.

الضوء المرئي Visible
مداه تقريبًا:
380-780nm}
وهذا هو الجزء الذي تستطيع العين رؤيته.
يشمل الألوان المختلفة

Absorption of light

الجزيء الذي يمتص فوتونات الضوء تزداد طاقته ①

A **molecule** that absorbs light photons will end up with increased energy. The molecule will be promoted to an **excited** state. Microwave energy will cause rotation of compounds. IR energy is high enough to promote bond stretching. UV/Vis energy promotes electrons into higher orbitals. Short-λ UV and X-rays can ionize molecules or even break bonds.

نتقل الجزيء إلى حالة مثارة ②

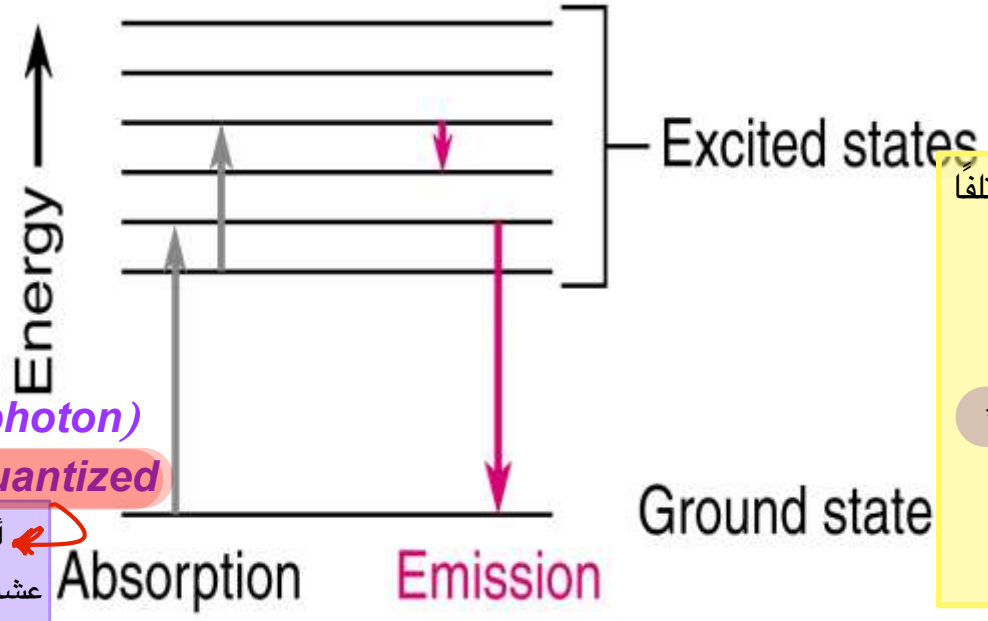
طاقة الموجات الميكروية تسبب دوران الجزيئات ③

طاقة الأشعة تحت الحمراء تكون كافية لإحداث تمدد في الروابط ④

طاقة الأشعة فوق البنفسجية/المرئية تؤدي إلى انتقال الإلكترونات إلى مدارات ذات طاقة أعلى ⑤

الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الطول الموجي والأشعة السينية يمكن أن تؤدي إلى تأين الجزيئات أو حتى كسر الروابط ⑥

E >> Vib >> Rot



وكل نوع من الإشعاع يسبب نوعًا مختلفًا من التغير:

* Microwave → دوران.
* IR → اهتزاز وتمدد الروابط.
* UV/Visible → انتقال إلكترونات.
* UV قصير و X-rays → تأين أو كسر روابط

$\Delta E\,(molecule) = E\,(photon)$

absorbed light is quantized

أي أن الجزيء لا يمتص أي كمية عشوائية من الطاقة، بل يمتص كمية محددة من الطاقة تساوي طاقة الفوتون

Most excited molecules relax again to the ground state emitting the excess energy in the form of heat.

معظم الجزيئات المثارة تعود مرة أخرى إلى الحالة الأرضية، وتُطلق الطاقة الزائدة على شكل حرارة

