**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектрометрия в ближней инфракрасной области** |  | **ОФС.1.2.1.1.0001** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0001.15** |

|  |
| --- |
|  |

Спектрометрия в ближней инфракрасной (БИК) области – метод, основанный на способности веществ поглощать электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 780 нм до 2500 нм (от 12800 см−1 до 4000 см−1).

Поглощение в БИК диапазоне связано, как правило, с обертонами основных колебательных частот связей C-H, N-H, O-H, S-H и их комбинациями. Наиболее информативным диапазоном является область от 1700 нм до 2500 нм (от 6000 см−1 до 4000 см−1).

Полосы в БИК области значительно более слабые, чем полосы основных колебаний в средней ИК области, от которых они происходят. Поскольку абсорбционные способности в БИК области малы, излучение способно проникать в материал (включая твёрдые вещества) на несколько миллиметров. Кроме того, многие вещества, такие как стекло, являются относительно прозрачными в этой области длин волн.

Для спектрометрии в БИК области характерны простота подготовки проб или отсутствие пробоподготовки, быстрота измерений, неразрушающий характер анализа (без вскрытия упаковки лекарственного препарата), одновременная оценка нескольких параметров (показателей), проведение дистанционного контроля, в том числе в технологических потоках в режиме реального времени.

**Область применения**

БИК-спектрометрия имеет широкую область применения для химического, физического и производственного анализа. Метод позволяет прямо или косвенно проводить качественную и количественную оценку химических, физических и физико-химических характеристик анализируемого объекта.

Химический анализ:

- установление подлинности субстанций, вспомогательных веществ, готовых лекарственных форм, промежуточных продуктов производственного процесса, химического сырья и упаковочных материалов;

- квалификация субстанций, вспомогательных веществ, готовых лекарственных форм, промежуточных продуктов производственного процесса и упаковочных материалов, включая спектральное сравнение серий и оценку смены поставщика;

- количественное определение содержания субстанций в матрице образца, определение химических чисел, таких как гидроксильное и йодное число, степень гидроксилирования, определение содержания воды и органических растворителей.

Физический анализ:

- установление кристаллической формы и степени кристалличности, полиморфизма, размеров частиц;

- определение распадаемости, твёрдости;

- исследование свойств плёнок.

Производственный анализ:

- мониторинг производственных операций, например, синтеза, смешивания, высушивания, гранулирования и покрытия оболочкой с целью контроля производственного процесса;

- контроль и определение конечных точек.

Анализ информации, извлекаемой из БИК-спектров, проводят с применением хемометрических алгоритмов.

**Оборудование**

БИК-спектрометры состоят из:

- источника излучения, например, высокостабильной кварцево-вольфрамовой лампы или её аналога;

- монохроматора (дифракционная решетка, призма, оптико-акустический фильтр) или интерферометра (для Фурье-спектрометров);

- регистрирующего устройства – детектора (на основе кремния, сульфида свинца, арсенида индия, арсенида индия-галлия, теллурида ртути-кадмия, дейтерированного триглицина сульфата и др.);

- устройства размещения образца и/или дистанционного оптоволоконного зонда.

Спектрометры могут быть оснащены кюветным отделением, интегрирующей сферой (представляет собой оптический компонент, состоящий из сферической полости с покрытием из хорошо отражающего материала, и предназначена для получения спектров отражения неоднородных образцов), внешними модулями для измерения пропускания сильно рассеивающих образцов, устройствами автоматической подачи образцов, оптоволоконными зондами и т.д. Выбор того или иного приспособления для анализа зависит от типа образца и выбранного способа измерения.

Для размещения образцов используют стеклянные или кварцевые кюветы, флаконы, стеклянные стаканы, держатели капсул или таблеток и другие приспособления.

Обработку данных и анализ полученных результатов проводят с использованием специального программного обеспечения.

**Проверка работы оборудования**

Для каждого режима измерения (пропускание, диффузное отражение и их комбинация) должна быть предусмотрена своя методика проверки, включающая проверку точности и воспроизводимости волновой шкалы, линейности, стабильности откликов и фотометрического шума.

