Глава 3. Пробопідготовка та вимірювання

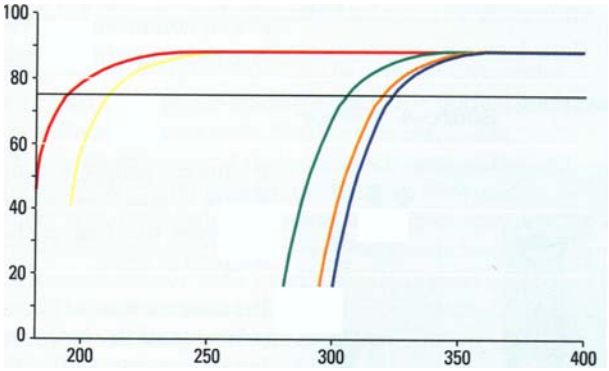
Рідкі зразки

Кювети

УФ-видима спектроскопія застосовується головним чином для вимірювання рідин або розчинів. Цей спосіб простий і дозволяє проводити більш акуратний кількісний аналіз, ніж вимірювання у випадку твердих речовин. У цій методиці в кювету вміщують рідину або розчин. В ідеалі, кювети повинні бути повністю прозорими при всіх довжинах хвиль, оскільки будь-яке поглинання за рахунок кювети зменшує ефективний лінійний динамічний діапазон для зразка. Наприклад, якщо верхня межа інструментального лінійного діапазону становить 2,5 AU, а кювета поглинає 1 AU, то придатний діапапазон для зразка залишається між 1 і 2,5 AU, тобто всього 1,5 AU.

Найдешевші кювети роблять з пластмаси, звичайно з акрилу. Ці кювети не резистентні до всіх розчинників і дуже поглинають нижче 300 нм, що робить їх непридатними для вимірювання в цій області. Послідовність (поглинання і довжина доріжки) може змінюватися від кювети до кювети, в залежності від виробника.

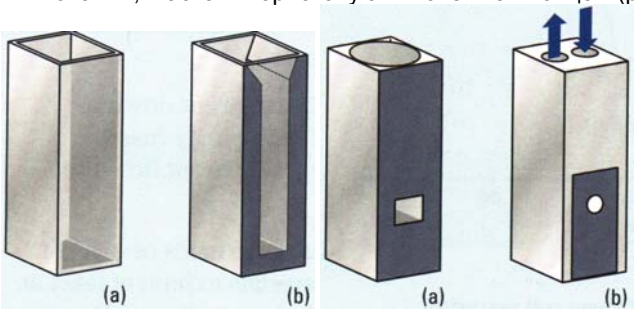
Скляні кювети дещо дорожчі від пластикових, але більш тривалі у використанні (можуть використовуватися протягом декількох років). Скло сильно поглинає нижче 320 нм і тому непридатне для вимірювань у цій області.



Сплавлені кварцеві кювети помірно прозорі до 210 нм. Найкращі кювети виготовляють із сплавленого синтетичного кремнезему високої чистоти, вони помірно прозорі до 190 нм. На рис.38 показані абсорбційні характеристики кювет із різних матеріалів. Треба пам"ятати, що всі матеріали дають як найменше 10% втрати трансмісії при всіх довжинах хвиль.

Типи кювет

Взагалі доступний широкий вибір кювет, але тут розглядаються найбільш важливі кювети. Найчастіше використовують прямокутні кювети (рис.39а). Вони придатні при довжинах доріжки від 1 до 100 мм, але найкраща довжина доріжки 10 мм. Майже всі прямокутні кювети мають товщину 12,5 мм. Якщо об"єм зразка лімітований, часто використовують кювети з віконцем (рис.39в).



Коли об"єм зразка занадто лімітований, можна використати мікрокювети, які зменшують область знаходження зразка до малесенької ділянки (типово 2х2,5 мм). Для вимірювання потрібно всього прибл. 60 мкл зразка. В спеціальних мікрокюветах можна виміряти об"єм зразка до 5 мкл. При автоматичному вимірюванні використовують проточні кювети (рис.40в). Вони бувають різних розмірів і геометричної будови і придатні для вимірювання при широкому діапазоні довжини доріжки.

При використанні кювет з віконцем і мікрокювет частина пучка світла блокується, вихід зменшується і чутливість до деякої міри коливається. Втрата чутливості залежить від розміру віконця та від оптичної геометрії.

Джерела помилки

Якщо кювети мають хороший дизайн, їх внесок в помилку при вимірюванні поглинання має бути мінімальним. Однак, аналітик повинен бути свідомим

декількох потенціальних джерел помилки.

