

## 2.2.25. АБСОРБЦІЙНА СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ В УЛЬТРАФІОЛЕТОВОМУ Й ВИДИМОМУ ДІАПАЗОНІ

### ПРИНЦИП

Спектроскопія (або спектрофотометрія) в ультрафіолетовому й видимому (УФ-ВИД) діапазоні ґрунтується на здатності атомів, молекул й іонів абсорбувати (поглинати) світло за певних довжин хвиль в ультрафіолетовому (приблизно 180–400 нм) і видимому (приблизно 400–800 нм) діапазоні. Це поглинання пов'язане зі зміною енергії атома за рахунок тимчасових переходів електронів у збуджений стан на електронні орбіталі з вищою енергією. Оскільки кожен енергетичний рівень молекули або молекулярного іона доповнюється коливальними й обертальними підрівнями, це призводить до багатьох дозволених переходів, які зазвичай неможливо розділити; так утворюються смуги поглинання, а не вузькі лінії. Ці смуги є характеристичними для функціональних груп і зв'язків у молекулі.

Вимірювання методом УФ-ВИД-спектроскопії складаються з опромінення зразка світлом і вимірювання загасання та/або розсіювання вихідного (пропущеного або відбитого) світла за певної довжини хвилі або в певному діапазоні довжин хвиль.

### ЗАСТОСУВАННЯ

Спектроскопія в УФ-ВИД-діапазоні зазвичай використовується для кількісного та якісного аналізу рідких зразків, але також підходить для твердих і газоподібних аналітів і має інше застосування, таке як визначення фізичних або хімічних властивостей.

УФ-ВИД-спектроскопія, що описана в цій статті, може застосовуватися в різних аспектах:

- коли монографія чи загальна стаття посилається на цю статтю, вимоги, зазначені у відповідних параграфах цієї статті, є обов'язковими;
- коли використовується як метод детектування в хроматографічних системах, як зазначено в загальній статті 2.2.46, вимоги, перелічені у відповідних параграфах цієї статті, є обов'язковими;
- коли використовується як інструмент процесно-аналітичної технології (РАТ) для застосування в РАТ, подібних до застосувань, описаних у цій статті, користуються положеннями цієї статті; для інших застосувань в РАТ принципи однакові, проте критерії встановлюються з урахуванням цілей аналізу, з використанням підходу оцінювання ризиків.

### ОБЛАДНАННЯ

Спектрофотометри, що використовуються для вимірювань в УФ-ВИД-діапазоні, зазвичай складаються з:

- відповідного джерела світла (наприклад, дейтерієва лампа для УФ-діапазону, вольфрамово-галогенна лампа для видимого діапазону або ксенонова лампа для всього УФ-ВИД-діапазону);
- монохроматора, такого як дифракційна решітка;
- інших оптичних компонентів, таких як лінзи або дзеркала, які передають світло через прилад і які також можуть бути використані для генерування більш ніж одного променя світла, наприклад, у двопроменевих спектрофотометрах, на відміну від однопроменевих;
- контейнера для зразків, тримача або пристрою для відбирання проб; наприклад, це можуть бути звичайні кювети, волоконно-оптичні зонди або занурювані трансмісійні комірки, що пропускають випромінювання (наприклад, високочистий кварц або сапфір, прозорі для УФ-ВИД-випромінювання); вибір залежить від передбачуваного застосування, особлива увага має приділятися придатності для певного типу випробовуваного зразка;
- детектора одноканального (наприклад, фотопомножувач, фотодіод) або багатоканального (наприклад, фотодіодна матриця (PDA) або пристрій із зарядним зв'язком (CCD));
- відповідних комп'ютеризованих систем обробки й оцінювання даних.

**Перевірка кювет.** Для лабораторних інструментів використовуються кювети або комірки з визначеною довжиною оптичного шляху. Вони можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як кварц або скло. Допустиме відхилення довжини шляху кварцових і скляних кювет становить  $\pm 0.5\%$  (наприклад,  $\pm 0.005$  см для кювет з довжиною шляху 1 см). Також можуть використовуватися пластикові кювети, але допуски довжини шляху для них ширші; тому їх використання має бути ретельно обґрунтоване й базуватися на оцінюванні ризиків.

