

ISSN 2077-8333 (print)
ISSN 2311-4088 (online)

ЭПИЛЕПСИЯ и пароксизмальные состояния

2026 Том 18 №2



EPILEPSY AND PAROXYSMAL CONDITIONS

2026 Vol. 18 №2

<https://epilepsia.su>

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта epilepsia.su. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru.



<https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2026.275>

ISSN 2077-8333 (print)

ISSN 2311-4088 (online)

Определение концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

В.М. Банникова, А.А. Сеидкулиева, Ю.М. Панов, И.Д. Каргин,
П.О. Бочков

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы «Московский научно-практический центр лабораторных исследований Департамента здравоохранения г. Москвы» (Ореховый б-р, д. 49, корп. 1, Москва 115580, Российская Федерация)

Для контактов: Юрий Михайлович Панов, e-mail: PanovYM94@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Создание чувствительного и селективного метода определения концентрации вальпроевой кислоты (ВК) для терапевтического лекарственного мониторинга с использованием для анализа всего 50 мкл сыворотки крови особенно актуально для детей, у которых взятие биоматериала может вызывать трудности.

Цель: разработка и валидация методики количественного определения ВК в сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) без дериватизации с добавлением фенилуксусной кислоты в качестве внутреннего стандарта (ВС) для терапевтического лекарственного мониторинга, проведение сравнительного анализа результатов, полученных с помощью разработанного и иммунохимического методов.

Материал и методы. Извлечение ВК и ВС проводили с помощью жидкостно-жидкостной экстракции этилацетатом с предварительным подкислением сыворотки крови 1 М раствором соляной кислоты. Нижний предел количественного определения составил 5 мкг/мл, диапазон концентраций – от 5 до 200 мкг/мл. В работе использовали систему ГХ-МС, состоящую из моноквадрупольного МС-детектора Agilent 5977B SQ, оснащенного высокоэффективным источником ионизации электронным ударом, и газового хроматографа Agilent 7890 (оба – Agilent Technologies, США). Количественное определение исследуемых веществ выполняли при ионизации электронным ударом с использованием режима сканирования «мониторинг выбранных ионов». Для ВК применяли характеристичный фрагментный ион с отношением массы к заряду (m/z) 102, для ВС – характеристичный фрагментный ион наибольшей интенсивности с m/z 91. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке HP-5MS Ultra Inert 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм (Agilent Technologies, США).

Результаты. Сравнительный анализ результатов, полученных при определении содержания ВК в образцах сыворотки крови с помощью ГХ-МС и иммунохимического метода, продемонстрировал высокую степень корреляции. Показана пригодность разработанного метода для терапевтического лекарственного мониторинга.

Заключение. Разработанная методика ГХ-МС характеризуется высокой чувствительностью и селективностью и может быть рекомендована для внедрения в клиническую практику в рамках терапевтического лекарственного мониторинга концентрации ВК как альтернатива иммунохимическому методу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

пробоподготовка, жидкостно-жидкостная экстракция, валидация, газовая хроматография, масс-спектрометрия, вальпроевая кислота, терапевтический лекарственный мониторинг, эпилепсия

Для цитирования

Банникова В.М., Сеидкулиева А.А., Панов Ю.М., Каргин И.Д., Бочков П.О. Определение концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2026; 18 (2): 122–133. <https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2026.275>.

Gas chromatography-mass spectrometry for quantitating valproic acid in blood serum

V.M. Bannikova, A.A. Seidkulieva, Yu.M. Panov, I.D. Kargin, P.O. Bochkov

*Moscow Scientific and Practical Center for Laboratory Research (49 corp. 1 Orekhovyy Blvd, Moscow 115580, Russian Federation)***Corresponding author:** Yuri M. Panov, e-mail: PanovYM94@yandex.ru**ABSTRACT**

Background. Generating a sensitive and selective method to quantitate valproic acid (VPA) for therapeutic drug monitoring, using as low as 50 µl of blood serum sample, is highly relevant for pediatric patients, for whom biomaterial collection can be challenging.

Objective: To develop and validate a method to quantitate VPA level in blood serum using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) without derivatization, added with phenylacetic acid as an internal standard (IS), for therapeutic drug monitoring, and to comparatively analyze results obtained using developed method and immunochemical approach.

Material and methods. Extraction of VPA and IS was performed using liquid-liquid extraction with ethyl acetate, after pre-acidification of blood serum sample with 1 M hydrochloric acid. The lower limit of quantification was 5 µg/ml, with calibration range 5–200 µg/ml. The study employed a GC-MS system consisting of Agilent 5977B SQ single quadrupole MS-detector equipped with a high-efficiency source for electron impact ionization, and Agilent 7890 gas chromatograph (both – Agilent Technologies, USA). Analytes were quantitated by using electron impact ionization in selected ion monitoring mode. For VPA, the characteristic fragment ion with mass-to-charge ratio (m/z) 102 was used, and for IS – most intense characteristic fragment ion with m/z 91. Chromatographic separation was carried out on HP-5MS Ultra Inert column (30 m × 250 µm × 0.25 µm) (Agilent Technologies, USA).

Results. A comparative analysis of the results obtained in determining VPA level in blood serum samples using GC-MS and immunochemical method demonstrated a high degree of correlation, thereby verifying feasibility of the developed method for therapeutic drug monitoring.

Conclusion. The developed GC-MS method is characterized by high sensitivity and selectivity and can be recommended for introduction into clinical practice for therapeutic drug monitoring of VPA concentration as an alternative to immunochemical approach.

KEYWORDS

sample preparation, liquid-liquid extraction, validation, gas chromatography, mass spectrometry, valproic acid, therapeutic drug monitoring, epilepsy

For citation

Bannikova V.M., Seidkulieva A.A., Panov Yu.M., Kargin I.D., Bochkov P.O. Gas chromatography-mass spectrometry for quantitating valproic acid in blood serum. *Epilepsia i paroksizmal'nye sostoania / Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2026; 18 (2): 122–133 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2026.275>.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вальпроевая кислота (ВК), или 2-пропилвалериановая кислота, – одно из часто используемых противосудорожных средств, терапевтический лекарственный мониторинг которого является важной задачей [1]. Сегодня это вещество входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов во многих странах, включая Российскую Федерацию¹, и применяется не только в неврологии, но и в психиатрии [2, 3].

В клинической практике используются различные соли и производные ВК: вальпроаты натрия, кальция, магния, а также дивалпрокс натрия (комплексное соединение ВК и вальпроата натрия в молярном соотношении 1:1) [4]. По

данным на 2020 г., препараты ВК составили 36% всех потребляемых противосудорожных средств в России [5].

ВК наиболее эффективна при генерализованных формах эпилепсии и является антиконвульсантом первого выбора [6]. В то же время препарат имеет большое число противопоказаний, в т.ч. обладает ярко выраженной тератогенной активностью [6], потенциальной гепатотоксичностью, нейротоксичностью [7]. Терапевтический диапазон ВК составляет 50–150 мг/мл [8, 9]. За счет высокой степени связывания ВК с белками ее концентрация в крови не всегда пропорциональна дозе препарата, фармакокинетические параметры могут сильно варьироваться не только от пациента к пациенту, но и у одного пациента в разные периоды приема [10, 11]. Исходя из всех условий, прием

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 18 декабря 2025 г. №3867-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения, перечня лекарственных препаратов, предназначенных для обеспечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, а также минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи» (<https://base.garant.ru/413344482>).