Ultraviolet-Visible Spectrophotometry

ماذا يحدث عندما يمتص الجزيء الأشعة فوق البنفسجية والمرئية

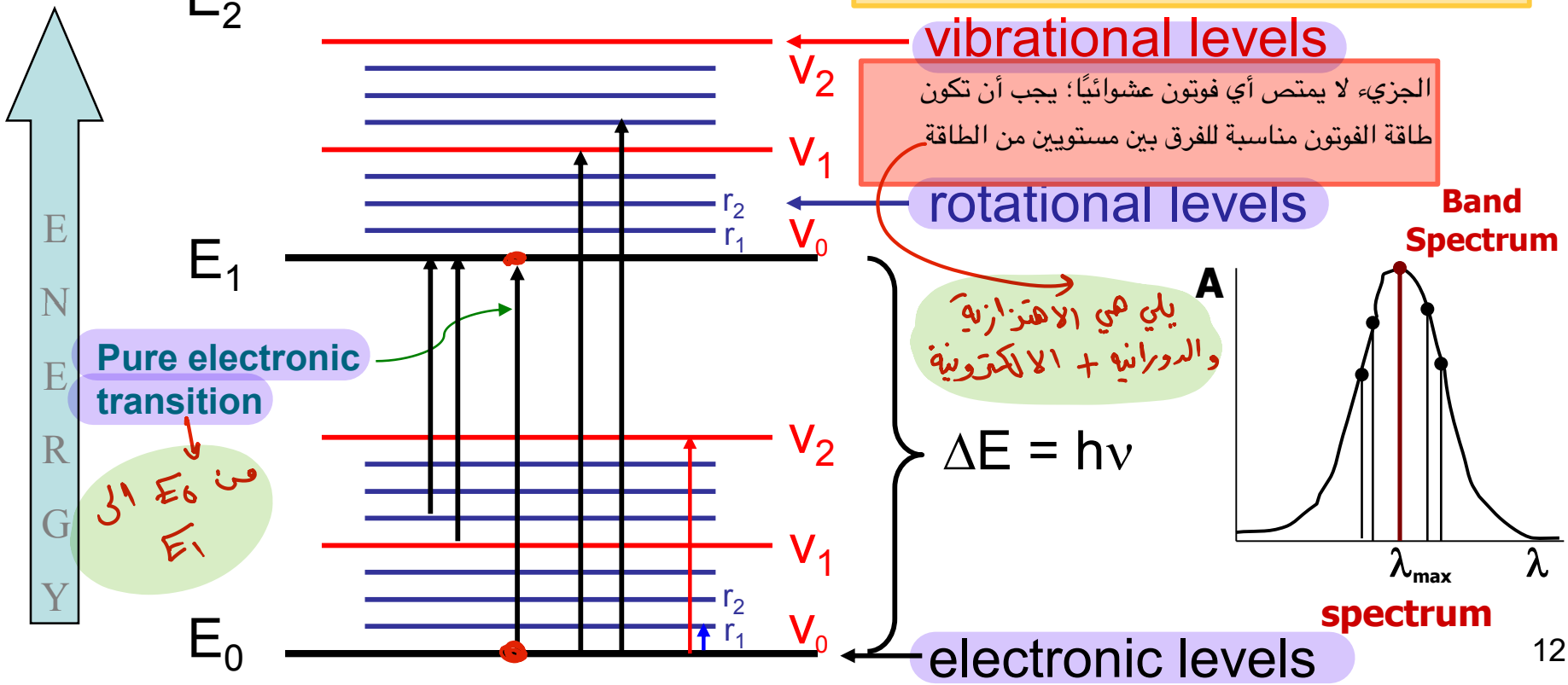
What happens when a molecule absorbs UV-Visible radiations?

- When a molecule absorbs light having sufficient energy (e.g. UV-Vis radiation) to cause an electronic transitions, (additional vibration and rotation transitions also occur)

عندما يمتص الجزيء ضوءًا يمتلك طاقة كافية، مثل الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، لإحداث انتقال إلكتروني، تحدث أيضًا انتقالات إضافية للاهتزاز والدوران

- Molecule can absorb one photon of just the right energy to cause the following simultaneous changes:

يستطيع الجزيء امتصاص فوتون واحد يمتلك الطاقة المناسبة تمامًا لإحداث التغيرات المتزامنة التالية



الجزيء لا يمتص أي فوتون عشوائيًا؛ يجب أن تكون طاقة الفوتون مناسبة للفرق بين مستويين من الطاقة