Для контролю чистоти оптичних вікон кювет та будь-яких суттєвих відмінностей в їх товщині або паралельності може бути застосований такий метод: заповнюють кювету водою  $P$  і вимірюють її умовну оптичну густину відносно повітря за 240 нм для кварцових кювет і 650 нм для скляних кювет; повертають кювету на  $180^\circ$  у тримачі й знову вимірюють умовну оптичну густину за тієї самої довжини хвилі.

У разі використання сканувальних інструментів рекомендується сканувати ширший оптичний діапазон, ніж той, що цікавить.

У разі використання двопроменевих спектрофотометрів слід вжити заходів (наприклад, підбір відповідних кювет), щоб гарантувати, що будь-яка різ-

ниця між поглинанням кювет не матиме значного впливу на аналіз, що виконується.

#### Критерії прийнятності:

- умовна оптична густина не має перевищувати 0.093 для 1 см кварцових кювет (УФ-діапазон) і 0.035 для 1 см скляних кювет (видимий діапазон);
- оптична густина, виміряна після обертання (180 °), не має відрізнятись більш ніж на 0.005 від попередньо отриманого значення.

## ВИМІРЮВАННЯ

**Режим пропускання.** Режим пропускання забезпечує вимірювання пропускання ( $T$ ) зразка, розміщеного між джерелом світла й детектором, за певної довжини хвилі УФ-ВИД-діапазону випромінювання. Пропускання — це відношення інтенсивності світла, що пройшло крізь зразок, до інтенсивності падаючого світла, що виражається таким рівнянням:

$$T = I / I_0;$$

де  $I$  — інтенсивність випромінювання, що пройшло крізь зразок;

$I_0$  — інтенсивність випромінювання, що потрапило на зразок.

Спектр можна отримати, побудовою графіку зміни пропускання ( $T$ ) або оптичної густини ( $A$ ) як функції довжини хвилі.

**Оптична густина** визначається як десятковий логарифм зворотного коефіцієнта пропускання для монохроматичного випромінювання. Це безрозмірна величина, виражена в одиницях оптичної густини ( $AU$ ), що задається таким рівнянням:

$$A = \log_{10}(1 / T) = \log_{10}(I_0 / I),$$

Відповідно до закону Ламберта — Бера, який застосовується до прозорих розведених розчинів, за відсутності фізико-хімічних факторів, що заважають, оптична густина ( $A$ ) пропорційна довжині шляху ( $l$ ) випромінювання, що пройшло крізь зразок, і концентрації ( $c$ ) речовини в розчині відповідно до такого рівняння:

$$A = \varepsilon c l,$$

де  $\varepsilon$  — молярний показник поглинання, у літрах на моль на сантиметр;

$c$  — концентрація речовини в розчині, у молях на літр.

$l$  — довжина оптичного шляху, у сантиметрах;

Питомий показник поглинання  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  речовини зазвичай використовується в монографіях і пов'язане з оптичною густиною ( $A$ ) так:

$$A = A_{1\text{см}}^{1\%} c_m l$$

де  $c_m$  — масова концентрація речовини в розчині, в грамах на 100 мілілітрів.

$A_{1\text{см}}^{1\%}$  виражає питоме поглинання розчиненої речовини, тобто оптична густина розчину 1 г/100 мл (або 1 % м/об) в 1 см кюветі або комірці, виміряне за визначеної довжини хвилі. Зв'язок між  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  та  $\varepsilon$ :

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{M.M.}$$

де  $M.M.$  — відносна молекулярна маса

Вимірювання пропускання або оптичної густини зазвичай застосовують для рідин (дисперсій і розчинів), але воно також може застосовуватися для твердих речовин (включно з таблетками і капсулами). Для вимірювання твердих речовин використовують відповідний модуль. Рідкі зразки досліджують за допомогою кювети або комірки з підхожою довжиною оптичного шляху (зазвичай 0,01–1 см) і виготовленої з матеріалу, який є прозорим для УФ-ВИД-випромінювання, або за допомогою оптично-волоконного зонда відповідної конфігурації, зануреного в рідину.

**Режим дифузного відбиття.** Режим дифузного відбиття забезпечує вимірювання відбиття ( $R$ ), яке виражається таким рівнянням:

$$R = I / I_0;$$

де  $I$  — інтенсивність світла, відбитого та / або розсіяного від зразка;

$I_0$  — інтенсивність світла, що відбивається та/або розсіюється від поверхні холостої проби або проби порівняння, що відбиває.