ВК обязан сочетаться с регулярным терапевтическим лекарственным мониторингом.

Основные методы анализа для определения концентрации ВК в крови – иммунологические и хроматографические [12]. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС / ВЭЖХ-МС/МС) является «золотым стандартом» при количественном определении содержания низкомолекулярных эндогенных метаболитов и терапевтическом лекарственном мониторинге, в т.ч. и ВК [13, 14], поскольку обладает высокими универсальностью, чувствительностью и селективностью [12]. Однако для анализа ВК этот метод применяется относительно редко ввиду высокой стоимости оборудования. Метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) также показывает высокую селективность и чувствительность при определении ВК, однако чаще всего перед проведением анализа требуется стадия дериватизации, что увеличивает время подготовки образцов [15, 16]. К достоинствам иммунологических методов можно отнести высокую скорость проведения процедуры, что хорошо подходит для рутинного анализа, однако перекрестная реактивность антител к метаболитам ВК может приводить к завышению полученных результатов [12, 17].

Цель – разработка и валидация методики количественного определения ВК в сыворотке крови методом ГХ-МС без дериватизации с добавлением фенилуксусной кислоты в качестве внутреннего стандарта (ВС) для терапевтического лекарственного мониторинга, проведение сравнительного анализа результатов, полученных с помощью разработанного и иммунохимического методов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Реактивы и растворители / Reagents and solvents

В работе использовали следующие реактивы и органические растворители: аналитический стандарт вальпроата натрия, аналитический стандарт фенилуксусной кислоты (оба – Sigma-Aldrich, США), соляная кислота (особо чистая), вода деионизированная с сопротивлением 18 МОм, этилацетат (особо чистый), ацетонитрил HPLC-S Gradient (Biosolve Chimie, Франция), метанол для градиентной ВЭЖХ (ООО «Акваметрия», Россия). В качестве газа-носителя применяли гелий высокой чистоты (марка 6.0).

Калибровочные образцы / Calibration samples

Калибровочные образцы (5, 15, 30, 50, 75, 100, 150, 200 мкг/мл в пересчете на ВК) и образцы контроля качества (5, 15, 100, 150 мкг/мл в пересчете на ВК) готовили путем добавления известного количества стандарта вальпроата натрия в интактную сыворотку крови. Для количественного определения использовали метод внутреннего стандарта.

В качестве ВС применяли раствор фенилуксусной кислоты в ацетонитриле с конечной концентрацией 1100 мкг/мл. Калибровочная кривая представляла собой зависимость концентрации ВК от отношения площади пика ВК к площади пика ВС (линейная функция с нормированием $1/X$).

Аппаратура / Equipment

В работе применяли систему ГХ-МС, состоящую из микроволнового МС-детектора Agilent 5977B SQ, оснащенного высокоэффективным источником ионизации электронным ударом, и газового хроматографа Agilent 7890 (оба – Agilent Technologies, США). Количественное определение исследуемых веществ проводили при ионизации электронным ударом с использованием режима сканирования «мониторинг выбранных ионов». Для ВК применяли характеристичный фрагментный ион с отношением массы к заряду (m/z) 102, для ВС – характеристичный фрагментный ион наибольшей интенсивности с m/z 91.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке HP-5MS Ultra Inert 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм (Agilent Technologies, США). Температура канала ввода составляла 250 °С. Температура термостата в процессе анализа менялась градиентно: с 0-й до 2-й минуты с момента ввода пробы – 70 °С, со 2-й до 5-й минуты повышалась до 150 °С, затем с 5-й до 7-й минуты – до 250 °С, какой и оставалась до окончания анализа. Общее время анализа составило 9 мин. Скорость потока газа-носителя через колонку – 1 мл/мин. Ввод пробы осуществляли в режиме деления потока 50:1 (объем ввода – 1 мкл). В этих условиях время удерживания ВК составило 4,916 мин, ВС – 5,721 мин.

Валидация методики / Method validation

Валидацию методики количественного определения ВК в сыворотке крови методом ГХ-МС проводили в соответствии с отечественными и международными рекомендациями по валидации биоаналитических методов² [18, 19].

Валидация методики включала следующие параметры: селективность, воспроизводимость, правильность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, стабильность, линейность разбавления, эффект переноса. Нижний предел количественного определения (НПКО) составил 5 мкг/мл, диапазон концентраций – от 5 до 200 мкг/мл. Терапевтический диапазон ВК считали равным 50–150 мкг/мл [8, 9], поэтому аналитический диапазон разработанной методики позволяет использовать ее для терапевтического лекарственного мониторинга.

Для оценки воспроизводимости результатов получили калибровочные зависимости и провели обратный расчет концентраций. Калибровочные зависимости представляли собой линейные функции с нормированием $1/X$ и описывались уравнением типа:

$$Y = K \times X + B \text{ (с коэффициентом корреляции } R^2 \geq 0,99),$$

где Y – отношение площади пика ВК к площади пика ВС; X – концентрация ВК; K – наклон; B – отсекаемый участок.

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (<https://base.garant.ru/71546368>).

Для оценки стабильности ВК в сыворотке крови использовали образцы контроля качества 15 и 150 мкг/мл. Анализ образцов стабильности проводили вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивали со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества путем расчета нормализованного модуля разницы (HMP) значений концентраций до и после хранения по формуле:

$$\text{HMP, \%} = (C2 - C1) / C1 \times 100,$$

где C2 – средняя концентрация образца после хранения; C1 – средняя концентрация свежеприготовленного образца.

Иммунохимический анализ / Immunochemical analysis

Иммунохимический анализ содержания ВК в сыворотке крови выполняли на автоматическом анализаторе Architect i2000SR (Abbott, США). Метод основан на конкурентном иммунохемилюминесцентном анализе (ИХЛА), принцип которого заключается в комплементарном соединении субстрата и антитела, вступающих в реакцию, которая сопровождается хемилюминесценцией. Для постановки анализа использовали реагенты Architect iValproic Acid Reagent Kit. Аналитический диапазон определения содержания ВК данным методом составляет 2–150 мкг/мл [20].

Статистический анализ / Statistical analysis

В качестве программного обеспечения применяли MassHunter WorkStation Software (Agilent Technologies, США). Сравнительный анализ результатов, полученных при определении содержания ВК в 46 образцах сыворотки крови с помощью ГХ-МС и ИХЛА проводили с помощью языка программирования R в интерфейсе RStudio (версия 4.5.0).

Нормальность распределения данных проверяли при помощи теста Шапиро–Уилка, равенство выборок – с помощью критерия Уилкоксона (уровень значимости $\alpha=0,05$). Для проверки смещения результатов в зависимости от выбранного метода анализа и визуализации результатов сравнения построили диаграмму Бланда–Альтмана.