يلي هي الاهتزازية والدورانية + الالكترونية

من E_0 الى E_1

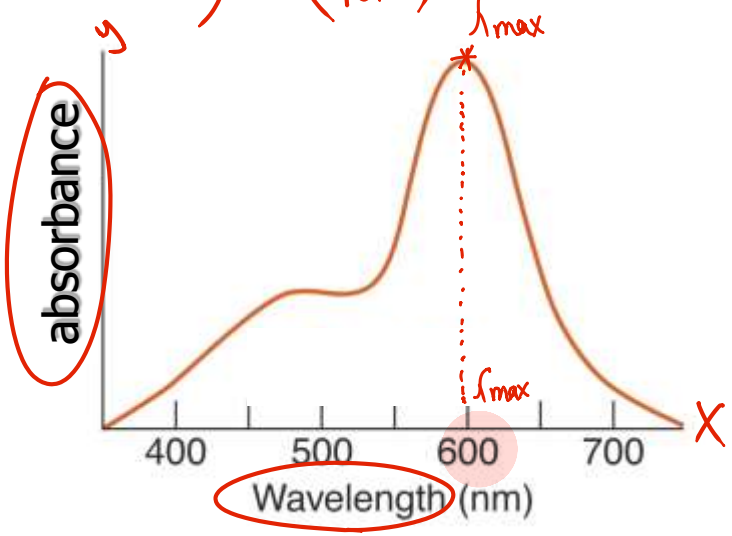
1. A transition from the ground electronic state E_0 to the E_1 excited electronic state
2. A change in the vibrational energy from the ground vibrational state of E_0 to an excited vibrational state of E_1
3. A transition from one rotational state of E_0 to a different rotational state of E_1
4. All the above transitions are quantized which means that they required certain exact amount of energy

أي أنها تحتاج إلى كميات محددة ودقيقة من الطاقة

5. Thus, total energy absorbed = $E_{elec} + E_{vib} + E_{rot} = E_{total}$

$$\Delta E_{elec} >> \Delta E_{vib} >> \Delta E_{rot}$$

As a result, a large numbers of photons of certain wavelengths are absorbed by a molecule. These individual wavelengths are too numerous and too close to each other and a spectrum of broad bands of absorbed wavelengths are obtained



Spectrum (a graph that shows how absorbance varies with wavelength)

. انتقال من الحالة الإلكترونية الأرضية E_0 إلى الحالة الإلكترونية المثارة E_1.

2. تغير في الطاقة الاهتزازية

من الحالة الاهتزازية الأرضية في E_0 إلى حالة اهتزازية مثارة في E_1.

3. انتقال من حالة دورانية في E_0 إلى حالة دورانية مختلفة في E_1.

4. جميع الانتقالات السابقة مكمَّاة

أي أنها تحتاج إلى كميات محددة ودقيقة من الطاقة

(الطاقة الممتصة الكلية)

* $\Delta E_{total} = \Delta E_{elec} + \Delta E_{vib} + \Delta E_{rot}$

* $\Delta E_{elec} > \Delta E_{vib} > \Delta E_{rot}$

الطاقة الإلكترونية أكبر بكثير من الاهتزازية
والاهتزازية أكبر بكثير من الدوراني

ولأن كل هذه الانتقالات تحتاج طاقات محددة، فإن الجزيء يمتص عددًا كبيرًا من الفوتونات ذات أطوال موجية محددة.

لكن هذه الأطوال الموجية تكون:

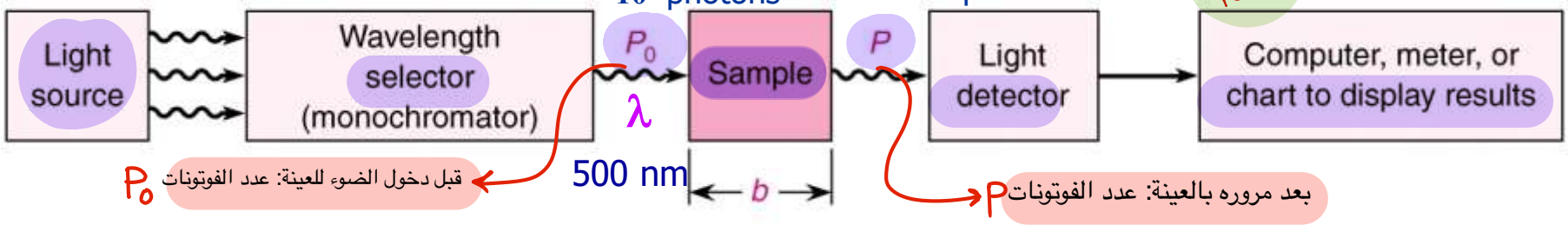
* كثيرة جدًا.
* ومتقاربة جدًا من بعضها.

لذلك لا تظهر كخطوط منفصلة، بل تظهر على شكل
حزم عريضه من الأطوال الموجية المتصة

الخلاصة:
في طيف UV-Visible، الجزيء يمتص أطوالًا موجية مختلفة بسبب الانتقالات الإلكترونية والاهتزازية والدورانية، وبما أن هذه الأطوال متقاربة جدًا، نحصل على حزم امتصاص عريضة بدلًا من خطوط منفصلة

Transmittance and Absorbance

T = 0.7, %T = 70%, A = 0.155



There are two quantities that relate the change in the intensity or radiant power of EMR before, P_0, and after, P, interaction with matter.