Залежно від хімічного складу й фізичних характеристик зразка, УФ-ВИД-випромінювання може поглинатися під час проходження крізь зразок. У режимі дифузного відбиття детектор вимірює випромінювання, що не поглинається і яке частково відбивається та/або розсіюється від зразка. УФ-ВИД-спектри відбиття зазвичай отримують обчисленням і побудовою графіка  $\log_{10}(1/R)$  (десятькового логарифма зворотного значення відбиття) як функції довжини хвилі.

Цей режим вимірювання зазвичай вибирають для твердих речовин. Зразок досліджують або у відповідному пристрої (наприклад, тримачі для зразка), або в безпосередньому контакті із зондом. Для цілей моніторингу процесу матеріал може бути проаналізований через поліроване віконце контактної поверхні (наприклад, кварц або сапфір) або в потоці за допомогою зонда. Потрібно приділити увагу забезпеченню якомога більш відтворених умов вимірювання від одного зразка до іншого.

**Експлуатація обладнання.** Наведені нижче фактори впливають на спектральний відгук і завжди мають бути взяті до уваги.

Вибирають режим вимірювання, який підходить для передбачуваного застосування та типу зразка.

Визначають умови вимірювання, беручи до уваги розмір проби й пробовідбірник, так, щоб отримати

задовільне відношення сигнал / шум (наприклад, розмір світлового пучка, час вимірювання та кількість вимірювань). Для сканувальних спектрофотометрів також вибирають діапазон сканування, швидкість сканування та ширину щілини, які забезпечують потрібну оптичну роздільвальну здатність для передбачуваного застосування без втрати потрібного відношення сигнал / шум або лінійності аналітичної методики. У разі використання спектрофотометрів із фотодіодними матрицями немає потреби регулювати розмір пучка, діапазон сканування, швидкість сканування або ширину щілини, оскільки оптична роздільвальна здатність зазвичай фіксована і завжди реєструється повний спектр.

Перш ніж проводити вимірювання оптичної густини, слід встановити або визначити нульове положення оптичної густини (корекція базової лінії) для потрібних довжин хвиль або для відповідного діапазону довжин хвиль.

Для застосування в РАТ, коли вимірювані матеріали або зразки рухаються, слід переконатися у відсутності факторів, що впливають на роботу датчика (наприклад, відсутність забруднення або налипання матеріалу).

Якщо в монографії не зазначено інше, вимірюють оптичну густину за довжини оптичного шляху 1 см і заданої довжини хвилі. Якщо в монографії зазначено певне значення положення максимуму або мінімуму поглинання, користувач має визначити довжину хвилі цього положення. Отримане значення може відрізнятись не більш ніж на  $\pm 2$  нм, якщо не передбачено інше.

Слід уникати кількісних вимірювань, що спираються на значення оптичної густини вищі за 2.0.

**Корекція фону.** Вибирають відповідну холосту пробу для спектроскопії (наприклад, повітря, розчинник, твердий матеріал). Якщо не передбачено інше, всі вимірювання проводяться в порівнянні з тим самим розчинником або тією самою сумішшю розчинників (холоста проба).

Вимірюють холосту пробу й зразок протягом короткого проміжку часу або паралельно в двопробних спектрофотометрах, або послідовно в однопробних спектрофотометрах. Значення оптичної густини холостої проби й зразка мають бути в робочому діапазоні обладнання, як зазначено виробником.

Для лабораторних приладів оптична густина розчинника, виміряна відносно повітря та за передбачуваної довжини хвилі, не має перевищувати 0.4 і, бажано, не має перевищувати 0.2.

Для хроматографічних систем як холоста проба пропускання може використовуватися пропускання рухомої фази.

У деяких застосуваннях РАТ може бути неможливим видалення зонду для збирання фонових даних. Тому слід розглянути різні варіанти, включно з викорис-

танням внутрішніх стандартів, вимірюванням холостої проби за допомогою другого детектора тощо. Безпосередньо порівнювати між собою можна лише спектри, виміряні відносно холостої проби, що має однакові оптичні властивості.

Для вимірювання відбивання зазвичай використовують холості проби відбивання, що складаються з кераміки, фторполімерів, таких як політетрафторетилен (ПТФЕ), або порошків, таких як сульфат барію ( $\text{BaSO}_4$ ) й оксид магнію ( $\text{MgO}$ ), але інші відповідні матеріали також можуть бути використані.

