

Е. А. Крылова<sup>1</sup>, С. С. Катаев<sup>1</sup>, Ю. А. Хомов<sup>2</sup>, О. Н. Дворская<sup>2</sup>

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛПИДЕМА В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

<sup>1</sup> ГКУЗОТ "Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы", Пермь, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия" МЗ РФ, Пермь, Россия

Проведено количественное определение золпидема в крови методом ГХ/МС, в качестве внутреннего стандарта использовался имипрамина гидрохлорид. Коэффициент множественной регрессии  $r$  для полученной калибровочной прямой составил 0,999. Приведена метрологическая оценка методики по восьми статистическим параметрам. Определена эффективность экстракции золпидема из модельной крови на трех уровнях концентраций, при этом выход исследуемого вещества наблюдался в пределах 96 – 99 %. Проведена валидационная оценка методики по показателям: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность). При статистической обработке полученные результаты находятся в пределах приемлемости. Предел обнаружения золпидема в крови составил 24 нг/мл; предел количественного определения — 72,7 нг/мл.

**Ключевые слова:** золпидем; количественное определение; валидация.

Золпидем — это снотворный препарат, который в последние годы нашел широкое применение в Российской Федерации [1]. Согласно фармакоэпидемиологическим данным, представленным авторами из разных стран, наблюдается постоянный рост частоты употребления золпидема для лечения инсомнии. Так, австралийские исследователи [2] отмечают, что применение препарата возросло за период 2003 – 2007 гг. практически в 2 раза (с 11,3 до 20,3 % относительно прочих снотворных препаратов). Авторы из Германии [3] указывают на увеличившееся в 2,6 раза число упаковок препарата, выписанных врачами на первичном приеме за период 1993 – 2007 гг. Другие авторы [4] отмечают, что золпидем занимает на Тайване второе место в рейтинге препаратов для терапии инсомнии (после лоразепама). По данным Национальной амбулаторной медицинской службы Соединенных Штатов, золпидем является наиболее часто назначаемым препаратом при бессоннице среди лиц старше 65 лет [5]. Из-за особенностей фармакодинамики (взаимодействие с первым подтипом бензодиазепиновых рецепторов (BZ<sub>1</sub>)) [6] и фармакокинетики золпидема (быстрое достижение пиковой концентрации в крови, короткий период полувыведения) [7], а также потенцирования седативного эффекта при совместном приеме с другими психотропными препаратами, алкоголем и кофеином, золпидем не раз применялся в криминальной среде для совершения противоправных действий [8]. Описаны случаи злоупотребления данным препаратом с развитием физической и психической зависимости [9]. Поэтому идентификация данного препарата в биологическом материале с количественной оценкой содержания его в крови чрезвычайно важна для химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Для этой цели существуют методики с использованием газовой [10, 11] и жидкостной [12, 13]

хроматографии с применением различных методов детектирования, иммуноанализ [14]. Применение той или иной методики зависит от технического и материального оснащения лаборатории, сложившихся традиционных предпочтений. Ранее нами разработана и описана методика [15] количественного определения золпидема в образцах цельной крови, предусматривающая проведение твердофазной экстракции (ТФЭ) с последующей газовой хроматографией и масс-спектрометрией (ГХ/МС). Настоящая работа дает валидационную оценку представленной методики.

### *Экспериментальная часть*

Для ГХ-МС использовали газовый хроматограф Agilent 7820, масс-селективный детектор Agilent 5975 Agilent, США, колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм. Для ТФЭ применяли: систему с вакуумной камерой на 12 позиций (Supelico), насос низкого вакуума AIR CADET, США, картриджи Sampli Q Evidex — 200 мг-3 мл Agilent, США.

Исследовали золпидема тартрат (порошок-субстанция, Испания, НД 42-13447-05), мелипрамин (ампулы с содержанием имипрамина гидрохлорида 12,5 мг/мл, EGIS PHARMACEUTICALS); реланиум (ампулы 2 мл с содержанием диазепама 5 мг/мл, Polfa, Польша); буферный раствор — 1/15 М фосфатный буфер pH 6,0; органические растворители: дихлорметан (х.ч.), пропанол-2 (х.ч.), 95 % этанол (х.ч.), гексан (о.х.ч.), этилацетат (х.ч.), 99,6 % метанол (х.ч.); прочие реактивы: аммиака раствор концентрированный 25 % (ГФ XII), азот (о.с.ч.), гелий (о.с.ч.).