$P < P_0$

النفاذية

1. **Transmittance, T, is simply defined as "the fraction of light that reaches a detector after passing through a sample"**

هي نسبة الضوء الذي عبر العينة ووصل إلى الكاشف

$$T = \frac{P}{P_0}$$

$0 \leq T \leq 1$

علاقه النفاذية والامتصاصيه علاقه عكسيه

$T \uparrow$, $A \downarrow$

The percent transmittance, %T, is simply 100 T

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

$0 < \%T < 100$

هنا عكس النفاذية P_0 هي اللي في البسط!

الامتصاصية

الامتصاصية تخبرنا كمية الضوء التي امتصتها العينة بطريقة لوغاريتمية

2. **Absorbance, defined as:**

$$A = -\log T \longrightarrow A = -\log \frac{P}{P_0} \longrightarrow A = \log \left(\frac{P_0}{P}\right)$$

unitless

3

For purpose of chemical analysis

الامتصاصية تتناسب طرديًا مع عاملين

Absorbance is directly proportional to:

1. **concentration, c, of absorbing species in the sample (A α c)**
2. **path length of light, b, through the sample (A α b)**

أي كلما زادت المسافة التي يقطعها الضوء داخل العينة، زادت فرصة امتصاصه.

Beer's law

$$A = \varepsilon bc$$

بوحدة M

cm

- A الامتصاصية.
- ε معامل الامتصاص المولي
- b طول المسار الضوئي.
- C تركيز المادة الممتصة.

إذا كان طول المسار b ثابتًا، ومعامل الامتصاص ثابتًا، فإن

$A = (\varepsilon b)C$ ← بين → $y = mx$ ← $A = y$ ، $x = C$ ، $m = \varepsilon b$

The previous equation is the heart of spectrophotometry as applied to analytical chemistry, it is called Beer-Lambert law or simply Beer's law

قانون بير هو أساس التحليل الكمي باستخدام جهاز المطياف الضوئي

1- Concentration of the analyte is given in unit mol/L (M)

2-The path length, b, in cm

3-ε, is called the molar absorptivity or molar absorption coefficient

الامتصاصية المولارية — معامل الامتصاص المولاري

"Absorbance of 1 M solution measured in a cell of 1 cm path length"

الامتصاصية لمحلول تركيزه 1 مول/لتر، عندما يمر الضوء خلال مسار طوله 1 سم.

تعريف (ε)

$$\varepsilon = \frac{A}{bc} = \frac{1}{\frac{mol}{L}\,cm} = L\,mol^{-1}cm^{-1} = M^{-1}cm^{-1}$$

برضو ادع هي ← مدى قدرة المادة على امتصاص الضوء عند طول موجي معين

كل مادة لها قيمة ε خاصة بها عند طول موجي معين.

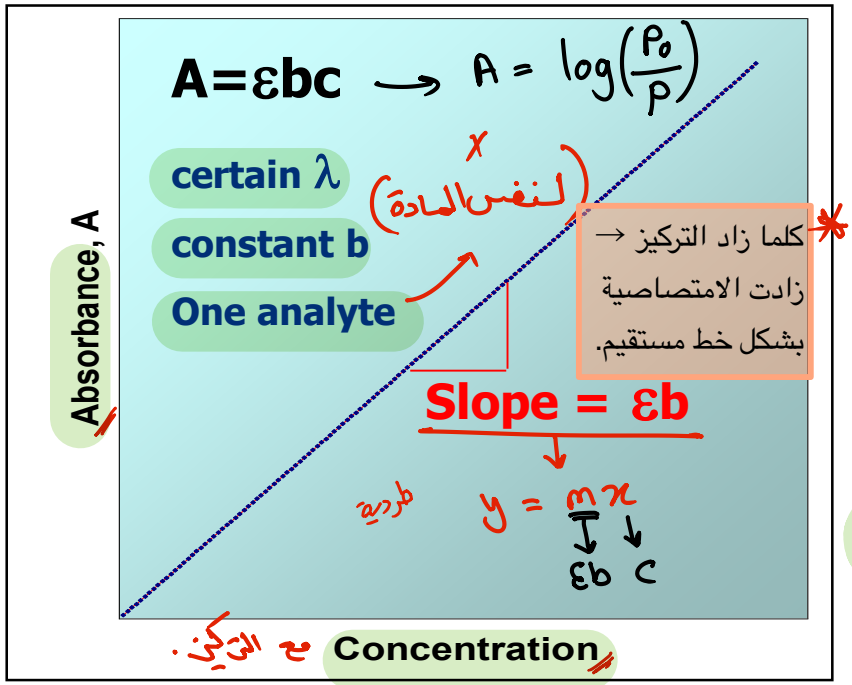
ε, is characteristic for each substance at a particular wavelength, λ.