## МАТЕМАТИЧНА ОБРОБКА СПЕКТРАЛЬНИХ ДАНИХ

У разі аналізу за однієї довжини хвилі, що використовується для визначення концентрації невідомої проби (наприклад, як це передбачено в монографіях), математична обробка полягає у визначенні характеристики регресійної залежності фотометричних даних, що отримуються (оптична густина), відповідно до концентрації стандартних зразків.

У разі реєстрації спектрів у всьому діапазоні перш ніж розробити модель класифікації або калібрування, може знадобитись обробка даних, отриманих як у режимі дифузного відбиття, так і в режимі пропускання. На меті може бути, наприклад, зменшення дрейфу базової лінії або корекція розсіювання, спричиненого зміною розміру частинок у твердих зразках. Наприклад, для покращення роздільної здатності або чутливості зазвичай можна використовувати похідні спектри першого, другого або вищого порядку. Ця попередня обробка може бути корисним засобом спрощення даних і тим самим зменшити коливання, які згодом можуть спричинити перешкоди в застосуванні математичних моделей.

Широкий спектр методів математичної обробки, таких як масштабування, згладжування, нормалізація та диференціювання, може застосовуватися як окремо, так і в поєднанні. Детальніша інформація доступна в загальному тексті 5.21. *Хемометричні методи, що застосовуються до аналітичних даних (5.21. Chemometric methods applied to analytical data).*

## КОНТРОЛЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ ОБЛАДНАННЯ

Функціонування спектрофотометра перевіряється (автоматично або вручну) через рівні проміжки часу, як це визначено в системі управління якістю та продиктовано умовами використання обладнання та його застосуванням. Наприклад, обладнання, яке зазнає змін температури й вологості, може потребувати більш часті перевірки функціонування.

Вимоги до контролю функціонування обладнання для різних режимів вимірювання зібрані в



Табл. 2.2.25.-1. Додаткові подібні випробування можуть бути проведені за потреби.

Привильність шкали довжин хвиль, шкали оптичної густини та лінійність контролюються за допомогою сертифікованих стандартних матеріалів, таких як тверді або рідкі фільтри у відповідних герметичних комірках або розчини, приготовані в лабораторії, як описано нижче.

**Перевірка правильності шкали довжин хвиль.** Правильність шкали довжин хвиль контролюють для відповідної кількості смуг у передбаченому спектральному діапазоні за допомогою одного або декількох стандартних матеріалів. Наприклад, для перевірки положення смуг поглинання використовують тверді або рідкі фільтри (наприклад, *гольмію перхлорату розчин Р*) або для перевірки положення лінії випромінювання вимірюють випромінювання від джерела світла. У Табл. 2.2.25.-2 наведені приклади довжин хвиль, що використовуються для перевірки правильності шкали довжин хвиль. Коли використовуються сертифіковані стандартні матеріали, еталонна довжина хвилі зазначена у відповідному сертифікаті. Деякі прилади можуть мати функцію автоматичного або вбудованого контролю точності шкали довжин хвиль.

Для хроматографічних систем також можливо контролювати правильність шкали довжин хвиль, вимірюючи оптичну густину 0.05 мг/мл розчину *кофеїну Р* в *метанолі Р*; максимум поглинання має бути за 272 нм, а мінімум — за 244 нм.

**Критерії прийнятності:**

Рекомендується перевіряти принаймні 2 довжини хвилі, що розташовані на межах передбачуваного спектрального діапазону.

Для лабораторних приладів допустиме відхилення довжини хвилі в УФ-ВИД-спектроскопії в кюветах становить  $\pm 1$  нм у діапазоні нижче 400 нм і  $\pm 3$  нм у діапазоні від 400 нм і вище.

Для хроматографічних систем допустиме відхилення довжини хвилі становить  $\pm 2$  нм для всього УФ-ВИД-діапазону.

Для застосування в РАТ рекомендоване допустиме відхилення становить  $\pm 2$  нм для УФ-ВИД-діапазону. Однак для деяких застосувань РАТ можуть знадобитися більш широкі інтервали допусків, і в цьому випадку потрібний критерій правильності шкали довжин хвиль має бути визначений користувачем залежно від передбачуваних цілей і з використанням підходу оцінювання ризиків.

Параметри приладу (особливо вхідної оптики, такі як ширина щілини або діаметр оптичного волокна) впливають на роздільвальну здатність і мають бути однаковими з тими, що призначені для вимірювань у аналізі, що виконується.