***Проверка и калибровка шкалы длин волн или волновых чисел***

Для проверки точности волновой шкалы регистрируют спектр одного или нескольких стандартных образцов, имеющих характеристические максимумы и минимумы поглощения в диапазоне используемых длин волн, и сравнивают полученные значения длин волн с заявленными характеристиками. В качестве стандартов используют метиленхлорид, тальк, лампы с референсными длинами волн, смесь оксидов редкоземельных элементов, пары воды в атмосфере и др. Снимают спектр и измеряют положения не менее 3 пиков, находящихся в рабочем диапазоне.

В приборах с Фурье-преобразованием шкала волновых чисел линейна во всём рабочем диапазоне, поэтому для проверки точности волновой шкалы достаточно использовать один стандарт с контролем заявленных характеристик по одной полосе поглощения. Приборы других типов могут иметь нелинейный характер шкалы волновых чисел и требуют проверки заявленных метрологических характеристик не менее чем по 3 пикам (один или несколько стандартов) с охватом всего рабочего диапазона.

Погрешность при установке длин волн должна быть не более ±1 нм (или эквивалентная ему величина волнового числа) в диапазоне длин волн до 1900 нм и не более ±1,5 нм для диапазона длин волн ≥ 1900 нм.

***Воспроизводимость установки длины волны.*** Должна соответствовать требованиям завода-изготовителя или требованиям нормативных документов, действующих на территории Российской Федерации.

***Проверка и калибровка фотометрической линейности и стабильности откликов***

Для проверки фотометрической линейности регистрируют БИК-спектры стандартных образцов с известными значениями пропускания или отражения и строят графическую зависимость полученных значений пропускания или отражения от известных значений. Результатом построения такой зависимости должна являться прямая линия с отсечением 0,00±0,05 и тангенсом угла наклона прямой 1,00±0,05.

Для проверки фотометрической линейности в режиме отражения в качестве стандартов используют полимеры, допированные углеродом, или аналоги. Если прибор используется для измерения образцов с поглощением 1,0 и менее, то достаточно использовать 4 стандарта в диапазоне значений отражения от 10 % до 90 %, например, 10, 20, 40 и 80 % с соответствующими значениями поглощения 1,0; 0,7; 0,4 и 0,1. При измерении образца с поглощением выше 1,0 к указанному набору стандартов добавляют стандарт отражения 2 % и/или 5 %.

Для проверки фотометрической линейности в режиме пропускания в качестве стандартов используют 3 фильтра со значениями пропускания в области от 10 % до 90 % и линию 100 % пропускания, т.е. регистрируют спектр пропускания пустого канала.

Для проверки стабильности отклика периодически проводят измерение стандарта с неизмененными физическими и химическими свойствами. Измерение фона должно проводиться с помощью одного и того же внутреннего или внешнего стандарта. Отклонение фотометрического отклика не должно превышать ±2 %.

Спектры стандартных образцов отражения и пропускания подвержены вариабельности вследствие различий экспериментальных условий, в которых производилась их заводская калибровка, и условий, в которых они впоследствии использовались. Поэтому процентные значения коэффициентов отражения, предоставляемые вместе с набором калибровочных стандартных образцов, могут быть неприменимы для получения «абсолютной» калибровки конкретного прибора. Однако при условии отсутствия изменений физических или химических свойств стандартных образцов и использования такого же фонового материала сравнения, как и при получении сертифицированных значений, последующие измерения этих стандартных образцов при идентичных условиях, включая точное положение пробы, используется для оценки периода сохранения стабильности фотометрического отклика. Отклонение ±2 % от значения поглощения является приемлемым для длительной стабильности. Данная проверка необходима только в случае использования спектров без предварительной обработки.

***Проверка фотометрического шума***

Для оценки фотометрического шума при измерении пропускания записывают линию 100 % по воздуху; при измерении отражения регистрируют линию 100 % с применением подходящих стандартов с отражением не менее 99 %. При этом под линией 100 % подразумевается измерение, при котором стандарт является измеряемым образцом и фоном одновременно. При высоких значениях поглощения проводят оценку фотометрического шума с применением стандартов со значениями пропускания или отражения около 10 %.