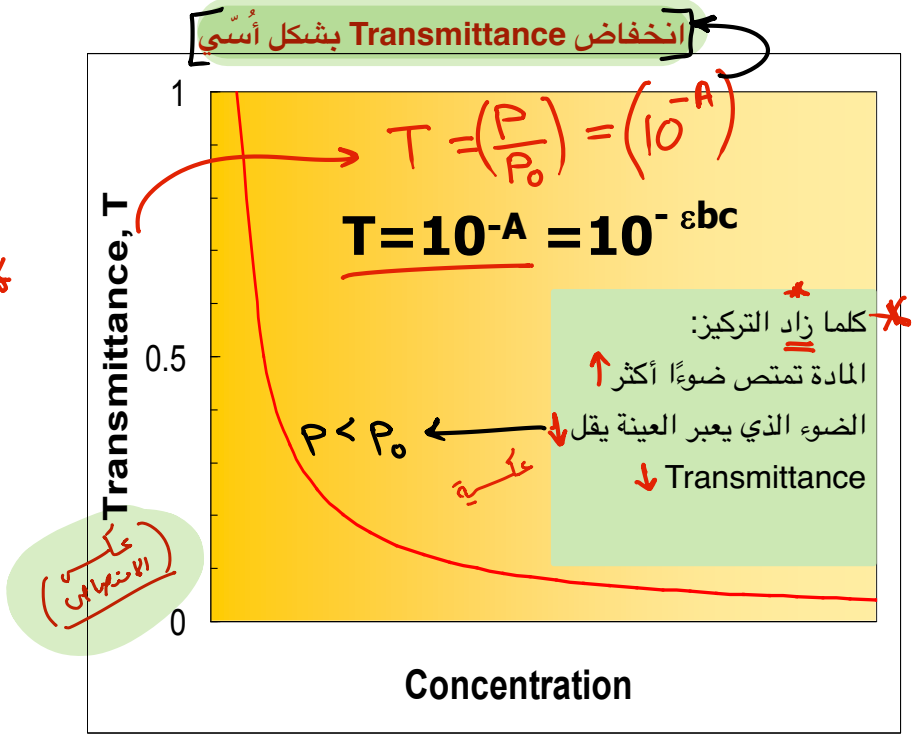
$$A = \varepsilon bc$$

يعني:

* إذا زاد التركيز c ← تزيد الامتصاصية A ↑
* إذا زاد طول المسار b ← تزيد الامتصاصية A ↑
* ε تعتمد على نوع المادة والطول الموجي

لا تزيد لمجرد أن التركيز زاد
هي ثابتة لمادة معينة عند طول موجي معين

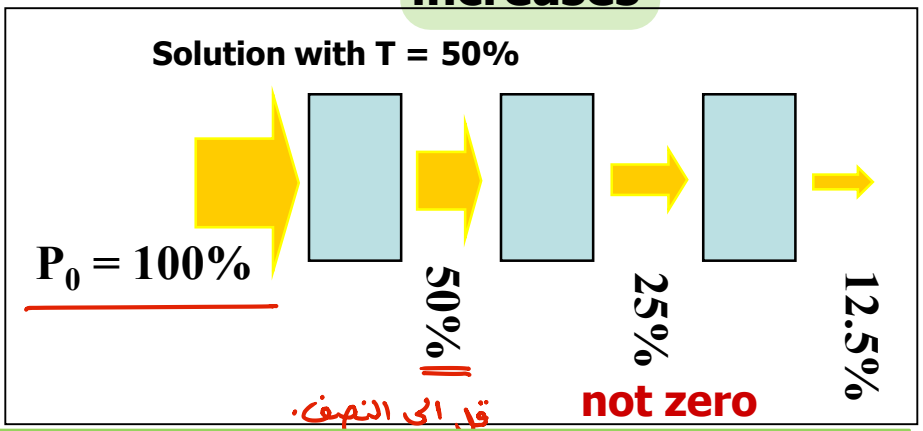




Beer's law is a relation between absorbance and concentration which is a straight line passes by origin at constant pathlength, b, and at certain wavelength, λ.

Beer's law is obeyed for monochromatic light

Transmittance decreases exponentially as concentration increases



يعني كل طبقة تمتص نصف الضوء، لكن الضوء لا يصبح صفراً مباشرة.

Detector

يقيس الضوء الذي وصل إليه.