Для проверки сходимости результатов между двумя методами использовали регрессию Пэссинга–Бэблока. Уравнение линейной регрессии:

$$Y = K \times X + B,$$

где X – результаты, получаемые при анализе методом ИХЛА; Y – результаты, получаемые по разработанной нами методике ГХ-МС; K – угловой коэффициент; B – константа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ / RESULTS AND DISCUSSION

На сегодняшний день в научной литературе есть несколько публикаций, где описано применение метода ГХ-

МС для определения ВК, извлекаемой из биологической матрицы жидкостно-жидкостной экстракцией [16, 21, 22]. Основные параметры представлены в **таблице 1**.

Разработанная нами методика определения концентрации ВК в сыворотке крови методом ГХ-МС обладает рядом преимуществ в сравнении с литературными данными:

- использование для анализа всего 50 мкл сыворотки крови;
- применение фенилуксусной кислоты в качестве ВС;
- использование для подкисления всего 10 мкл 1М раствора соляной кислоты;
- отсутствие стадий упаривания органического слоя и дериватизации экстрагированной ВК.

Несмотря на более высокий нижний предел количественного определения (5 мкг/мл) в сравнении с литературными данными [16, 22], разработанная методика обеспечивает необходимую точность и надежность измерений, т.к. терапевтический диапазон определения ВК составляет 50–150 мкг/мл.

Методика ГХ-МС / GC-MS method

Разработка

Использование ВС при проведении анализа необходимо для минимизации погрешностей, связанных с пробоподготовкой, инъекцией и детектированием. Зачастую применяют меченые ВС, однако высокая стоимость ограничивает их доступность для многих лабораторий. В качестве доступной и эффективной альтернативы выбрали фенилуксусную кислоту. Выбор обусловлен структурным сходством с ВК, термостабильностью и летучестью, что делает ее потенциально пригодной для использования в качестве ВС.

Детектирование ВК и ВС при количественном определении выполняли при ионизации электронным ударом с использованием режима сканирования «мониторинг выбранных ионов». На основании литературных данных для ВК были выбраны фрагментные ионы с m/z 73, 102, 115 [16], а для фенилуксусной кислоты – с m/z 91, 92³. При количественном определении для ВК применяли характеристичный фрагментный ион с m/z 102, для ВС – характеристичный фрагментный ион наибольшей интенсивности с m/z 91.

Наиболее значимым этапом при разработке методики количественного определения ВК в сыворотке крови являлась экстракция определяемых компонентов из матрицы. Наиболее распространенные подходы – твердофазная экстракция (ТФЭ) и жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [15]. Несмотря на более высокую эффективность очистки, ТФЭ характеризуется сравнительно высокой стоимостью и большей трудоемкостью по сравнению с ЖЖЭ. Поэтому в качестве методики пробоподготовки выбрали ЖЖЭ с предварительным подкислением сыворотки крови соляной кислотой и провели оптимизацию условий экстракции ВК и ВС.

Исходный протокол пробоподготовки заключался в добавлении к 100 мкл сыворотки крови 10 мкл раствора ВС (раствор фенилуксусной кислоты в ацетонитриле с концентрацией 1100 мкг/мл), водного раствора соляной кис-

³ Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000209>).

Таблица 1. Экспериментальные условия извлечения вальпроевой кислоты из биологической матрицы**Table 1.** Experimental settings for extraction of valproic acid from biological matrix

Параметр / Parameter	Источник / Source			
	Д.А. Абаймов и др. [16] / D.A. Abaimov et al. [16]	M.R. Meyer et al. [21]	H.J. Leis et al. [22]	Разработанная методика / Developed method
Биологическая матрица / Biological matrix	Плазма крови / Blood plasma	Плазма крови / Blood plasma	Плазма крови / Blood plasma	Сыворотка крови / Blood serum
Объем биоматериала, мкл / Volume of biomaterial, µl	500	200	100	50
Диапазон концентраций, мкг/мл // Concentration range, µg/ml	1–200	20–200	0,47–120	5–200
НПКО, мкг/мл // LLOQ, µg/ml	1	20	0,47	5
Кислота (концентрация, объем) / Acid (concentration, volume)	Соляная кислота (2 М, 500 мкл) / Hydrochloric acid (2 M, 500 µl)	Концентрированная уксусная кислота (10 мкл) / Concentrated acetic acid (10 µl)	Соляная кислота (0,2 М, 1000 мкл) / Hydrochloric acid (0.2 M, 1000 µl)	Соляная кислота (1 М, 10 мкл) / Hydrochloric acid (1 M, 10 µl)
Внутренний стандарт / Internal standard	Не использовали / Not used	Фенобарбитал-d5 / Phenobarbital-d5	¹⁸ O ₂ -вальпроевая кислота / [¹⁸ O ₂]-valproic acid	Фенилуксусная кислота / Phenylacetic acid
Экстрагент (объем) / Extraction agent (volume)	Этилацетат (5000 мкл) / Ethyl acetate (5000 µl)	Бутилацетат (450 мкл) / Butyl acetate (450 µl)	Гексан (500 мкл) / Hexane (500 µl)	Этилацетат (500 мкл) / Ethyl acetate (500 µl)
Время экстракции, мин / Extraction time, min	10	2	15	5
Упаривание → перерастворение / Evaporation → re-solution	При 60 °C → 500 мкл метанола / At 60 °C → 500 µl methanol	Не использовали / Not used	Не использовали / Not used	Не использовали / Not used
Дериватизация / Derivatization	Не использовали / Not used	Не использовали / Not used	N-метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамид / N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide	Не использовали / Not used
Степень извлечения, % / Extraction rate, %	97,0	>100,0	90,0	100,8

Примечание. НПКО – нижний предел количественного определения.

Note. LLOQ – lower limit of quantification.

лоты и 1000 мкл этилацетата. Полученную смесь тщательно встряхивали с помощью термощейкера TS-100 (BioSan, Латвия) в течение 5 мин, затем центрифугировали при скорости вращения 14 000 об/мин в течение 3 мин при 5 °C, после чего 400 мкл супернатанта переносили в вials и использовали для анализа. В качестве оптимизируемых параметров варьировали концентрацию (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 М) и добавляемый объем (10, 20, 30, 50 мкл) соляной кислоты.

Оптимизация

Анализ результатов оптимизации показал, что при использовании низкой концентрации соляной кислоты (0,1; 0,2 М) не удалось достичь эффективной экстракции для ВК (добавляемый объем – 10, 20 мкл) и ВС (добавляемый объем – 10, 20, 30 мкл). При использовании соляной кислоты с концентрацией 0,5 М и больше удалось достичь

высокой степени извлечения (добавляемый объем – 20, 30, 50 мкл) для определяемых соединений. Оптимальными условиями для ВК и ВС были выбраны: концентрация соляной кислоты 1 М, добавляемый объем 20 мкл. Результаты оптимизации в виде зависимостей площади пика анализируемого соединения от концентрации соляной кислоты для каждого добавляемого объема приведены на рисунке 1.

С целью уменьшения объема сыворотки (что особенно актуально для детей, у которых взятие биоматериала может вызывать трудности) сократили количество всех компонентов в два раза, при этом эффективность экстракции не изменилась.