Оскільки виміряне поглинання залежить від довжини доріжки, в абсолютних вимірюваннях важлива точність довжини доріжки. Довжина доріжки кювет хорошої якості становить плюс-мінус 0.01 мм для довжин доріжки від 0.5 до 100 нм. Для максимальної кількісної точності одна й та сама кювета повинна використовуватись для вимірювання і стандарту, і зразка.

Коли кювету вміщують в промінь зразка, вона стає активним оптичним компонентом. Не рівні (не плоскі) або не паралельні оптичні поверхні можуть викривляти оптичний промінь і викликати відповідні помилки у поглинанні (див. "Геометрія зразка"). Найкращі кювети мають дуже плоскі і дуже паралельні оптичні поверхні, які зводять до мінімуму їх вплив як оптичних компонентів. Кювета завжди повинна мати одне й те ж положення, для того, щоб оптичні ефекти були однаковими для вимірювання і сліпого досліду, і зразка.

Для кювет з віконцями ті частини, що не вміщують зразка, повинні бути добре замасковані, щоб позбутися небажаної трансмісії і відбиття через бокові стінки. Якщо не зробити цього, результати будуть помилковими. Ступінь помилки залежить від оптичної геометрії площі зразка. Якщо оптичний промінь дуже сфокусований, так що значна частина світла проходить через дуже малий отвір в кюветі, результати з незамаскованими кюветами будуть набагато акуратнішими, оскільки оптичні компоненти мають ефект самомаскування. З іншого боку, якщо оптичний промінь широкий і паралельний, велика частина світла проходить через стінки кювети, замість самого зразка, і результати будуть неакуратними.

Кювети треба берегти від подряпин, не торкатися пальцями оптичних поверхонь, бо відбитки пальців можуть спричинити значне поглинання. Якщо оптичні поверхні кювети забруднилися, кювету треба старанно протерти фотографічним матеріалом (серветкою); якщо ж кювета стала сильно забрудненою, її можна промити м"яким миючим засобом або спеціальною миючою рідиною. При дуже сильному забрудненні можна обробити кювету соляною або азотною кислотою.

Вибір розчинника

Ідеальний розчинник для приготування розчинів зразків повинен розчиняти всі види сполук, бути незаймистим і нетоксичним і повністю прозорим при всіх довжинах хвилі. До ідеалу наближається вода, але вона не придатна для багатьох неполярних органічних сполук. В табл. 4 наведені деякі з найчастіше використовуваних розчинників. За винятком води, всі ці розчинники дають скорочену (cut-off) довжину хвилі в УФ області, нижче якої вони дуже поглинають. (Табл.4 стор.68).

З леткими органічними розчинниками, такими як ацетон чи метилен хлорид, бажано користуватися закритими кюветами, щоб запобігти випаровуванню, яке дуже швидко може призвести до зміни концентрації.

Вплив розчинника, концентрації, pH та температури

Багатофакторів, включаючи розчинник, а також концентрацію, pH та температуру зразка впливають на положення та інтенсивність смуг поглинання молекул. Ці параметри слід контролювати для забезпечення максимальної точності результатів, а також при порівнянні спектрів, виміряних в різних умовах.

Полярність розчинника може змінювати електронне оточнення поглинаючого хромофора. Взагалі, величина зсуву може корелювати з полярністю розчинника. Так, наприклад, максимум поглинання ацетону може коливатися від 259 до 279 нм в залежності від розчинника, що використовується. У порівняльному аналізі для всіх вимірювань слід використовувати один розчинник.

Концентрація впливає лише на інтенсивність смуг. Однак, при високих концентраціях молекулярна взаємодія (наприклад, димеризація) може спричиняти зміни форми і положення смуги поглинання. Ці зміни в свою чергу впливають на лінійність залежності концентрація - поглинання і можуть призвести до неакуратних кількісних результатів.

Вплив pH на спектри поглинання може бути дуже значним і є результатом зсуву рівноваги між двома різними формами. Наприклад, pH-індикатори візуально змінюють колір при різних значеннях pH. Якщо на спектр дослідного зразка впливає pH, для контролю цього параметра слід використовувати буфер. Але слід пам"ятати, що більшість буферів самі проявляють значне поглинання, що може впливати на інтервал довжин хвиль, при якому проводяться вимірювання.