Фотометрический шум должен соответствовать требованиям, указанным в спецификации производителя.

**Способы измерения**

БИК-спектр представляет собой зависимость соответствующей фотометрической величины (оптической плотности (*А*), коэффициента пропускания (*Т*), коэффициента отражения (*R*) и производных величин) от длины волны или частоты излучения. При измерениях в БИК области реализуются следующие способы:

- измерение пропускания (или поглощения) при прохождении излучения через образец;

- измерение излучения, отражённого или рассеянного от образца;

- комбинация вышеуказанных способов.

Измерения всегда проводят относительно фона.

***Измерение пропускания.*** Пропускание является мерой снижения интенсивности излучения при прохождении через образец. Образец помещают в оптический луч между источником и детектором. Этот принцип реализован в большинстве используемых спектрометров, и результат может быть представлен непосредственно в единицах пропускания (*T*) и/или оптической плотности (*A*):

$$T= \frac{I}{I\_{0}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I0* | – | интенсивность падающего излучения;  |
|  | *I* | − | интенсивность излучения, прошедшего через образец. |

$$A= -log\_{10}T=log\_{10}\left(\frac{1}{T}\right)= log\_{10}\left(\frac{I\_{0}}{I}\right),$$

***Измерение диффузного отражения.*** В методе диффузного отражения измеряют коэффициент отражения (*R*), представляющий отношение интенсивности света, отражённого от образца (*I*), к интенсивности света, отражённого от фона (*I*r). В зависимости от химического состава и физических характеристик образца БИК излучение может проникать на более или менее существенное расстояние вглубь образца, где может быть поглощено колебательными комбинациями и обертонами аналита, присутствующего в образце. Непоглощённое излучение отражается от образца на детектор. БИК спектр отражения обычно получают путём расчёта и построением графика зависимости log10(1/*R*) от длины волны или волнового числа.

$$R= \frac{I}{I\_{r}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I* | – | интенсивность излучения, диффузно отражённого от образца;  |
|  | *Ir* | − | интенсивность излучения, диффузно отражённого от фона или отражённого от поверхности сравнения. |

$$A\_{R}= log\_{10}\left(\frac{1}{R}\right)= log\_{10}\left(\frac{I\_{r}}{I}\right),$$

***Измерение пропускания–отражения***

Данный способ является комбинацией пропускания и отражения благодаря специальной конструкции кювет и датчиков, в которых излучение дважды проходит через образец, что позволяет анализировать образцы с низкой поглощающей и рассеивающей способностью. При измерении пропускания-отражения используют зеркало или диффузную отражающую поверхность для отражения излучения, прошедшего сквозь образец, второй раз, удваивая таким образом, оптический путь. Непоглощённое излучение отражается от образца на детектор.

В качестве фотометрической величины используют коэффициент двойного пропускания (*Т*\*) и величину, аналогичную оптической плотности (*А*\*):

$$T^{\*}= \frac{I}{I\_{T}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I* | – | интенсивность пропущенного и отражённого излучения, измеренная с образцом;  |
|  | *I*T | − | интенсивность излучения после двойного пропускания, без образца. |

$$A^{\*}= log\_{10}\left(\frac{1}{T^{\*}}\right)= log\_{10}\left(\frac{I\_{T}}{I}\right),$$

**Пробоподготовка**

Приготовление и подача образца могут различаться в зависимости от режима измерения. Следующие требования являются обязательными для всех методик пробоподготовки:

- оптимизируют время измерения и число сканирований для оптимизации отношения сигнал/шум;

- находят наиболее подходящий способ измерения для предполагаемого применения (пропускание, диффузное отражение, пропускание-отражение);

- находят наилучшую ориентацию образца (например, для минимизации влияния присутствующего тиснения на таблетках);

- находят наиболее подходящее приспособление (например, ячейка пропускания или погружной зонд);

- оптимизируют длину пути в режимах пропускания и пропускания-отражения;

- находят подходящий спектроскопический фоновый стандартный образец;

- подтверждают, что фоновый стандартный образец не меняется во времени, а показания фона являются воспроизводимыми и стабильными с течением времени;

- при измерении движущихся материалов или образцов (для измерений, касающихся производственных процессов) важным является получение репрезентативного спектра (например, с помощью корректировки времени измерения, количества сканирований, сложения индивидуальных спектров или увеличения размера луча);

- проверяют сенсор на возможное засорение, например, от налипшего материала или загрязнения;

- должны быть обоснованы условия проведения измерения (время измерения, размер луча) в отношении минимального размера образца.