Таким образом, за рабочую методику пробоподготовки приняли: к 50 мкл сыворотки крови добавляли 5 мкл раствора ВС, 10 мкл 1 М раствора соляной кислоты и 500 мкл этилацетата. Полученную смесь тщательно встряхивали

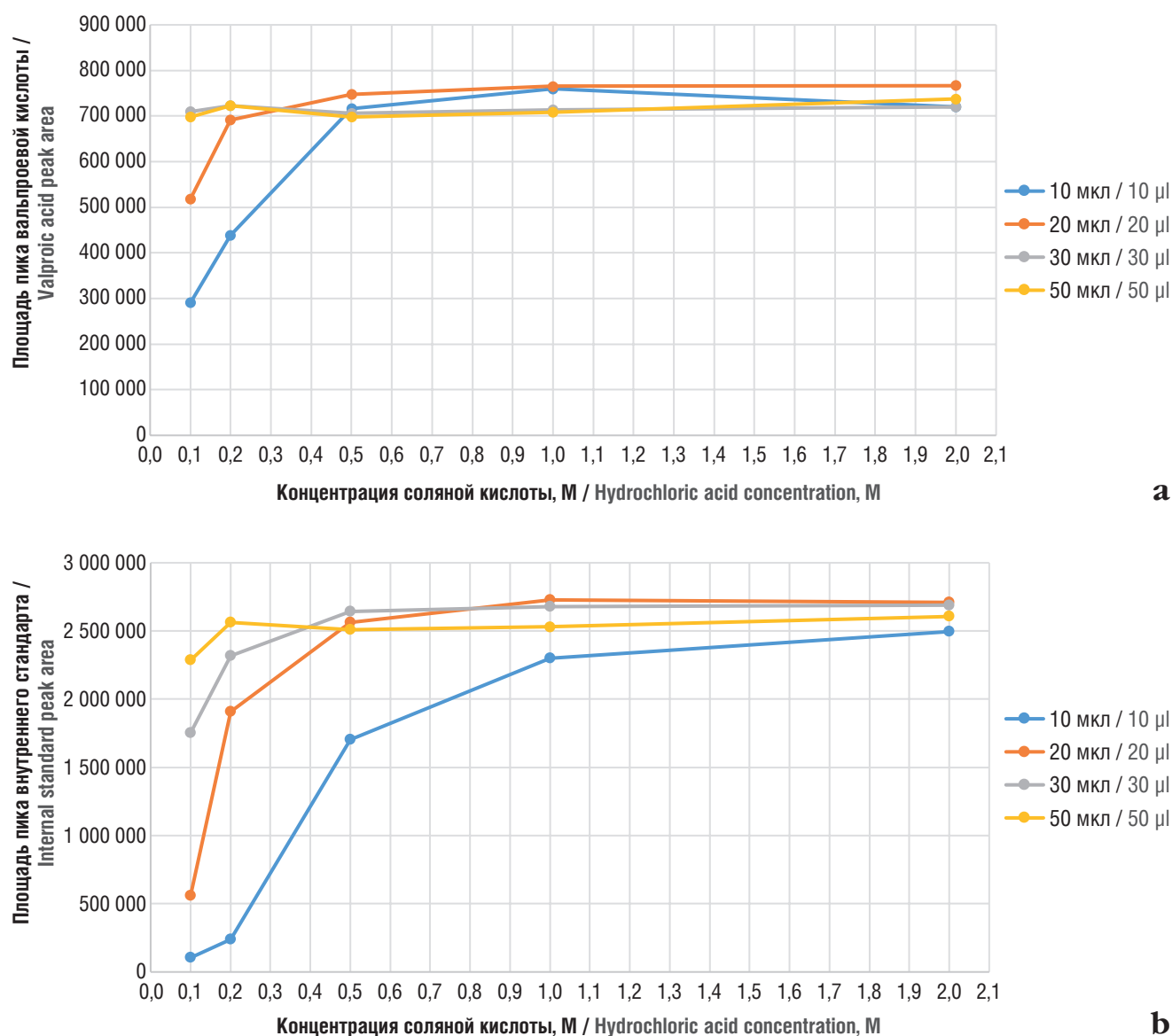


Рисунок 1. Зависимость площади пика вальпроевой кислоты (а) и внутреннего стандарта (б) от концентрации соляной кислоты (время экстракции 5 мин)

Figure 1. Dependence of valproic acid (a) and internal standard (b) peak areas on the hydrochloric acid concentration (extraction time 5 minutes)

с помощью термощейкера TS-100 в течение 5 мин, затем центрифугировали при скорости вращения 14 000 об/мин в течение 3 мин при 5 °С, после чего 400 мкл супернатанта переносили в вials и использовали для анализа.

Валидация

Селективность

Для определения селективности тестировали шесть образцов биологической матрицы, обработанной без прибавления стандарта ВК и ВС, на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения). Полученные значения площадей сравнивали со значениями в образцах контроля качества с концентрацией ВК, равной НПКО.

Селективность определения ВК установлена, т.к. отсутствуют мешающие пики на временах удерживания опре-

деляемых соединений. Примеры хроматограмм интактной сыворотки крови, не содержащей определяемых соединений, приведены на **рисунке 2**.

Воспроизводимость

Калибровочная зависимость состояла из восьми ненулевых калибровочных образцов, охватывающих диапазон концентраций 5–200 мкг/мл для ВК. НПКО с концентрацией ВК 5 мкг/мл приняли в качестве предела количественного определения, т.к. показания образца на нижнем количественном пределе были как минимум в 5 раз больше показаний пустой пробы (соотношение «сигнал/шум» больше 5), поддавались определению и были воспроизводимы с прецизионностью 0,9%, не превышающей 20%, и правильностью 102,4%, входящей в диапазон 80–120%. Примеры хроматограмм сыворотки крови 5 мкг/мл ВК и 1100 мкг/мл ВС представлены на **рисунке 3**.

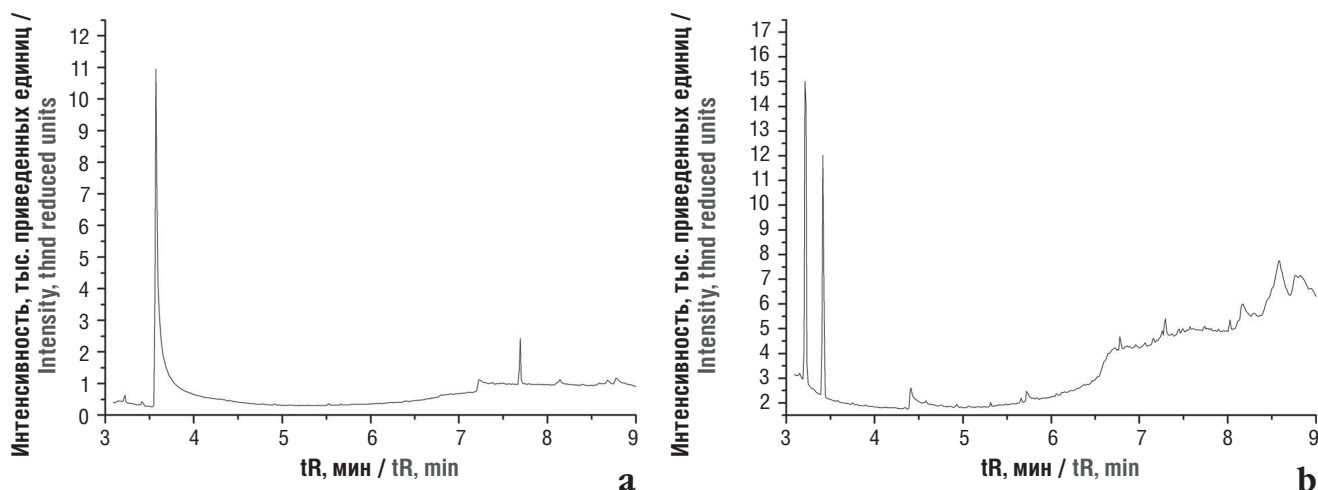


Рисунок 2. Хроматограммы intactной сыворотки крови, не содержащей определяемых соединений:

a – вальпроевая кислота; **b** – внутренний стандарт

Figure 2. Chromatogram of intact blood serum not containing the target compounds:

a – valproic acid; **b** – internal standard

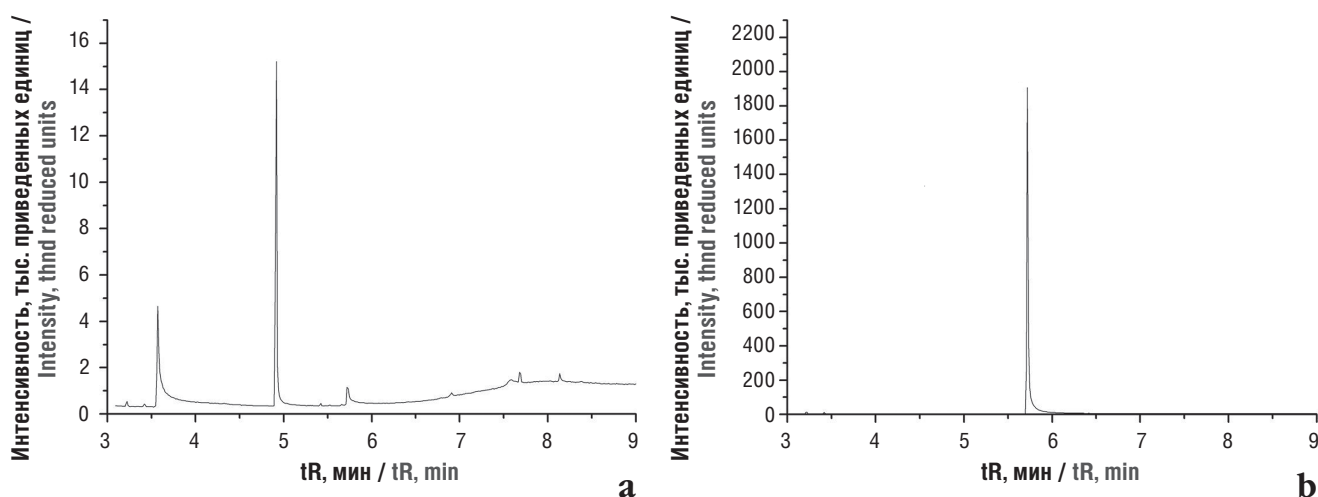


Рисунок 3. Хроматограммы intactной сыворотки крови, содержащей определяемые соединения:

a – вальпроевая кислота; **b** – внутренний стандарт

Figure 3. Chromatogram of intact blood serum containing the target compounds:

a – valproic acid; **b** – internal standard

Для оценки воспроизводимости результатов получили три калибровочные зависимости и провели обратный расчет концентраций. Пример калибровочной зависимости приведен на **рисунке 4**. Воспроизводимость результатов достигается во всем интервале концентраций (**табл. 2**).

Правильность и прецизионность

Правильность и прецизионность метода внутри одной серии и между аналитическими сериями оценивали по результатам параллельных анализов образцов контроля качества с концентрациями ВК 5, 15, 100, 150 мкг/мл соответственно. Каждый образец внутри серии определяли в пяти повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводили по калибровочной зависимости, полученной в составе той же аналитической серии.

Данные по правильности (отклонение рассчитанных значений нижнего образца контроля качества от номинального значения не должно превышать 20%, остальных образцов контроля качества – 15%) и прецизионности (коэффициент вариации нижнего образца контроля качества не должен превышать 20%, остальных образцов контроля качества – 15%) определения ВК в сыворотке крови между аналитическими сериями представлены в **таблице 3** и соответствуют критериям приемлемости.

Эффект матрицы

Влияние матрицы на сигнал ВК определяли путем вычисления фактора матрицы (ФМ) – отношения площади пика в присутствии матрицы к площади пика в отсутствие матрицы (чистый раствор определяемых соединений) для

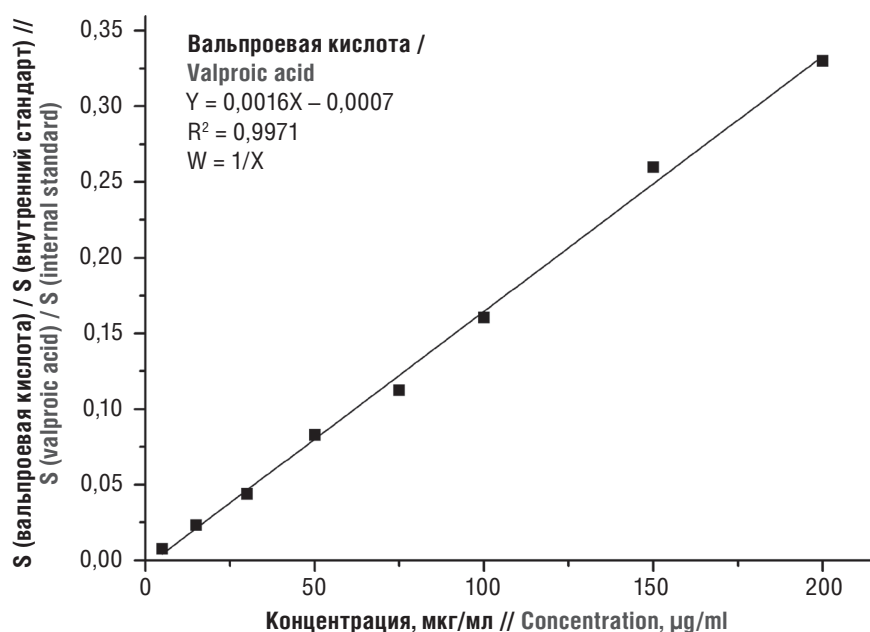


Рисунок 4. Калибровочная зависимость для вальпроевой кислоты

Figure 4. Calibration curve for valproic acid

Таблица 2. Концентрации калибровочных образцов

Table 2. Concentrations of calibration standards

Параметр / Parameter	Образец / Sample							
	5	15	30	50	75	100	150	200
Концентрация, мкг/мл // Concentration, µg/ml								
$R^2 = 0,9971$	5,07	14,84	27,70	51,92	70,07	99,98	161,54	205,08
$R^2 = 0,9942$	5,14	14,09	28,30	48,50	80,50	97,93	146,72	217,84
$R^2 = 0,9968$	5,15	14,09	28,08	49,16	72,25	97,48	162,17	217,84
Среднее значение / Mean	5,12	14,34	28,03	49,86	74,27	98,46	156,81	213,59
СКО / RMSD	0,04	0,44	0,30	1,81	5,50	1,33	8,75	7,37
КВ и правильность, % / VC and fidelity, %								
КВ / VC	0,9	3,1	1,1	3,6	7,4	1,4	5,6	3,4
Правильность / Fidelity	102,4	95,6	93,4	99,7	99,0	98,5	104,5	106,8

Примечание. СКО – среднее квадратичное отклонение; КВ – коэффициент вариации.