Температура також впливає на УФ-видимі вимірювання. Просте розширювання розчинника, властиве деяким органічним розчинникам, може бути достатнім для зміни apparent (уявного, рус.кажущегося) поглинання і, таким чином, акуратності кількісних результатів. До того ж, температура може впливати на рівноваги, які можуть бути хімічними або фізичними. Хорошим прикладом фізичної рівноваги є денатурація нуклеїнових кислот з підвищенням температури, що впливає на абсорбційну здатність. Нарешті, особливо для органічних розчинників, значними можуть бути зміни коефіцієнта рефракції із зміною температури. Коли конвекційний струм спричиняє різні температури в різних частинах кювети, ефект Шліерена (Schlieren effect), що при цьому спостерігається, може змінювати apparent поглинання. Якщо виявиться, що температура значно впливає на вимірювання, температуру зразка необхідно контролювати за допомогою термостійкого держака(?) кювети. Цей держак може бути простим держаком у водяному кожусі, з'єднаному з циркулюючою водяною банею, або приладом для контролю температури (Peltier temperature controller). З органічними розчинниками бажано використовувати кювету з пробкою, щоб запобігти ефекту Шліерена.

Тверді зразки

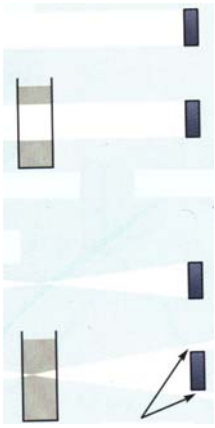
На акуратність і точність вимірювань прозорих твердих зразків, таких як скло і кристали, впливають ряд факторів.

Відсутність еталонного зразка

Для визначення спектра одного компонента у твердій матриці часто вимірюють тверді зразки. Однак, зразок матриці, що не містить аналіту, не завжди доступний. У цьому випадку вимірювання сліпого досліду треба проводити на повітрі, оскільки правильне вимірювання (матриця без аналіта) неможливе. Цей процес, у найкращому випадку, дає постійний вихід? (offset) при всіх довжинах хвиль, а в найгіршому – виміряний спектр, що є композитом аналіта і матриці. Точний кількісний аналіз можливий тоді, коли доступні два або більше стандартів і коли використовується калібрувальна крива, яка не проходить через нуль. Тоді перетин на осі **y** означає поглинання за рахунок матриці. Якщо багаторазові (multiple) стандарти недоступні, альтернативою є внутрішнє еталонування з використанням еталонної (контрольної) довжини хвилі, при якій поглинання аналіта не відбувається.

Коефіцієнт рефракції

Відсутність еталонного зразка також спричиняє значні зміни коефіцієнта рефракції між повітряним і твердим зразком. Якщо оптичний промінь падає перпендикулярно до зразка, цей ефект незначний. Якщо ж промінь фокусується, твердий зразок стає активним оптичним компонентом і впливає на довжину оптичної доріжки. Це в свою чергу може спричинити значну зміну ступеня ілюмінації детектора (див.рис.41), що призведе до помилки в уявному поглинанні. Таку проблему дуже важко виявити, і, якщо прилад з фокусованим променем, вона не має простого вирішення. Однак, цей ефект можна звести до мінімуму, якщо розмістити зразок якнайближче до детектора.



Геометрія зразка

Тверді зразки часто можуть бути скляними або пластиковими фільтрами чи лінзами. Такі зразки є активними оптичними компонентами в системі і спричиняють відхилення чи зміну фокальної довжини променя світла. В результаті, детектор невзмозі відчути частину світла (див.рис.42), яке потім вимірюється як уявне поглинання. Цей ефект можна виявити через обертання чи утримування зразка в його держаку і звести до мінімуму, розмістивши зразок як найближче до детектора.

Слабке поглинання

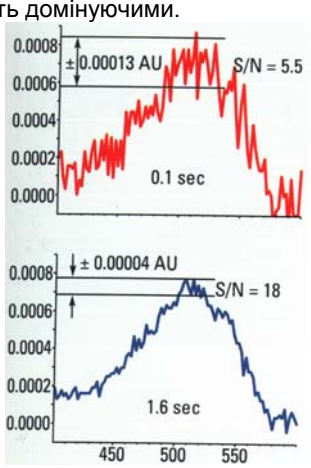
Часто повторюваною проблемою в аналітичній хімії є низька чутливість, яка може бути результатом низьких концентрацій зразка або дуже слабкої абсорбційної здатності аналіта. При слабкому поглинанні шум при вимірюванні викликає неточність результатів, тому будь-яке вимірювання може бути неточним. Зменшення рівня шуму напряму покращує точність результатів. Specification (уточнення ?) шуму має бути ключовим параметром при виборі СФ, але слід пам”ятати, що рівень шуму можна зменшити, варіюючи параметри вимірювання.