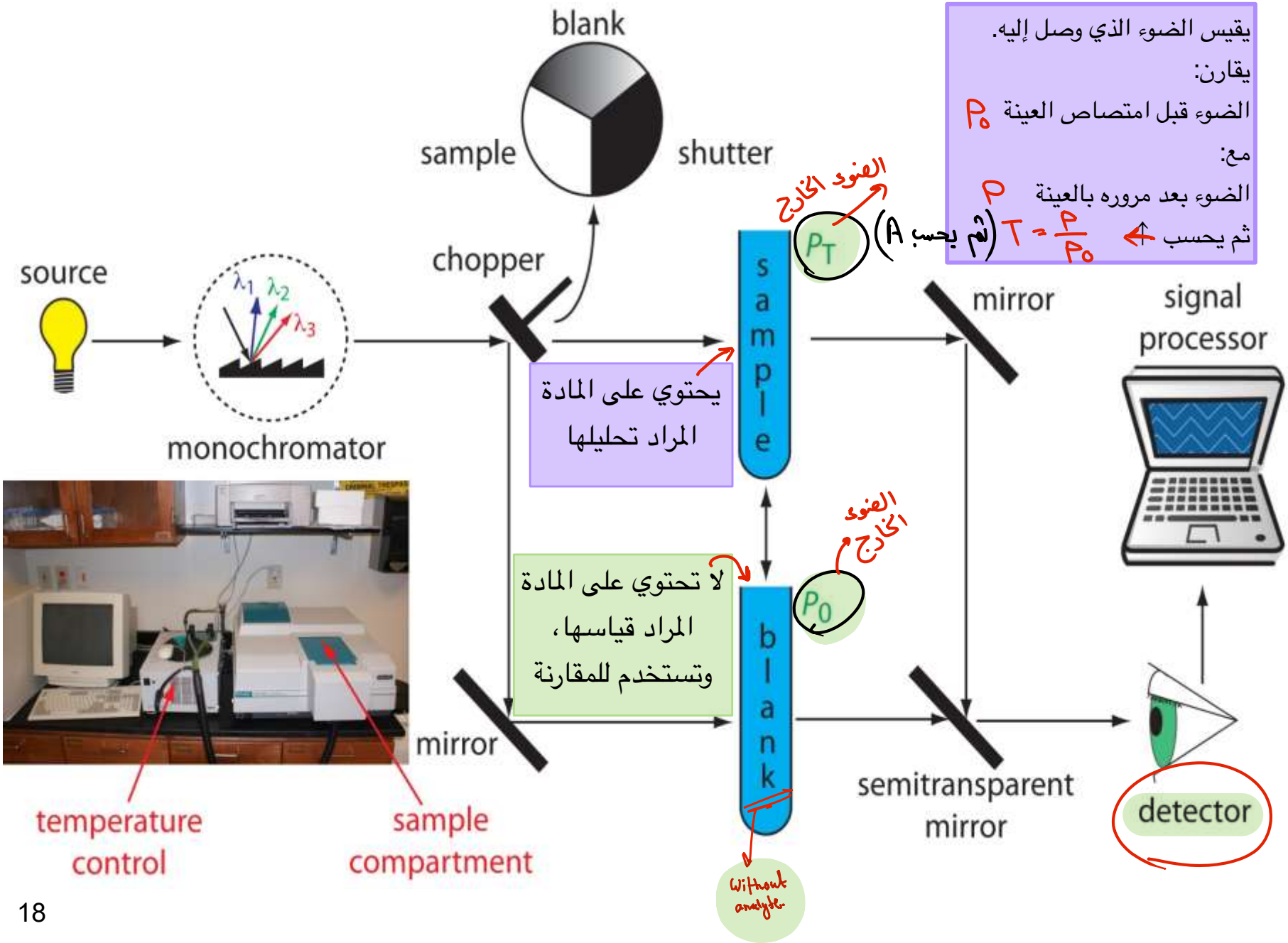
يقارن:

الضوء قبل امتصاص العينة P_0

مع:

الضوء بعد مروره بالعينة P

ثم يحسب $T = \frac{P}{P_0}$ ⇐ ثم يحسب A



Beer-Lambert's law proves a direct correlation between the absorbance (A) of a molecule to the concentration (c) and the path length (b).

علاقة A و c

Derivation of Beer Lambert Law. أحيانًا لا يكون الرسم خطًا مستقيمًا، وهذا يسمى:

This relationship is a **linear** for the most part. However, under certain circumstances the Beer relationship gives a **non-linear relationship**.

These **deviations** from the Beer Lambert law can be **classified** into three categories:

انحرافات أساسية ناتجة عن محدودية القانون نفسه

1 **Real Deviations -** These are fundamental deviations **due to the limitations of the law itself.**

بمعنى: المشكلة ليست في الجهاز ولا في العينة، بل القانون نفسه له حدود

2 **Chemical Deviations-** These are deviations observed **due to specific chemical species of the sample** which is being analyzed.