Note. RMSD – root mean square deviation; VC – variation coefficient.

Таблица 3. Данные по правильности и прецизионности определения концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови

Table 3. Accuracy and precision of blood serum valproic acid quantitation

Критерий приемлемости / Acceptance criteria	Образец / Sample			
	5	15	100	150
Внутри одной аналитической серии / Within single analytical series				
Среднее значение концентрации, мкг/мл // Mean concentration, µg/ml	5,29	15,08	111,12	165,76
СКО, мкг/мл // RMSD, µg/ml	0,62	1,54	3,75	14,09
КВ, % / VC, %	11,7	10,2	3,4	8,5
Правильность, % / Fidelity, %	105,9	100,5	111,1	110,5
Между аналитическими сериями / Between analytical series				
Среднее значение концентрации, мкг/мл // Mean concentration, µg/ml	5,35	15,56	110,87	166,20
СКО, мкг/мл // RMSD, µg/ml	0,42	1,50	3,93	7,98
КВ, % / VC, %	7,8	9,7	3,5	4,8
Правильность, % / Fidelity, %	107,0	103,7	110,9	110,8

Примечание. СКО – среднее квадратичное отклонение; КВ – коэффициент вариации.

Note. RMSD – root mean square deviation; VC – variation coefficient.

каждой серии матрицы для ВК и ВС. При данном тесте исследованы шесть образцов матрицы (сыворотка крови различных типов, включая гемолизированную и гиперлипидемическую, а также плазма крови). Путем деления ФМ ВК на ФМ ВС рассчитывали нормализованный по ВС ФМ. Измерения осуществляли для образцов контроля качества 15 и 150 мкг/мл. Нормализованные по ВС ФМ составили 0,96 с коэффициентом вариации 4,1% и 1,03 с коэффициентом вариации 3,9% для образцов контролей качества 15 и 150 мкг/мл соответственно, что говорит об отсутствии влияния матрицы на сигнал ВК.

Степень извлечения

Степень извлечения ВК и ВС из сыворотки крови определяли путем сравнения площадей пиков аналита и ВС в образцах контроля качества 15 и 150 мкг/мл с площадями пиков неэкстрагированных стандартных растворов, представляющих 100% извлечение и содержащих компоненты матрицы. Измерения для каждой концентрации образцов проводили в шести повторах. Степени извлечения ВК и ВС составили 100,8% и 99,4% соответственно.

Стабильность

ВК стабильна: после трех циклов «заморозка – разморозка» (заморозка при -20°C , разморозка при комнатной температуре), до пробоподготовки в течение 28 ч при комнатной температуре, после пробоподготовки в течение 36 ч при комнатной температуре, в условиях длительной заморозки при температуре -20°C в течение 35 сут. Значения НМР, коэффициента вариации и отклонений рассчитанных значений концентраций не превышали 15%.

Линейность разбавления

Доказана линейность двукратного разбавления модельного образца с концентрацией 300 мкг/мл, превышающей концентрацию верхнего предела количественного определения. После разбавления образца интактной сывороткой крови в 2 раза проводили пробоподготовку и анализ образцов. Концентрацию аналита определяли в пяти повто-

рах. Теоретическое значение концентрации разбавленного образца составило 150 мкг/мл. Значения коэффициента вариации и отклонений рассчитанных значений концентраций не превышали 15%.

Эффект переноса

Эффект переноса изучали путем введения образцов интактной сыворотки крови после образцов контроля качества 150 мкг/мл. Для сравнения использовали значения площадей пиков ВК в образцах контроля качества 5 мкг/мл. Перенос в образец интактной сыворотки крови после образца с высокой концентрацией не превышает 20% величины НПКО и 5% ВС.

Сравнительный анализ методов / Comparative analysis of methods

Сравнительный анализ результатов, полученных при определении содержания ВК с помощью ГХ-МС и ИХЛА проводили на 46 образцах сыворотки крови.

Значение p по тесту Шапиро-Уилка составило 0,025, из чего следует, что распределение не является нормальным [23, 24]. Согласно критерию Уилкоксона значение p составило 0,596, из чего следует, что выборки равны между собой, существенных статистических различий нет [23].

Для проверки смещения результатов в зависимости от выбранного метода анализа построили диаграмму Бланда-Альтмана [24, 25]. На рисунке 5 видно, что систематическое смещение результатов отсутствует и при попарном сравнении результатов разница между ними находится в диапазоне от -10% до $+10\%$.

Для проверки сходимости результатов между двумя методами построили регрессию Пэссинга-Бэблока (рис. 6) [25]. Показано, что при низких концентрациях наблюдается минимальное различие между измеренными значениями, однако уже при концентрации 60 мкг/мл прямая линейной регрессии полностью сливается с диагональю совпадений (уравнение линейной регрессии $Y = 1,02X - 1,91$). Небольшое завышение результатов, полученных методом ИХЛА, может быть связано с кросс-реактивностью

Рисунок 5. Диаграмма Бланда-Альтмана для проверки смещения результатов в зависимости от выбранного метода анализа.

ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ;
ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрией

Figure 5. Bland-Altman plot to check for bias in results depending on the chosen analysis method.

ICLA – immunochemiluminescent assay;
GC-MS – gas chromatography with mass spectrometry