Зміна ширини щілини

Якщо СФ має змінну ширину щілини, рівень шуму можна зменшити, збільшивши ширину щілини для проходження більшої кількості світла. Це покращить співвідношення С/Ш, але зменшить роздільну здатність приладу.

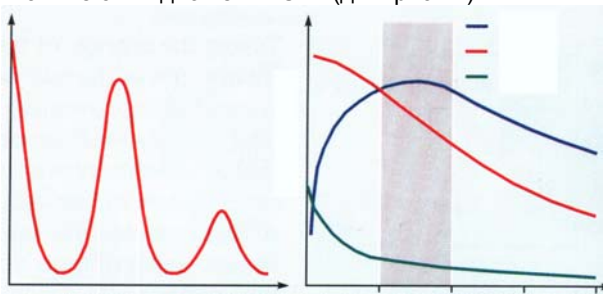
Усереднювання часу

Використання усереднених точок даних зменшує шум на корінь квадратний числа усереднених точок . На рис.43 наведено приклад покрашення співвідношення С/Ш з підвищенням інтеграційного часу для барвника з дуже низькою концентрацією. Вимірювання проводилось на СФ з діодним пристроєм з інтеграційним часом від 0.1 до 1.6 сек. Слід пам'ятати, що збільшення інтеграційного часу покращуватиме чутливість лише до тих пір, поки інші ефекти, такі як дрейф, не стануть домінуючими.



Усереднювання довжини хвилі

Іншою технікою усереднювання є усереднювання довжини хвилі. На рис.44 показана широка смуга поглинання. Традиційні кількісні вимірювання можна проводити при максимумі поглинання. Якщо дані доступні при всіх довжинах хвиль, то додаткові значення на будь-якому боці максимуму можна усереднити. Зменшення шуму еквівалентне кореню квадратному числа точок. Однак, оскільки додається більше точок, усереднене поглинання зменшується, що негативно впливає на сигнал. Для заданої ширини смуги поглинання певне число точок дасть оптимальне співвідношення С/Ш (див. рис.44).



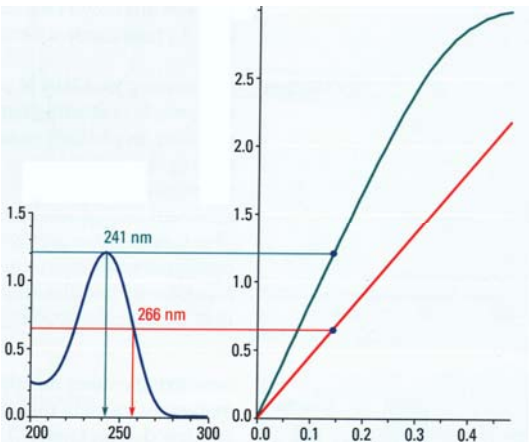
Дрейф також впливає на правильність вимірювання поглинання. При низьких рівнях поглинання для підвищення точності та акуратності можна використати внутрішнє еталонування (див. далі "Внутрішнє еталонування").

Сильне поглинання

Якщо зразки дуже сильно поглинають, лінійний динамічний діапазон приладу порушується (перевищується) і залежність між поглинанням і концентрацією стає нелінійною (див. вище "Лінійний динамічний діапазон). Найлегше вирішення цієї проблеми – це розбавити зразок до рівня поглинання в лінійному динамічному діапазоні. Але з твердими зразками це неможливо. Крім того, будь-яка стадія підготовки зразка, навіть розбавлення , вносить помилку. Альтернативою є вибір однієї чи більше довжин хвилі на боці смуги поглинання, де поглинальна здатність низька (рис.45). Якщо для калібрування використовується довжина хвилі максимуму поглинання (241 нм), максимальна концентрація прибл.0.26 мг/мл може бути виміряна з достатньою точністю. Однак, перехід до поглинання на боці смуги (266 нм) дає можливість з такою ж точністю вимірювати концентрації до 5 мг/мл. Передумовою для застосування цієї методики є відмінне відтворення довжини хвилі (див. вище "Акуратність і точність довжини хвилі").

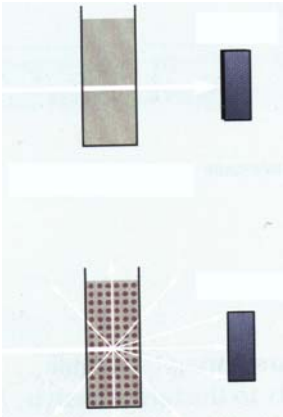
Інтерференція

Види інтерференції



В ідеалі, поглинання, що має місце при вимірюванні в УФ-видимій області, повинне бути за рахунок лише самого аналіта. Однак, на практиці поглинання, що заважають вимірюванням, часто бувають з хімічних або фізичних причин.