يعني المادة نفسها قد تتغير كيميائيًا

3 **Instrument Deviations -** These are deviations which occur **due to how the absorbance measurements are made.**

انحرافات تحدث بسبب طريقة إجراء قياسات الامتصاص

يعني المشكلة من الجهاز أو طريقة القياس

1- Real Deviation

Beer law and Lambert law is capable of describing absorption behavior of solutions containing relatively low amounts of solutes dissolved in it (<0.01 M or 10 mM).

* وصف سلوك امتصاص المحاليل التي تحتوي على كميات قليلة نسبيًا من المواد المذابة

عندما يكون تركيز المادة المراد تحليلها في المحلول مرتفعًا

When the concentration of the analyte in the solution is high (> 0.01 M or 10 mM), the analyte begins to behave differently due to interactions with the solvent and other solute molecules and at times even due to hydrogen bonding interactions.

وقد يكون التركيز مرتفعًا جدًا لدرجة أن جزيئات المادة تعمل كـ حاجب أو ستارة أمام جزيئات أخرى، فتمنعها من التعرض للضوء

It is also possible that the concentration is so high, that the molecules create a screen for other molecules thereby shadowing them from the incident light.

تبدأ المادة المراد تحليلها بالتصرف بشكل مختلف بسبب تفاعلاتها

* المذيب
* جزيئات المواد المذابة الأخرى
* وأحيانًا بسبب الروابط الهيدروجينية

عند زيادة تركيزها

إذن متى يحدث Real deviation؟؟؟

يحدث عند التركيزات العالية، لأن جزيئات المادة تصبح قريبة جدًا من بعضها وتتفاعل أو تحجب بعضها عن الضوء، لذلك لا يعود الامتصاص يتناسب خطيًا مع التركيز.

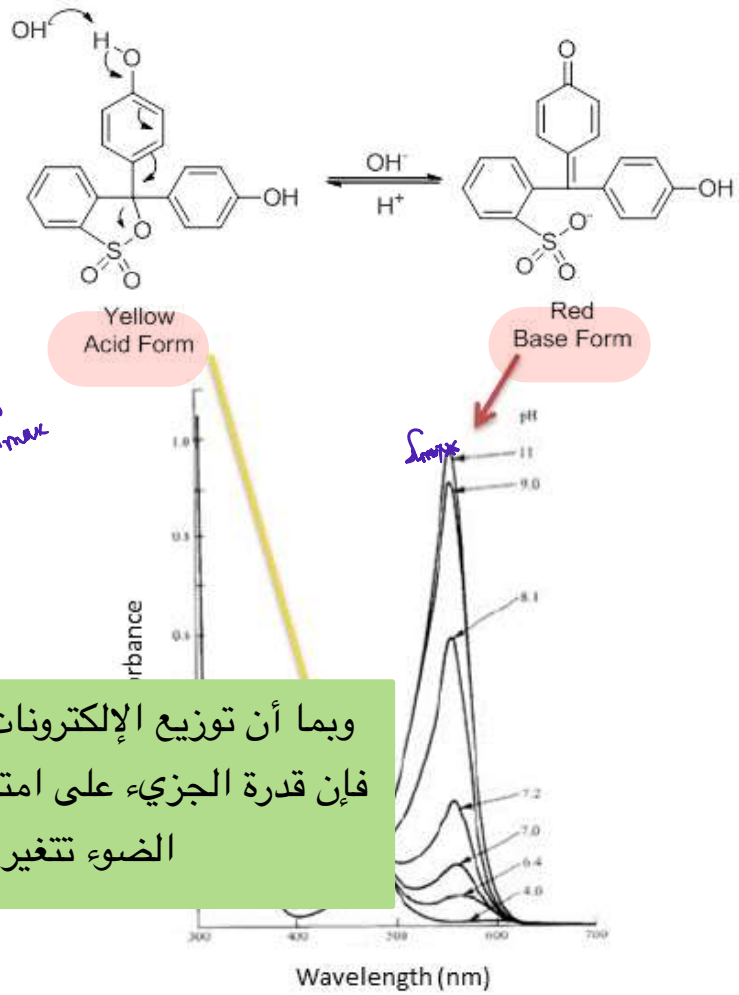
2- Chemical Deviations

ظواهر كيميائية

Chemical deviations occur due to chemical phenomenon involving the analyte molecules due to association, dissociation and interaction with the solvent to produce a product with different absorption characteristics.

وهذه التغيرات قد تنتج مادة أو شكلًا كيميائيًا جديدًا له خصائص امتصاص مختلفة.

For example, phenol red undergoes a resonance transformation when moving from the acidic form (yellow) to the basic form (red). Due to this resonance, the electron distribution of the bonds of molecule changes with the pH of the solvent in which it is dissolved.