**Подготовка проб.** К образцам крови объемом 500 мкл прибавляли по 25 мкл раствора внутреннего стандарта имипрамина гидрохлорида (0,02 мг/мл), по

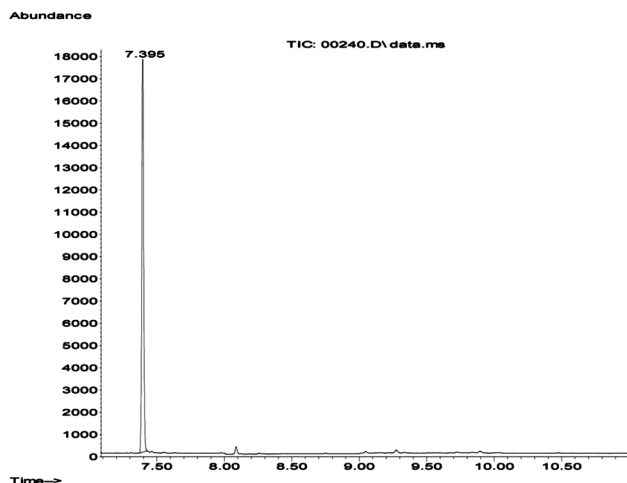


Рис. 1. Пример обзорной хроматограммы, полученной при исследовании образца крови, не содержащей золпидема (пик со временем удерживания 7,395 мин — имипрамин).

3 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0 и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Далее проводили ТФЭ по схеме: кондиционирование сорбента осуществляли последовательным промыванием 2 мл 95 % этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0. Загрузку анализируемого образца крови осуществляли со скоростью 1 мл/мин, после чего промывали сорбент последовательным пропуском через него растворов объемами по 1 мл: 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0; 0,1 М раствора уксусной кислоты и 10 % этанола. Элюирование первоначально осуществляли смесью этилацетат – *n*-гексан (1:3) дважды порциями по 2 мл (элюат I) и далее промывали патрон 2 мл метанола. Последующее элюирование проводили в отдельный флакон со скоростью 1 мл/мин смесью дихлорметан – пропанол-2 – 25 % раствор аммиака (4:1:0,1) дважды порциями по 2 мл (элюат II). Элюат II испаряли досуха

в токе азота при 60 °С. К полученному сухому остатку прибавляли 200 мкл этилацетата, содержащего диазепам (0,001 мг/мл) в качестве внешнего стандарта, 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор хроматомасс-спектрометра.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 300 и 280 °С. Температура колонки начальная 70 °С в течение 1 мин и прогрев до 230 °С со скоростью программирования 40 град/мин, затем прогрев до 300 °С со скоростью программирования 20 град/мин; выдержка при конечной температуре 2,5 мин. Регистрация масс-спектров проводилась в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по ионам с величинами  $m/z$  для золпидема — 235, 307, 219, имипрамина — 234, 235, 280 (внутренний стандарт) и диазепам (внешний стандарт) — 256, 283. Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программы ChemStation G1701DA.

**Построение калибровочной прямой.** Построение калибровочной прямой для количественного определения золпидема в крови проводили путем получения и анализа калибровочных стандартов, которые готовили добавлением к 0,5 мл “холостой” пробы цельной крови этанольных растворов, содержащих по 20; 75; 125; 250 и 750 нг золпидема, и имипрамина гидрохлорида в качестве внутреннего стандарта в количестве 500 нг. Исследовались по 2 пробы для каждой концентрации.

Проведение валидации методики проводили согласно Государственной фармакопее XII издания [16]. Для валидации готовили модельные образцы крови на 3