Інші поглинаючі сполуки. Наявність будь-якої іншої сполуки, що поглинає в тому ж діапазоні, що й аналіт, вносить помилку у вимірювання поглинання. В деяких випадках присутня лише одна відома заважаюча сполука, наприклад, побічний продукт синтезу фармацевтичного продукту. В інших випадках, широке матричне поглинання можуть викликати численні поглинаючі речовини, більшість з них невідомі (наприклад, біологічні об"єкти, такі як кров та ін.).



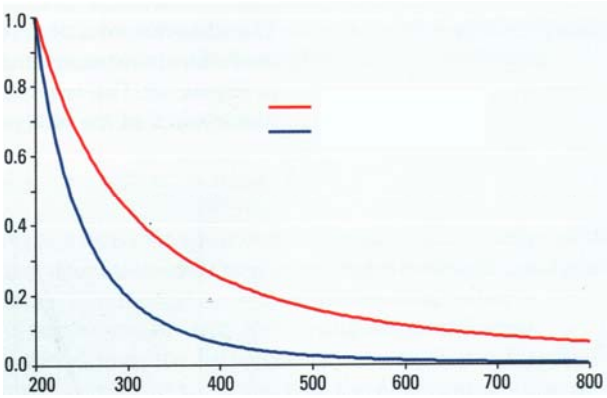
Розсіювання. Проблемою, що часто зустрічається у фармацевтичному та біологічному аналізі, є розсіювання, викликане частинками, суспендованими в розчині. У фармацевтичних препаратах ці частинки – це різні домішки, що використовуються при виготовленні таблеток чи капсул. Розсіювання випромінювання спричиняє уявне (apparent) фонове поглинання, яке заважає вимірюванням. Фільтрування проб перед вимірюванням зменшує розсіювання, але не завжди може бути практично можливим, і аналітик часто змушений працювати із спектрами, що включають розсіюючий компонент.

Розсіювання викликає уявне поглинання, оскільки світло, замість того, щоб пройти через розчин до детектора, розсіюється в куті. Тому, якщо й немає поглинання, до детектора доходить все ж менше світла (див.рис.46).

В УФ-видимій частині спектра спостерігається два види розсіювання. Розсіювання Релея відбувається, коли частинки малі відносно довжини хвилі світла, і є обернено пропорційним четвертій силі (?) (стор.76) довжини хвилі. Розсіювання по Тіндалю відбувається, коли частинки великі відносно довжини хвилі світла, і є обернено пропорційним квадрату довжини хвилі. В хімічних системах експонента довжини хвилі може коливатися від –4 до –2, в залежності від розподілу частинок:

A розс. (див. стор.76)

де *A* - поглинання за рахунок розсіювання, - довжина хвилі, n - порядок розсіювання. Ця залежність обумовлює збільшення помилки за рахунок розсіювання при низьких довжинах хвилі, як показано на рис.47. Ефект розсіювання можна зменшити, розмістивши зразок якнайближче до детектора. Однак, при значному розсіюванні, світло втрачається і чутливість та акуратність кількісного аналізу серьйозно потерпають від цього.



Методики корекції

Для усунення або зменшення помилок за рахунок інтерференції застосовують цілий ряд методик корекції. Взагалі, якщо джерело помилки відоме і постійне від зразка до зразка, помилку можна усунути. Якщо ж джерело помилки невідоме і змінюється від зразка до зразка , помилку можна зменшити, але не усунути. Методики корекції завжди потребують даних від не менше двох довжин хвилі, а більш складні методики – даних від багатьох довжин хвилі чи спектральних даних.

Ізопоглинання

Якщо присутній відомий заважаючий компонент з відомим спектром, помилку за рахунок цього компонента при аналітичній хвилі визначуваного аналіта можна усунути, вибравши контрольну (еталонну) довжину хвилі, при якій заважаюча сполука показує таке ж саме поглинання, що й при аналітичній довжині хвилі. Поглинання при контрольній довжині хвилі віднімається від поглинання при аналітичній довжині хвилі, як показано на рис.48. Залишкове поглинання і є справжнім поглинанням аналіта. Ця методика менш надійна, коли спектри аналіта та інтерферента дуже подібні. Більше того, вона робить поправку лише на один інтерферент.