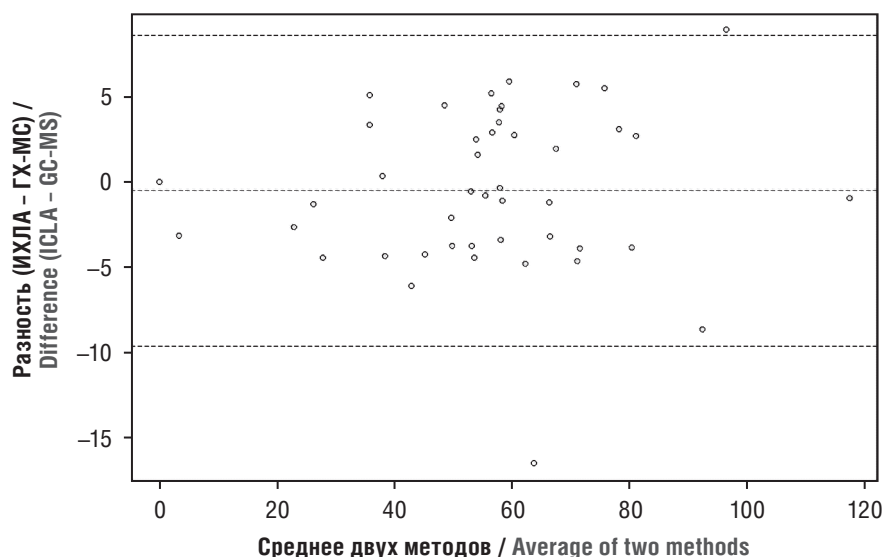
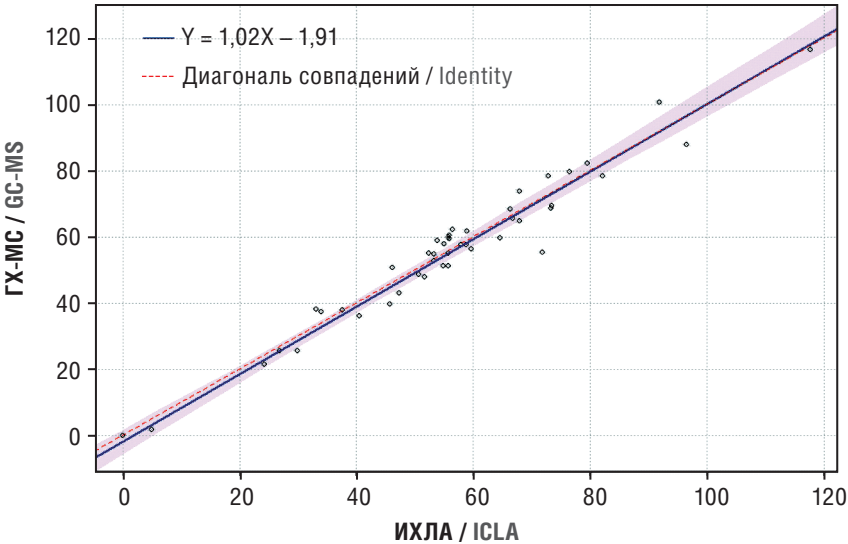


Рисунок 6. Регрессия Пэссинга–Бэблока для проверки сходимости результатов между двумя методами. ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрией

Figure 6. Passing–Bablok regression to check the convergence of results between two methods. ICLA – immunochemiluminescent assay; GC-MS – gas chromatography with mass spectrometry



антител к метаболитам ВК. Однако статистическое различие между методами пренебрежимо мало, т.к. систематическое смещение результатов не превышает 2%.

Результаты расчетов приведены в **таблице 4**. Границы доверительного интервала для Slope включают 1, а для

Таблица 4. Характеристики регрессии Пэссинга–Бэблока

Table 4. Passing–Bablok regression parameters

Параметр / Parameter	EST	SE	95% ДИ / 95% CI
Константа / Intercept	–1,91	–	–6,07–2,09
Угловой коэффициент / Slope	1,02	–	0,96–1,11

Примечание. SE (англ. standard error) – стандартная ошибка; ДИ – доверительный интервал. EST (Intercept) – систематическое смещение, EST (Slope) – пропорциональное расхождение между методами.

Note. SE – standard error; CI – confidence interval. EST (Intercept) – systematic offset; EST (Slope) – proportional discrepancy between methods.

Intersept – 0, что указывает на отсутствие значимых различий между методами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

Проведенное исследование показало, что разработанная и валидированная методика ГХ-МС позволяет использовать для анализа всего 50 мкл сыворотки крови, что особенно актуально для детей, у которых взятие биоматериала может вызывать трудности. Сравнительный анализ содержания ВК между ГХ-МС и ИХЛА продемонстрировал высокую степень корреляции, что подтверждает надежность разработанного метода. Аналитический диапазон методики ГХ-МС (5–200 мкг/мл) позволяет использовать ее в клинической практике и успешно интегрировать в систему терапевтического лекарственного мониторинга для оптимизации дозирования препаратов ВК у пациентов, что способствует повышению безопасности и эффективности терапии.

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ	ARTICLE INFORMATION
Поступила: 24.02.2026 В доработанном виде: 03.06.2026 Принята к печати: 22.06.2026 Опубликована: 30.06.2026	Received: 24.02.2026 Revision received: 03.06.2026 Accepted: 22.06.2026 Published: 30.06.2026
Вклад авторов	Authors' contribution
Все авторы принимали равное участие в сборе, анализе и интерпретации данных. Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант рукописи	All authors participated equally in the collection, analysis and interpretation of the data. All authors have read and approved the final version of the manuscript
Конфликт интересов	Conflict of interests
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов	The authors declare no conflict of interests
Финансирование	Funding
Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки	The authors declare no funding
Этические аспекты	Ethics declarations
Неприменимо	Not applicable
Раскрытие данных	Data sharing
Первичные данные могут быть предоставлены по обоснованному запросу автору, отвечающему за корреспонденцию	Raw data could be provided upon reasonable request to the corresponding author