При контроле процесса производства в некоторых случаях является невозможным извлечение датчика для сбора справочных данных, получаемых от сравнительного фона; при этом необходимо предусмотреть различные варианты, включая внутреннее сравнение, измерение сравнительного фона с использованием второго детектора и др. Прямое сравнение спектров возможно только при условии получения спектров относительно фона, обладающего аналогичными оптическими свойствами.

***Измерение пропускания*.** Измерение и расчёт пропускания зависит от фонового пропускания. Для определения фонового пропускания обычно используют воздух, полимерный диск, пустую кювету, используемый растворитель или в специальных случаях стандартный образец. Метод в основном применяется для исследования разведённых и неразведённых жидкостей, дисперсионных систем, растворов и твёрдых образцов (включая таблетки и капсулы). Для измерения пропускания твёрдых образцов необходимо использовать подходящие приспособления для образцов. Жидкие образцы исследуют либо в кюветах подходящей длины (от 0,5 мм до 4 мм), прозрачных в БИК области, либо путём погружения оптоволоконного зонда подходящей конфигурации.

***Измерение диффузного отражения*.** Данный способ измерения обычно используется для твёрдых тел. Образцы исследуют непосредственно, либо с помощью подходящего устройства (например, держателя образца), либо путём прямого контакта с оптоволоконным зондом. Материалы могут контролироваться через полированное окошко (например, сапфировое) или с использованием оптоволоконного зонда. Должны быть приняты меры для обеспечения воспроизводимости условий измерения спектров от образца к образцу. Для получения базовой линии сканируется отражённое излучение фона, а затем измеряется отражение одного или нескольких исследуемых образцов. В качестве стандартной отражательной поверхности обычно используются керамика, термопластические смолы, золото либо другие подходящие материалы.

***Измерение пропускания-отражения*.** Данный режим обычно используется для жидкостей, суспензий и прозрачных полимерных материалов. Отражатель размещают позади образца таким образом, чтобы удваивать оптический путь. Такая конфигурация может быть адаптирована для совместного использования одной и той же геометрии прибора для системы с отражателем и системы с оптоволоконным зондом, когда источник излучения и детектор располагаются по одну сторону образца. Образец исследуется в кювете с зеркалом или подходящим диффузным отражателем, изготовленным либо из металла, либо из инертного вещества (например, высушенного титана диоксида), которое не поглощает в БИК области. Жидкости также могут быть измерены в поточном режиме с использованием *in-line* зондов пропускания-отражения.

**Факторы, влияющие на результаты измерений**

***Окружающая среда.*** При проведении испытаний должны учитываться температура и влажность окружающей среды.

***Область контакта образца*.** Область контакта образца или конец зонда должны быть очищены перед проведением измерения. В области контакта с образцом также не должно быть значительного налипания продукта либо загрязнений, которые могут влиять на измерение.

***Температура образца*.** Температура образца может влиять как на его пропускание, так и на его отражение. Контроль температуры важен при анализе водных растворов и многих жидкостей, когда разница в несколько градусов может приводить к существенным спектральным изменениям. Кроме того, температура играет важную роль при исследовании твёрдых образцов, содержащих воду, дисперсных систем, аморфных объектов и др.

***Влага и остаточные количества растворителей*.** Наличие воды и остаточных количеств растворителей может оказать влияние на характер спектра и результаты анализа. Необходимость и условия высушивания должны быть указаны в фармакопейной статье.