Багатокомпонентний аналіз

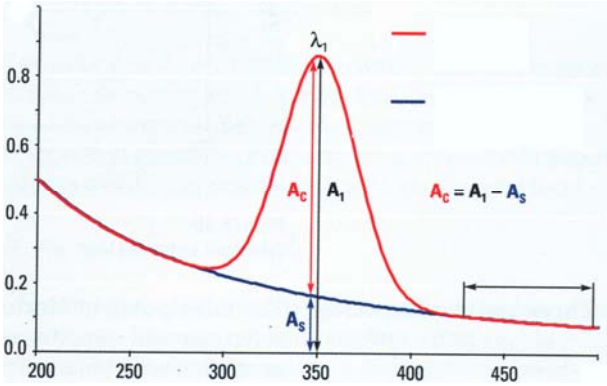
Розповсюдження ізопоглинання – це багатокомпонентний аналіз. В цьому аналізі спектри інтерферента чи інтерферентів слід вимірювати як стандарти. Ця методика особливо придатна, коли спектри сильно перекриваються і коли присутні декілька інтерферентів.

Фонове моделювання

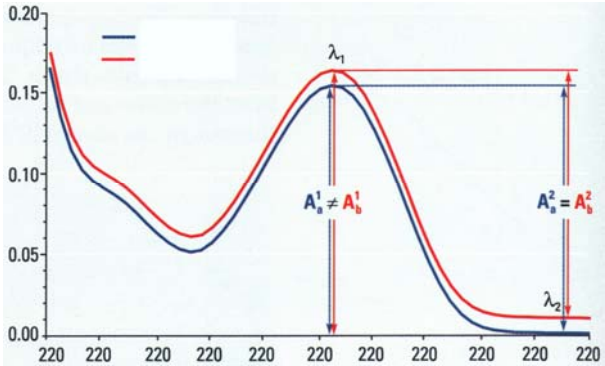
Якщо інтерференція є результатом фізичного процесу (найчастіше розсіювання), при якому інтерференцію при аналітичній довжині хвилі можна визначити екстраполяцією від моделювання при іншій довжині хвилі, застосовують фонове моделювання. Вибирається частина спектра, де уявне (apparent) поглинання є результатом лише інтерференції. Потім для цієї частини спектра пристосовують(?) поліноміал, використовуючи метод найменших квадратів для логарифму поглинання:

A = (стор.79)

де *A* - поглинання, - довжина хвилі, n – порядок залежності між поглинанням і довжиною хвилі, a – константа.



Фонове поглинання при всіх довжинах хвилі можна визначити за допомогою коефіцієнтів, визначених вище. Ці величини потім віднімають від виміряних величин, щоб одержати поглинання за рахунок аналіта, як показано на рис.49.

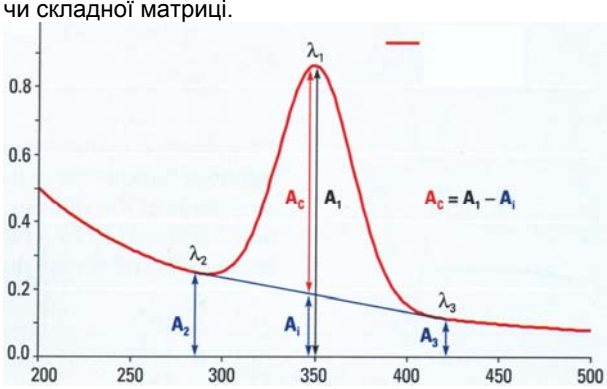


Зовнішнє еталонування

Однією з найпростіших методик корекції є зовнішнє еталонування, де використовується одна контрольна (еталонна) довжина хвилі. Цю методику найчастіше застосовують у випадках, коли між вимірюваннями спостерігається зсув основної лінії (baseline shift). Взагалі, краще вибирати контрольну довжину хвилі, по можливості найближчу до аналітичної, але з незначним поглинанням за рахунок аналіта. Поглинання при контрольній довжині хвилі віднімається від поглинання при аналітичній довжині. На будь-яку інтерференцію, яка є постійною при всіх довжинах хвилі, робиться поправка, як показано на рис.50. Хоч практично інтерференція завжди не постійна при всіх довжинах хвилі, ця проста методика часто значно покращує правильність результатів.