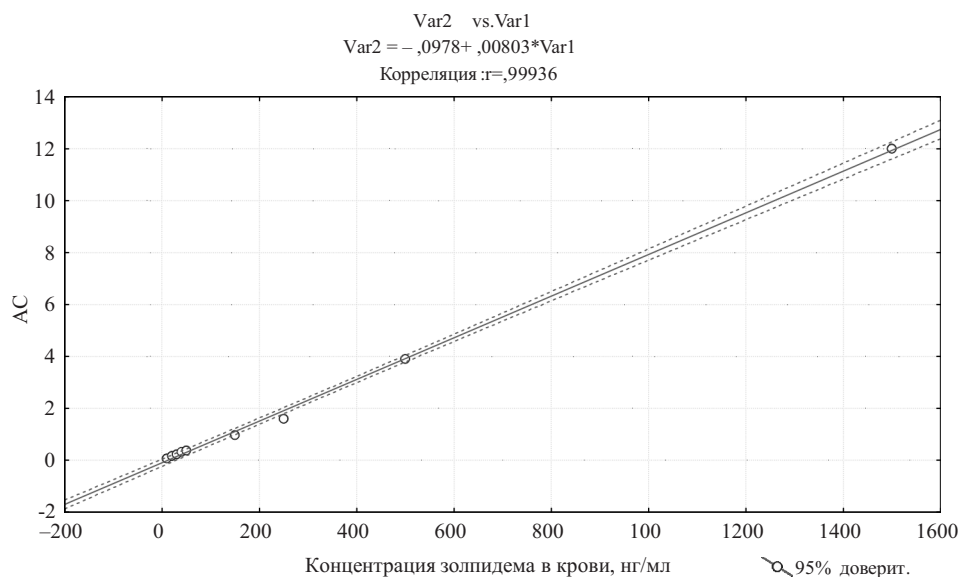


Рис. 2. Калибровочный график с дополнительными точками, соответствующими концентрации золпидема в крови вблизи предела обнаружения.

Метрологическая оценка методики количественного определения золпидама в крови ( $n = 15, p = 95 \%$ )

$\mu$ , нг/мл	$f$	$\bar{x}$	$s^2$	$s$	$s_x^-$ , %	$t(P, f)$ табл.	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$	$t_{\text{выч}}$	$\delta$ , %
150	14	157,95	513,29	22,656	14,3	2,15	12,58	7,96	9,91	38,6
500		543,70	5967,56	77,250	14,2		42,88	7,89	2,19	8,74
1500		1577,52	34137,4	184,763	11,7		102,57	6,50	1,62	-

уровнях концентрации золпидама по 3 образца для каждого значения.

$$\delta = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} 100 \%. \quad (2)$$

### Результаты и их обсуждение

**Метрологическая характеристика методики.** Результаты количественного определения золпидама в модельных образцах крови методом ГХ/МС представлены в табл. 1, где  $\mu$  — принятое опорное значение концентрации золпидама;  $f$  — число степеней свободы;  $s^2$  — дисперсия;  $s$  — стандартное отклонение;  $s_x^-$  — относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации), %;  $t(P, f)$  (табл.) — табличный критерий Стьюдента при заданном уровне вероятности  $p$  и числу степеней свободы  $f$ ;  $\Delta\bar{x}$  — полуширина доверительного интервала среднего значения;  $\bar{\epsilon}$  — относительная ошибка (погрешность) среднего результата, %;  $t_{\text{выч}}$  — вычисленный критерий Стьюдента;  $\delta$  — систематическая ошибка.

Вследствие того, что при проведенных исследованиях  $|\mu - \bar{x}| > 0$  для каждого уровня концентраций золпидама, то необходимо было решить вопрос о наличии или отсутствии систематической ошибки, для этого вычисляли критерий Стьюдента по формуле:

$$t_{\text{выч}} = \frac{|\mu - \bar{x}| \sqrt{n}}{s}. \quad (1)$$

Полученные значения  $t_{\text{выч}}$  оценивали при  $p = 95 \%$  и  $f = n - 1 = 14$ , при этом, для модельных образцов крови с концентрацией 150 и 500 нг/мл реализовалось неравенство  $t_{\text{выч}} > t_{\text{табл}}$ . Поэтому полученные результаты при этой концентрации отягощены систематической ошибкой, величину которой  $\delta$  рассчитывали по формуле (2), результаты представлены в табл. 1.

Таблица 2

### Эффективность экстракции золпидама из образцов модельной крови

№ пробы	R, %		
	150 нг/мл	500 нг/мл	1500 нг/мл
1	100,212	94,81662	114,0456
2	91,2548	95,28679	82,71029
3	90,5392	102,3197	93,69478
4	104,6668	97,15002	102,6618
5	93,56654	91,95916	93,72303
6	98,97796	94,33791	106,0756
$\bar{R}$ , %	96,54	95,98	98,82
$s$	5,63	3,53	11,05
$s_x^-$ , %	5,83	3,68	11,18

**Эффективность экстракции (выход) золпидама (R).** Результаты изолирования золпидама из исследуемых образцов крови с использованием ТФЭ в табл. 2.

Таким образом, при использовании ТФЭ наблюдается высокая степень извлечения золпидама из крови, близкая к 100 %.