***Толщина образца*.** Определяет степень пропускания. С увеличением толщины слоя наблюдается увеличение поглощения. Поэтому при сравнительных измерениях пропускания толщина образца должна быть одинаковой или учитываться. При измерении отражения толщина слоя не имеет принципиального значения, но нужно учитывать, что толщина слоя должна быть сопоставимой с глубиной проникновения луча в образец. В случае недостаточной толщины за образцом ставится дополнительный рефлектирующий материал, например штамп с золотым покрытием.

***Оптические свойства образца.*** При анализе твёрдых образцов необходимо обеспечивать максимально возможную однородность пробы, так как различия в плотности или размерах частиц сказываются на характере спектра. Спектры физически, химически или оптически гетерогенных образцов следует регистрировать либо с увеличенным размером пучка света, либо используя устройства, вращающие образцы во время измерений. При этом желательно проводить измерения каждого образца несколько раз с последующим усреднением спектров.

***Формы твёрдого состояния.*** На вибрационные спектры оказывают влияние различия в формах твёрдого состояния (полиморфные формы, гидраты, сольваты и аморфные формы). Разницав кристаллической структуре (полиморфизм) оказывает влияние на спектр, что позволяет отличать друг от друга кристаллические или аморфные формы на основании их БИК-спектров. При проведении анализа необходимо учитывать кристаллическую структуру (модификацию) эталонного спектра или калибровочного стандартного образца, используемого в методе анализа.

***Возраст образца.*** Свойства образцов могут изменяться во времени, и эти изменения могут обуславливать спектральные различия для одних и тех же образцов. В зависимости от условий хранения твёрдые образцы могут абсорбировать или терять воду, а части аморфного вещества могут кристаллизоваться. Данные изменения должны быть учтены при построении калибровочных моделей, как для целей идентификации, так и для целей количественного анализа.

**Предварительная обработка данных БИК**-**спектров**

Перед разработкой классификации или калибровочной модели во многих случаях и, в частности, для спектров, получаемых в режиме отражения, может понадобиться некоторая форма предварительной математической обработки спектра. Это может быть сделано с целью, например, уменьшения вариабельности базовой линии, уменьшения воздействия известных помех, которые оказывают влияние на последующие математические модели, или для упрощения данных перед их использованием. В некоторых случаях спектры также могут быть нормализованы или скорректировано рассеяние, например, с использованием преобразования стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением. Предварительная спектральная обработка может включать, например, кадрирование, снижение шума и численный расчёт производных спектра первого или второго порядка. Производные более высоких порядков использовать не рекомендуется ввиду увеличивающегося спектрального шума.

**Качественный анализ**

Качественный анализ (квалификация и идентификация) в БИК-спектрометрии основан на схожести спектров одного и того же вещества.

Для проведения качественного анализа первоначально создают библиотеку стандартных спектров, подбирают оптимальную математическую модель для обработки спектров и реализации алгоритмов их сравнения. Далее проводят валидацию библиотеки в совокупности с выбранной математической моделью (см. раздел «Валидация метода качественного анализа»). Качественный анализ проводят путём сравнения спектра испытуемого образца со спектрами в библиотеке (см. раздел «Анализ данных»).

***Создание библиотеки стандартных спектров***

Библиотека представляет совокупности спектров, содержащих характеристическую информацию о каждом объекте анализа. Для каждой совокупности спектров при помощи соответствующих методов и алгоритмов определяют оптимальные параметры идентификации. Заданные установки действительны для всей библиотеки. Для близких объектов, неразличимых при заданных установках, создаются подбиблиотеки, в которых могут быть использованы другие методы предварительной обработки спектров и алгоритмы анализа. Количество спектров в библиотеке зависит от её применения. Все спектры в используемой библиотеке должны иметь одинаковые спектральный диапазон и количество исходных точек, технику измерения и предварительную обработку данных.

В библиотеку включают спектры веществ, соответствующих предъявляемым требованиям, качество которых подтверждено фармакопейными или другими аттестованными методами.