**Перевірка правильності шкали оптичної густини.** Контролюють правильність шкали оптичної густини за відповідної кількості довжин хвиль у передбаченому спектральному діапазоні, використовуючи відповідні тверді або рідкі фільтри. Перевіряють, що оптична густина, виміряна за випробовуваною довжиною хвилі, відповідає сертифікованому значенню оптичної густини фільтра або значенню, що розраховане за сертифікованим значенням питомого поглинання. *ФСЗ нікотинової кислоти для кваліфікації обладнання (Nicotinic acid for equipment qualification CRS)* може використовуватися.

Рекомендується перевіряти правильність шкали оптичної густини на вибраних довжинах хвиль за допомогою одного або декількох твердих або рідких фільтрів із різним рівнем поглинання; мінімально

Таблиця 2.2.25.-1.

*Мінімальні випробування, які виконуються для контролю функціонування обладнання*

Призначення	Методика	Правильність шкали довжин хвиль	Правильність шкали оптичної густини	Фотометрична лінійність	Розсіяне світло	Роздільвальна здатність/ширина спектральної смуги
Кількісні або граничні випробування	На основі вимірювання поглинання на одній або декількох визначених довжинах хвиль (наприклад, кількісне визначення або випробування на домішки)	X	X	X	X	Якщо зазначено у монографії
Ідентифікація	Виходячи з довжини хвилі максимумів та мінімумів поглинання	X	—	—	X	—
	На основі вимірювання поглинання та довжини хвилі у максимумі поглинання	X	X	—	X	—
	На основі порівняння спектру зі спектром стандартного зразка	X	X	—	—	—

слід перевіряти 2 значення, що розташовані на межах очікуваного інтервалу значень оптичної густини.

Для хроматографічних систем і застосування в РАТ тестування абсолютних значень оптичної густини може не знадобитися за умови, що стандартна крива вимірюється належним чином.

Для вимірювань із використанням *ФСЗ нікотинової кислоти для кваліфікації обладнання* сертифіковане значення питомого показника поглинання наведено у відповідному сертифікаті.

Розчин нікотинової кислоти готують так: розчиняють 57.0—63.0 мг *ФСЗ нікотинової кислоти для кваліфікації обладнання* в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, приготованому з *кислоти хлористоводневої Р*, і розводять тим самим розчином кислоти до 200.0 мл; 2.0 мл отриманого розчину розводять до 50.0 мл тим самим розчином кислоти, щоб отримати кінцеву концентрацію 12 мг/л. Ці об'єми можна регулювати для отримання розчинів нікотинової кислоти з іншими концентраціями (приблизно до 40 мг/л) для тестування різних рівнів поглинання. Поглинання вимірюють за 213 нм і 261 нм.

#### Критерії прийнятності:

Різниця між вимірюною оптичною густиною й оптичною густиною сертифікованого матеріалу становить  $\pm 0.010$  або  $\pm 1\%$ , залежно від того, що більше, для кожної комбінації довжини хвилі й оптичної густини, що перевіряється (застосовується до значень оптичної густини, що не перевищують 2). Для вищих значень оптичної густини допустиме відхилення визначають на підставі оцінювання ризиків.

**Контроль фотометричної лінійності.** Перевіряють фотометричну лінійність у передбаченому спектральному діапазоні. В УФ-діапазоні можуть застосовуватися фільтри, що використовуються для контролю правильності шкали оптичної густини, а також розчини нікотинової кислоти або кофеїну. У видимому діапазоні можуть використовуватися фільтри нейтрального скла. Перед виконанням випробування

слід переконатись, що оптична густина стандартів збігається з передбачуваним лінійним діапазоном.

Можуть використовуватися розчини *ФСЗ нікотинової кислоти для кваліфікації обладнання* в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, приготованому з *кислоти хлористоводневої Р* зі зростаючими концентраціями (наприклад, 5—40 мг/л). Оптичну густину вимірюють за 213 нм і 261 нм.

Для хроматографічних систем фотометрична лінійність також може перевірятися з використанням розчинів 0.5—50 мг/л *кофеїну Р у воді для хроматографії Р*. Оптичну густину вимірюють за 273 нм.

#### Критерії прийнятності:

Коефіцієнт кореляції (*R*) має бути не менше 0.999.