وبما أن توزيع الإلكترونات تغير، فإن قدرة الجزيء على امتصاص الضوء تتغير أيضًا.

Resonance transformation

عندما يتغير الوسط من حمضي إلى قاعدي، يحدث تغير في توزيع الإلكترونات داخل روابط الجزيء

2 ★

3- Instrumental Deviations

بسبب الضوء متعدد الأطوال الموجية

A] Due to Polychromatic Radiation

"يحوي طول موجي واحد"

قانون بير–لامبرت يُطبَّق بدقة عندما يكون مصدر الضوء أحادي اللون

Beer-Lambert law is strictly followed when a monochromatic source of radiation exists. In practice, however, it is common to use a polychromatic source of radiation with continuous distribution of wavelengths along with a monochromators to create a monochromatic beam from this source.

لكن عمليًا، من الشائع استخدام مصدر ضوء يحتوي على مجموعة مستمرة من الأطوال الموجية:
ثم نستخدم Monochromator لاختيار حزمة ضوئية ضيقة قريبة من طول موجي واحد.

بسبب وجود الضوء الشارد أو المتشتت

B] Due to Presence of Stray Radiation

الضوء الشارد أو المتشتت هو إشعاع من الجهاز يقع خارج نطاق الطول الموجي الذي تم اختياره

Stray radiation or scattered radiation is defined as radiation from the instrument that is outside the selected wavelength band selected. Usually, this radiation is due to reflection and scattering by the surfaces of lenses, mirrors, gratings, filters and windows. If the analyte absorbs at the wavelength of the stray radiation, a deviation from Beer-Lambert law is observed similar to the deviation due to polychromatic radiation.

انعكاس تشتت
الشبكات الحيودية المرشحات

إذا كانت المادة المراد تحليلها تمتص الضوء عند الطول الموجي الخاص بالضوء الشارد، فسيحدث انحراف عن قانون بير–لامبرت، مشابه للانحراف الناتج عن الضوء متعدد الأطوال الموجية

بسبب عدم تطابق الخلايا أو الكيوفيتات

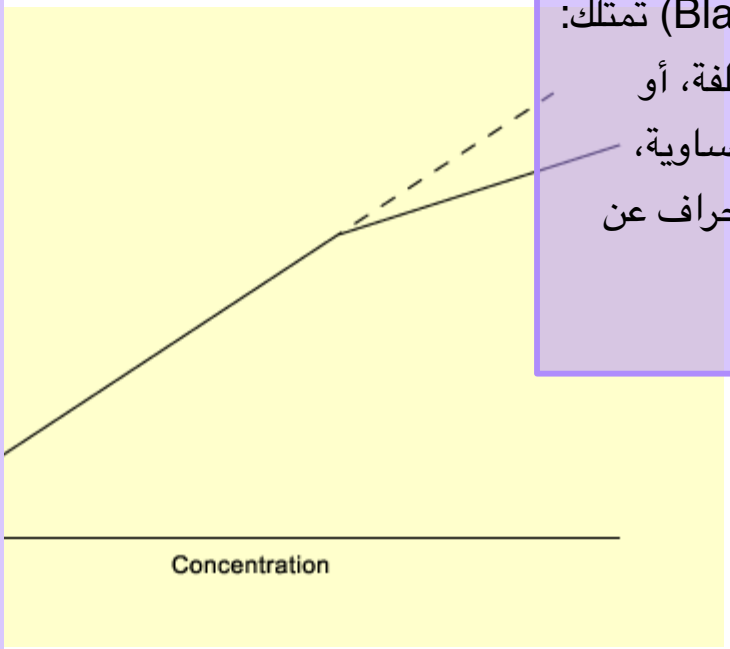
C] Due to Mismatched Cells or Cuvettes

If the cells holding the analyte and the blank solutions are having different path-lengths, or unequal optical characteristics, it is obvious that there would be a deviation observed in Beer-Lambert law.

إذا كانت الخلايا التي تحتوي على العينة والمحلول الفارغ (Blank) تمتلك:
* أطوال مسار ضوئي مختلفة، أو
* خصائص بصرية غير متساوية،
فمن الطبيعي أن يحدث انحراف عن قانون بير–لامبرت.

* Blank: للمقارنة وتصحيح امتصاص المذيب.
* Sample: تحتوي على المادة التي نريد قياسها.

تكون الكيوفيتان متطابقتين تمامًا:
لكن إذا كانت إحداهما مثلًا أطول قليلًا:
فإن الضوء سيمر خلال مسافتين مختلفتين، وبالتالي ستختلف كمية الضوء الممتصة حتى لو كانت المشكلة ليست من تركيز العينة.



eviations from Beer's Law