Для учёта возможных вариаций свойств каждого вида анализируемых объектов регистрируют спектры нескольких серий (партий). Регистрацию спектров проводят в схожих условиях измерений и выполняют одинаковую предварительную обработку. Выбранная предварительная обработка включённых в библиотеку спектров сохраняется неизменной при последующих измерениях.

***Прямое сравнение спектров испытуемого вещества и стандартного образца.*** Если позволяет специфичность, для целей качественной химической или физической идентификации использование спектральной библиотеки сравнения может не требоваться.

***Анализ данных***

Сравнение спектров испытуемых образцов при качественном анализе проводят с индивидуальными или усреднёнными спектрами в библиотеке, в том числе с помощью различных математических методов.

Библиотека может использоваться для построения алгоритмов классификации. Возможно использование разных алгоритмов, например, метода главных компонент (МГК), комбинированного с кластерным анализом, метода SIMCA (soft independent modeling of class analogy – независимого моделирования аналогий классов), а также других алгоритмов, как включённых в математическое обеспечение БИК-спектрометров, так и разработанных третьей стороной. Надёжность используемого метода должна быть проверена. Например, коэффициент корреляции, сумма квадратов отклонений, расстояния внутри модели и прочие показатели должны быть согласованы с уровнем принятия решений, представленным в процедуре валидации.

Метод анализа должен быть валидирован.

***Валидация метода качественного анализа***

Валидация метода призвана продемонстрировать его пригодность для целей анализа.

Валидацию метода проводят на проверочном наборе объектов, не участвовавших в построении метода, и предполагает проверку специфичности, чувствительности и устойчивости (робастности).

Чувствительность показывает, какая часть объектов проверочного набора, схожих с объектами библиотеки, правильно распознаётся как «свои».

Специфичность показывает, какая часть объектов проверочного набора, отличных от библиотечных, правильно распознаётся как «чужие».

Особое внимание уделяется результатам классификации объектов, спектры которых визуально схожи со спектрами объектов библиотеки, но отличаются от них по композиции или химической структуре. Такие образцы должны правильно определяться как «чужие».

Устойчивость показывает, что незначительные изменения условий (например, температура, влажность воздуха, вибрации, температура образца, степень уплотнения материала, глубина погружения зонда, толщина слоя и т.д.) не влияют на результаты и надёжность идентификации или квалификации.

**Анализ предельного содержания**

***Относительное сравнение спектров*.** Для целей такого анализа предельного содержания, как максимальная или минимальная оптическая плотность, при которых поглощает анализируемое вещество, когда происходит сравнение спектров, калибровка не требуется. Кроме того, для контроля конечной точки сушки в пределах специфичных длин волн поглощения может быть использован такой же подход, как и в качественном анализе. Необходимо продемонстрировать пригодность спектрального диапазона и предварительной обработки данных (при её использовании) для намеченных целей.

***Специфичность*.** Для предельного испытания должна быть продемонстрирована относительная отличительная способность. Объём испытаний по определению специфичности зависит от применения и контролируемых рисков. Изменчивость в концентрациях матрикса в пределах рабочего диапазона не должна оказывать влияние на измерение.

**Анализ трендов**

***Относительное сравнение спектров*.** Калибровка не обязательна при сравнении спектров с целью анализа трендов, таких как подход подвижного блока для расчёта статистических параметров (среднее, медианное и стандартное отклонение). Например, для контроля однородности смеси с использованием БИК спектрометрии принят такой метод анализа данных. Для анализа трендов должны использоваться подходящие спектральные диапазоны и алгоритмы.

***Специфичность*.** Должна быть продемонстрирована относительная отличительная способность анализа трендов. Объём испытаний по определению специфичности зависит от применения и контролируемых рисков. Изменчивость в концентрациях матрикса в пределах рабочего диапазона не должна оказывать влияние на анализ трендов.

**Количественный анализ**

***Разработка калибровочной модели***

При разработке модели устанавливается зависимость изменения интенсивности поглощения или отражения в спектре образцов от изменения свойств и/или состава веществ. При этом регистрируют спектры образцов с известными значениями их состава и/или их свойств, подтверждённых аттестованными методами. Так как хемометрические алгоритмы не допускают экстраполяций, необходимо, чтобы область калибровочных концентраций была не менее ожидаемого диапазона анализируемых концентраций или других количественных характеристик. Калибровочные образцы должны быть по возможности равномерно распределены внутри диапазона рабочих концентраций.