**Граничний рівень розсіяного світла.** Розсіяне світло визначають на відповідній довжині хвилі за допомогою відповідних твердих або рідких фільтрів або розчинів, приготованих власноруч. Параметри приладу, що перевіряються, такі як ширина щілини й тип джерела світла (наприклад, дейтерієва або вольфрамова лампа), мають бути однакові з тими, що передбачаються у вимірюваннях в аналізі, що виконується.

#### Критерії прийнятності:

Критерій прийнятності залежить від фільтрів або розчинів, що використовуються, наприклад:

- оптична густина не менше 3.0 у разі використання розчину 10 г/л *натрію йодиду Р* за 220 нм, розчину 10 г/л *калію йодиду Р* за 250 нм або розчину 50 г/л *натрію нітриту Р* за 340 нм і 370 нм;
- оптична густина не менше 2.0 у разі використання розчину 12 г/л *хлористого калію Р* за 198 нм.

Ці значення застосовуються в разі використання 1 см комірки й *води Р* як компенсаційної рідини.

**Перевірка розділювальної здатності.** Якщо це передбачено в монографії, розділювальну здатність обладнання вимірюють, або використовуючи відповідні сертифіковані стандартні матеріали, або реєструючи

Таблиця 2.2.25.-2.

Приклади довжин хвиль, що використовуються для контролю правильності шкали довжин хвиль

Матеріал		Довжини хвиль (нм)*
Розчини	Церій у сірчаній кислоті	201.1; 211.4; 222.6; 240.4; 253.7
	Дидимій у хлорній кислоті	511.8; 731.6; 794.2
	Гольмій у хлорній кислоті	241.1; 287.2; 361.3; 451.4; 485.2; 536.6; 640.5
Тверді фільтри	Дидимієве скло	513.5
	Гольмієве скло	279.3; 360.9; 453.4; 637.5
Лампи	Дейтерій	486.0; 656.1
	Ртуть (низкого тиску)	184.9; 253.7; 312.5; 365.0; 404.7;
		435.8; 546.1; 577.0; 579.1
	Неон	717.4
Ксенон	541.9; 688.2; 764.2	

\* Примітка: довжина хвилі змінюється залежно від розділювальної здатності приладу.

---

спектр 0.02 % розчину (об/об) *толуолу Р*, в *гексані Р* або *гептані Р*, використовуючи відповідно *гексан Р* або *гептан Р* як компенсаційну рідину.

*Критерії прийнятності:*

Для вимірювань, проведених з розчином, приготуваним, як описано вище, мінімальне відношення оптичної густини в максимумі (269 нм) і в мінімумі (266 нм) зазначене в монографії.

## ПРИДАТНІСТЬ СИСТЕМИ

Перед вимірюванням зразка може знадобитися випробування придатності системи для перевірки критичних параметрів, які можуть вплинути на результат.

Ці випробування можуть охоплювати правильність шкали довжин хвиль і шкали оптичної густини, розсіяне світло й фотометричну лінійність. Тести функціонування системи, наприклад ті, що виконуються в межах автоматичного тестування обладнання, можуть вважатися частиною тестів придатності системи.

У разі детектування в УФ-ВИД-діапазоні для хроматографічних систем застосовуються додаткові тести придатності системи, якщо це передбачено в монографії та/або в загальній статті 2.2.46. *Методи хроматографічного розділення.*

---

*N*

## ПЕРЕВІРКА ЗБІЖНОСТІ ОПТИЧНОЇ ГУСТИНИ

Збіжність оптичної густини може бути перевірена за такою схемою.

У вимірювальну кювету наливають випробовуваний розчин і визначають його оптичну густину проти компенсаційного розчину. Потім кювету виймають, видаляють її вміст, знову наливають випробовуваний розчин і знову визначають оптичну густину. Операцію повторюють, одержуючи не менше тридцяти значень оптичної густини для випробовуваного розчину. Слід стежити, щоб розчини, що вимірюються, не потрапляли на зовнішню стінку кювети.

*Критерії прийнятності:*

Відносне стандартне відхилення оптичної густини з рандомізацією положення кювет ( $S_{A,r}$ , %) не має перевищувати 0.25 %.

У прогнозі невизначеності спектрофотометричної методики в інших лабораторіях для величини  $S_{A,r}$  рекомендується використовувати значення 0.5 %, одержане в міжлабораторному експерименті.