Триточкова корекція

Триточкова, або Morton-Stubbs, корекція використовує дві контрольні довжини хвилі, звичайно на будь-якому боці аналітичної довжини. Фонове заважаюче поглинання при аналітичній довжині хвилі потім визначають, застосовуючи лінійну інтерполяцію (див.рис.51). Цей метод репрезентує покрашення для контрольної методики з однією довжиною хвилі, оскільки в ньому робиться поправка на будь-яке фонове поглинання, що показує лінійну залежність від довжини хвилі. В багатьох випадках, якщо діапазон довжин хвиль вузький, це буде значна поправка на нелінійні фонові поглинання, наприклад, за рахунок розсіювання чи складної матриці.

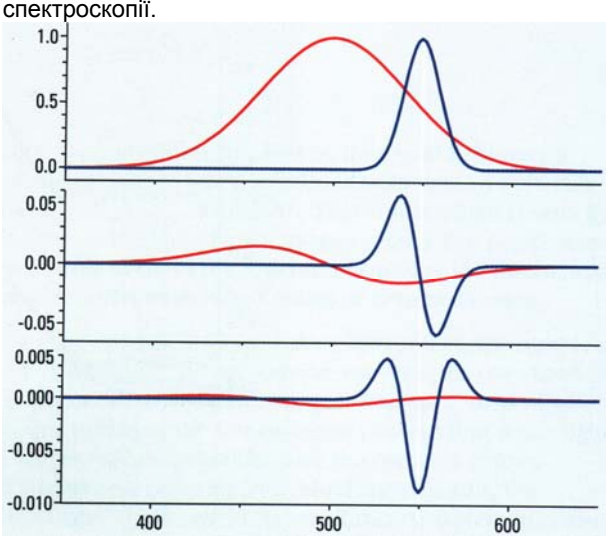


Похідна спектроскопія

Завдяки двом її властивостям похідна спектроскопія може застосовуватися для зменшення або усунення фонової інтерференції від цілого ряду джерел.По-перше, будь-які заважаючі компоненти, які проявляють прямо пропорційну залежність від різних порядків довжини хвилі із загальною формулою

A = (стор.81)

усуваються через використання вищих порядків дериватів. Так, постійний
baseline offset (a_0) усувається першим дериватом; фонове поглинання , що лінійно підвищується з довжиною хвилі, усувається другим дериватом і т.д. На жаль, лише постійний baseline offset є спільним в УФ-видимій спектроскопії.



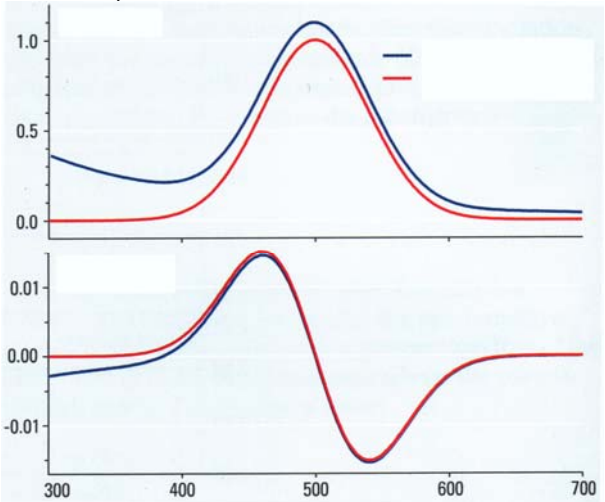
Друга і, можливо, більш важлива ніж перша, властивість. Деривати розрізняють широкі смуги поглинання відносно вузьких смуг поглинання. Це розрізнення є результатом того, що амплітуда (D^n) гауссової смуги в n-ному дериваті обернено пропорційна вихідній (original) ширині смуги (W), зведеній в n-ний ступінь:

D^n = (стор.82).

Так, для двох суміщених смуг рівної інтенсивності, але різної ширини в нульовому порядку амплітуда n-ного деривату гострішої смуги (X) більша за амплітуду ширшої смуги (У) на порядок (factor) , який залежить від відносної ширини смуги і від порядку деривату:
(див. стор.82).

На рис. 52 показано застосування дериватів двох смуг з натуральною (звичайною) шириною смуги (НШС) відповідно 160 і 40 нм. В графіку поглинання (absorbance mode) ці смуги мають однакову амплітуду. В першому дериваті вужча смуга має в 4 рази більшу амплітуду, а в другому – в 16 разів. Ця властивість покращує точність визначення будь-якого компонента з вузькою смугою в присутності будь-якого компонента з широкою смугою. Останній може бути заважаючим компонентом, як показано на рис.52.