Комментарий издателя	Publisher's note
Содержащиеся в этой публикации утверждения, мнения и данные были созданы ее авторами, а не издательством ИРБИС (ООО «ИРБИС»). Издательство снимает с себя ответственность за любой ущерб, нанесенный людям или имуществу в результате использования любых идей, методов, инструкций или препаратов, упомянутых в публикации	The statements, opinions, and data contained in this publication were generated by the authors and not by IRBIS Publishing (IRBIS LLC). IRBIS LLC disclaims any responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions, or products referred in the content
Права и полномочия	Rights and permissions
© 2026 Авторы; ООО «ИРБИС» Статья в открытом доступе по лицензии CC BY-NC-SA (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)	© 2026 The Authors. Publishing services by IRBIS LLC This is an open access article under CC BY-NC-SA license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Белоусов Ю.Б., Леонова М.В., Штейнберг Л.Л. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов в реальной практике. *Эpilepsia и пароксизмальные состояния*. 2013; 5 (3): 6–16.
Belousov Yu.B., Leonova M.V., Shteinberg L.L., et al. Therapeutic drug monitoring of anticonvulsants in clinical practice. *Epilepsia i paroksizmal'nye sostoania / Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2013; 5 (3): 6–16 (in Russ.).
- Кирпиченко А.А. Современное место вальпроатов в лечении психических и поведенческих расстройств. *Медицинские новости*. 2022; 5: 34–8.
Kirpichenko A.A. Modern place of valproates in the treatment of mental and behavioral disorders. *Medical News*. 2022; 5: 34–8 (in Russ.).
- Распопова Н.И. Применение вальпроевой кислоты в комплексной терапии постковидных психических расстройств (клиническое наблюдение). *Современная терапия психических расстройств*. 2024; 2: 68–76. <https://doi.org/10.21265/PSYPH.2024.31.31.007>.
Raspopova N.I. Use of valproic acid in complex therapy of post-covid mental disorders (clinical case). *Current Therapy of Mental Disorders*. 2024; 2: 68–76 (in Russ.). <https://doi.org/10.21265/PSYPH.2024.31.31.007>.
- Zhang C.Q., Li H.Y., Wan Y., et al. Efficacy, safety, and retention rate of extended-release divalproex versus conventional delayed-release divalproex: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 811017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.811017>.
- Романов А.С., Шарахова Е.Ф. Маркетинговые исследования национального рынка противосеизмических препаратов. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022; 6 (4): 48–60. <https://doi.org/10.31549/2542-1174-2022-6-4-48-60>.
Romanov A.S., Sharakhova E.F. Marketing research of the national antiepileptic drug market. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022; 6 (4): 48–60. <https://doi.org/10.31549/2542-1174-2022-6-4-48-60>.
- Пылаева О.А., Мухин К.Ю. Актуальные вопросы безопасности и переносимости антиэпилептической терапии: акцент на применение препаратов вальпроевой кислоты (обзор литературы). *Русский журнал детской неврологии*. 2019; 14 (3): 37–60. <https://doi.org/10.17650/2073-8803-2019-14-3-37-58>.
Pylaeva O.A., Mukhin K.Yu. Safety and tolerability of antiepileptic therapy: emphasis on the use of valproates (literature review). *Russian Journal of Child Neurology*. 2019; 14 (3): 37–60 (in Russ.). <https://doi.org/10.17650/2073-8803-2019-14-3-37-58>.
- Rifai N. Tietz textbook of laboratory medicine. Saunders; 2022: 1584 pp.
- Леонова М.В., Ивжиц М.А., Тищенко И.Ф., Штейнберг Л.Л. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей в реальной практике. *Эpilepsia и пароксизмальные состояния*. 2017; 9 (1): 26–34. <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2017.9.1.026-034>.
Leonova M.V., Ivzhits M.A., Tischenkova I.F., Shteinberg L.L. Therapeutic drug monitoring of anticonvulsants in children in clinical practice. *Epilepsia i paroksizmal'nye sostoania / Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2017; 9 (1): 26–34 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2017.9.1.026-034>.
- Рубрикатор клинических рекомендаций. Эpilepsia и эпилептический статус у взрослых и детей. 2022. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/741_1 (дата обращения 16.01.2026).
Rubricator of Clinical Recommendations. Epilepsy and status epilepticus in adults and children. 2022. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/741_1 (in Russ.) (accessed 16.01.2026).
- Patsalos P.N., Spencer E.P., Berry D.J. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: a 2018 update. *Ther Drug Monit*. 2018; 40 (5): 526–48. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000546>.
- Shaikh A.S., Liu H., Li Y., et al. Therapeutic drug monitoring of valproic acid. *Pak J Pharm Sci*. 2018; 31 (4): 1773–6.
- Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю. и др. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге. *Эpilepsia и пароксизмальные состояния*. 2013; 5 (2): 31–41.
Abaimov D.A., Sariev A.K., Noskova T.Yu., et al. Modern technologies in therapeutic drug monitoring (review). *Epilepsia i paroksizmal'nye sostoania / Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2013; 5 (2): 31–41 (in Russ.).
- Vlase L., Popa D.S., Muntean D., Leucuta S. A new high-throughput LC-MS/MS assay for therapeutic level monitoring of valproic acid in human plasma. *Sci Pharmaceut*. 2008; 76: 663–71. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0808-12>.
- Малыгин А.С., Попов Н.С., Демидова М.А., Кудряшова М.Н. Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом вэжх-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). *Эpilepsia и пароксизмальные состояния*. 2018; 10 (2): 35–42. <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2018.10.2.035-042>.
Malygin A.S., Popov N.S., Demidova M.A., Kudrayshova M.N. Chromatography-tandem MASS spectrometry (HPLC-MS/MS) for the detection of valproic acid and its metabolites in blood plasma. *Epilepsia i paroksizmal'nye sostoania / Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2018; 10 (2): 35–42 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2018.10.2.035-042>.
- Blume de Oliveira J., Pereira dos Santos B., Arbo M. Valproic acid extraction methods in human samples for gas chromatography analysis: a review. *Drug Anal Res*. 2024; 8 (1): 3–12. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.138963>.
- Абаимов Д.А., Сариев А.К., Тюрин И.А. и др. Применение газовой хроматомасс-спектрометрии для терапевтического лекарственного мониторинга вальпроевой кислоты. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012; 46 (11): 36–40.
Abaimov D.A., Sariev A.K., Tyurin I.A., et al. Application of gas chromatography/mass spectrometry to therapeutic monitoring of valproic acid. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2012; 46 (11): 36–40 (in Russ.).
- Xia Y., Long J.Y., Shen M.Y., et al. Switching between LC-ESI-MS/MS and EMIT methods for routine TDM of valproic acid in pediatric patients with epilepsy: what clinicians and researchers need to know. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 750744. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.750744>.
- Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed 12.01.2026).
- Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. 2011. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed 12.01.2026).

20. Истомин Д.С., Золотавина М.Л. Иммунохемилюминесцентный анализ как альтернатива тандемному методу ВЭЖХ-масс-спектрометрии для определения концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2020; 5 (2): 345–8.
Istomin D.S., Zolotavina M.L. Immunochemiluminescent analysis as an alternative to the tandem HPLC-massspectrometry method for the determination of valproic acid. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*. 2020; 5 (2): 345–8 (in Russ.).
21. Meyer M.R., Welter J., Weber A.A., Maurer H.H. Development, validation, and application of a fast and simple GC–MS method for determination of some therapeutic drugs relevant in emergency toxicology. *Ther Drug Monit*. 2011; 33 (5): 649–53. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3182305409>.
22. Leis H.J., Windischhofer W., Rechberger G.N., Fauler G. Synthesis of [$^{18}\text{O}_2$]valproic acid and its use as an internal standard for the quantitative measurement by gas chromatography–electron ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2003; 784 (1): 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00755-9](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00755-9).
23. Davis C. Statistical testing in practice with StatsDirect: research without tears or algebra. Llumina Press; 2013: 124 pp.
24. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*. 2015; 25 (2): 141–51. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>.
25. Савельев Л.И., Цвиренко С.В. Сравнение методов измерения аналитов с использованием проб пациентов (общие принципы проведения исследования и анализа результатов). Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет; 2023: 138 с.
Saveliev L.I., Tsvirenko S.V. Comparison of methods for measuring analytes using patient samples (general principles of conducting research and analyzing results). Yekaterinburg: Ural State Medical University; 2023: 138 pp. (in Russ.).

Сведения об авторах / About the authors

Банникова Василиса Михайловна / Vasilisa M. Bannikova – ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7718-2639>.

Сеидкулиева Адамиана Аманмамедовна, к.м.н. / Adamiana A. Seidkulieva, PhD – ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4434-8415>. WoS ResearcherID: ABF-4016-2021. Scopus Author ID: 57226686283. eLibrary SPIN-code: 2431-6897.

Панов Юрий Михайлович / Yuri M. Panov – ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1592-759X>. Scopus Author ID: 57210412012. E-mail: PanovYM94@yandex.ru.

Каргин Иван Денисович / Ivan D. Kargin – ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4503-7168>.

Бочков Павел Олегович, к.б.н. / Pavel O. Bochkov, PhD – ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>. eLibrary SPIN-code: 5576-8174.