Регистрацию спектров проводят при соблюдении параметров эксперимента, факторов, влияющих на результаты измерений, и первичной обработки, которые предварительно оптимизированы для всех анализируемых объектов и сохраняются постоянными при последующих измерениях.

Калибровочную модель оптимизируют при помощи подходящего способа предварительной обработки спектров, выбора спектральной области и математического алгоритма.

***Предварительная обработка данных.*** Выбор длины волны или исключение некоторых диапазонов длин волн могут увеличить правильность и робастность калибровочных моделей. К данным может быть применено сжатие длин волн (усреднение длин волн).

***Анализ данных.*** Для построения калибровочной модели может использоваться любой обоснованный математический алгоритм. Так как в области БИК диапазона наблюдается сильное перекрывание полос поглощения, количественный анализ проводят преимущественно хемометрическими алгоритмами, например, такими, как метод проекций на латентные структуры, метод регрессии на главные компоненты, метод множественной линейной регрессии, метод частных наименьших квадратов. Для калибровочных моделей, полученных методом регрессии главных компонент и методом частных наименьших квадратов, по коэффициентам регрессии и/или весовым коэффициентам можно построить график и области наибольших коэффициентов или весовых коэффициентов сопоставить со спектром анализируемого вещества.

***Валидация калибровочной модели***

Валидация модели калибровки предполагает демонстрацию её пригодности для решения поставленной цели. При этом должны быть определены следующие валидационные характеристики: специфичность (селективность), линейность, рабочий диапазон концентраций (аналитическая область), правильность, прецизионность и устойчивость (робастность).

При построении калибровочных моделей с помощью хемометрических методов анализа качество калибровки оценивается по среднеквадратичному остатку калибровки (*RMSEC*) и среднеквадратичному остатку прогноза (*RMSEP*):

,

где *N*c – число образцов калибровочного набора;

– количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;

– количественная характеристика, полученная по калибровочной модели.

,

где *N*p – число образцов проверочного набора, схожих с образцами калибровочного набора;

– количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;

– предсказанная с помощью калибровочной модели количественная характеристика.

Для сравнения результатов калибровки, построенной по БИК-спектрам, с результатами, полученными по аттестованной методике, могут быть использованы альтернативные статистические методы (парный *t*-тест, оценка смещения и др.).

При анализе БИК методом следует учитывать, корректировать и обоснованно исключать резко выделяющиеся результаты.

Все выбросы подлежат анализу и, в случае их информативной важности или подтверждения правильности с помощью аттестованной методики, они могут быть включены в модель.

**Ревалидация, или повторная валидация**

Прошедший валидацию и признанный пригодным для применения метод качественного или количественного анализа нуждается в периодической повторной валидации, или ревалидации. При выявлении отклонений необходимо провести корректировку метода.

БИК метод повторно валидируют, если:

- в библиотеку добавлен новый объект (для качественного анализа);

- есть предпосылки к изменению характеристик объектов, спектры которых уже включены в библиотеку (изменение технологии производства (синтеза), состава, качества исходного сырья, упаковки и т. д.);

- обнаружены иные изменения и/или несоответствия в свойствах анализируемых объектов или методике.

**Перенос моделей**

При переносе моделей качественного и количественного анализа с одного прибора на другой должны учитываться спектральные характеристики используемых спектрометров (разрешение, диапазон волновых чисел и др.). Под процедурами переноса моделей понимаются различные хемометрические алгоритмы (математические и статистические). После переноса на другой прибор для подтверждения работоспособности модели её необходимо ревалидировать.

**Хранение данных**

Хранение данных осуществляют в электронном виде в соответствии с требованиями программного обеспечения. При этом необходимо сохранять исходные спектры, не подвергшиеся математической обработке, с целью их возможного дальнейшего использования при оптимизации библиотек или методов.