Спектр за рахунок розсіювання – це також широка смуга і використання дериватів може зменшити його вклад також. Наприклад, на рис.53 показана смуга поглинання з НШС 40 нм і така ж смуга в присутності розсіюючого фону. Без будь-якої корекції амплітуда при 500 нм становить 1.0920 А замість 1.0 А, за рахунок вкладу розсіювання. Розрахунки при цій довжині хвилі дають помилку +9.2%. Використання першого деривату зменшує вклад за рахунок розсіювання так, що при зменшенні піка максимуму до мінімуму сигнал при наявності розсіювання становить 0.02992 А замість 0.03024 А . Тут помилка складає всього -1.1%.



Але взагалі аналітичною проблемою не є лише розсіювання, зсув основної лінії чи небажані сильно поглинаючі компоненти. До деякої міри комбінація двох чи більше цих ефектів призводить до сильного фонового поглинання матриці. Похідна спектроскопія – відмінний засіб для зменшення чи усунення цих важко визначуваних джерел помилки.

Фотохімічні проблеми

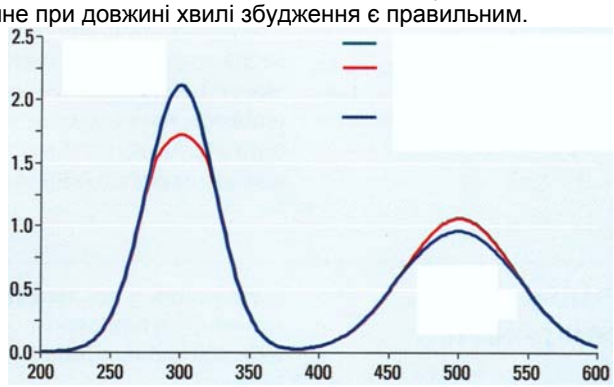
Флуоресценція

Деякі зразки флуоресціюють, тобто вони випромінюють світло в певному діапазоні довжин хвиль, коли опромінюються світлом меншої (більш енергетичної) довжини хвилі. Це випромінювання вносить помилку у вимірювання поглинання. Величина помилки залежить від типу приладу.

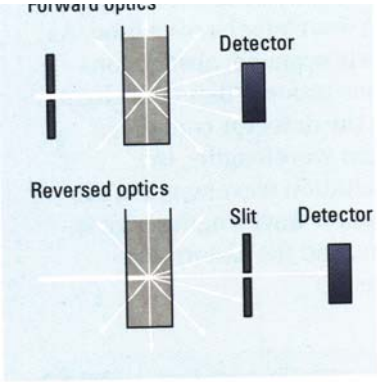
У традиційному приладі із звичайними оптичними компонентами зразок опромінюється світлом різних (змінних) довжин хвилі. Коли інтервал довжини хвилі збудження сканується(?), відбувається поглинання, яке ініціює процес флуоресценції, при якому випромінюється світло при більших довжинах хвилі. Через те, що детектор не може розрізняти індивідуальні довжини хвилі, поглинання, виміряне при довжині хвилі збудження, дуже низьке (рис.54).

Коли сканується інтервал довжини хвилі емісії, флоуоресценції не відбувається, і, таким чином, вимірювання поглинання правильні.

У приладі із запасними (резервними) оптичними компонентами зразок опромінюється світлом усіх довжин хвилі одночасно, включаючи світло при довжині хвилі збудження. Тому зразок флуоресціює і випромінює світло, але, через те, що вибір довжини хвилі відбувається після того, як світло пройде через зразок, випромінене світло відноситься до правильної довжини хвилі. Тому поглинання, виміряне при довжині хвилі емісії, дуже низьке, а виміряне при довжині хвилі збудження є правильним.



Ще одним фактором, що впливає на величину помилки, є так званий кут приймання (acceptance angle) детектора(див. рис.55). Флуоресцентне світло випромінюється у всіх напрямках. Якщо кут приймання широкий, до детектора доходить значна частина флуоресентного світла, і навпаки, якщо кут приймання вузький, лише незначна частина флуоресцентного світла доходить до детектора, і відповідно помилка в поглинанні буде незначною. Прилади з резервними оптичними компонентами мають вузький кут приймання і тому менш чутливі до флуоресцентної помилки.



Використання фільтра в промені світла може усунути помилку за рахунок флуоресценції. У звичайних приладах фільтр розміщують між зразком і детектором для усунення довжини чи довжин хвилі емісії, тоді як у приладах з резевними оптичними компонентами його розміщують між джерелом і зразком для усунення довжин хвилі збудження.

Деякі зразки чутливі до фотохімічної реакції, особливо коли опромінюються УФ світлом малої довжини хвилі. У крайніх випадках для усунення цього світла знадобиться фільтр.