**Определение специфичности** методики для обнаружения золпидама в крови методом ГХ/МС проводили по схеме: исследовали 5 образцов крови лиц, предварительно не принимавших золпидем. Образцы готовили по вышеописанным методикам, далее их в случайном порядке анализировали методом ГХ/МС как в режиме полного сканирования масс 45 – 450 а.е., так и в режиме SIM. На каждой полученной хроматограмме по характеристическим ионам с величинами  $m/z$  235, 307 и 219 проводили анализ участков, соответствующих времени удерживания золпидама в пределах  $\pm 5 \%$  (15,40  $\pm$  0,77) мин — для режима Scan и (9,73  $\pm$  0,49) мин — для режима SIM). На всех хроматограммах в указанном интервале времен удерживания не наблюдали посторонних пиков с соотношением сигнал/шум большим 3:1. Таким образом, доказано, что ни компоненты матрицы, ни возможные примеси, не искажают результаты количественного определения (рис. 1).

**Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) золпидама в крови.** ПО и ПКО для методики количественного определения золпидама в крови рассчитывали с использованием ка-

Таблица 3

### Характеристики соблюдения линейности при количественном определении золпидама в крови

Объем выборки, $n = 5$	Концентрация модельного образца крови, нг/мл				
	40	150	250	500	1500
Величина АС	0,3126	0,9649	1,5986	3,8950	12,0080
Коэффициент корреляции, $r$			0,999		
Тангенс угла наклона прямой (наклон), $b$			0,00813		
Точка пересечения с осью ординат, $a$			-0,2129		
Остаточная сумма квадратов отклонений			0,03106		

## Результаты количественного определения золпидема в образцах модельной крови для подтверждения правильности методики

Показатель	Концентрация золпидема в образце								
	150 нг/мл			500 нг/мл			1500 нг/мл		
№ определения	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Найденная концентрация золпидема, нг/мл	148,42	161,18	150,34	520,94	501,80	487,88	1485,44	1511,86	1781,68
Среднее значение, $\bar{x}$ , нг/мл		153,31			503,54			1592,99	
Систематическая погрешность, нг/мл	-4,89	7,87	-2,97	17,4	-1,74	-15,66	-107,55	-81,13	188,69
Стандартное отклонение, $s$		6,880			16,599			163,941	
Коэффициент вариации, $s_x$ , %		4,5			3,3			10,3	
Критерий Стьюдента, (0,05, $n-1$ )					4,30				
Полуширина доверительного интервала, нг/мл		17,08			41,21			407,00	
Доверительный интервал, нг/мл		54,71 ± 3,49			152,19 ± 29,82			391,20 ± 84,43	
Критерий приемлемости	1,23	1,98	0,75	1,82	0,18	1,63	1,14	0,86	1,99

либровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала (АС).

ПО и ПКО для крови были валидированы путем анализа 5 образцов модельной крови с концентрациями, предположительно близкими к пределу обнаружения: 10, 20, 30, 40 и 50 нг/мл. Полученная графическая зависимость интенсивности АС от количества золпидема в крови представлена на рис. 2 и описывается уравнением множественной регрессии:

$$y = 0,00803x - 0,0978. \quad (3)$$

Предел обнаружения и предел количественного определения [18] золпидема в крови далее рассчитывали по формулам:

$$ПО = 3,3 \frac{S}{b}; \quad ПКО = 10 \frac{S}{b},$$

где  $S$  — стандартное отклонение аналитического сигнала;  $b$  — коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной прямой). ПО и ПКО золпидема в крови составили:

$$ПКО = 10 \cdot \frac{0,0583905}{0,00803} = 72,7 \text{ нг/мл};$$

$$ПО = 3,3 \cdot \frac{0,0583905}{0,00803} = 24,0 \text{ нг/мл}.$$

<sup>1</sup> АС равен отношению площади пика ионного фрагмента с величиной  $m/z$  235 золпидема к площади пика ионного фрагмента внутреннего стандарта (имипрамин) с  $m/z$  234.

#### Аналитическая область методики и линейность.

Изучение линейности проводили на 5 уровнях концентрации золпидема (в диапазоне 40 – 1500 нг/мл) путем хроматомасс-спектрометрического определения золпидема в образцах модельной крови после ТФЭ; критерий приемлемости: коэффициент корреляции должен отвечать условию  $r \geq 0,99$ . При статистической обработке линейной зависимости полученных значений АС<sup>1</sup> от концентрации золпидема по уравнению (3) коэффициент корреляции линейного регрессионного графика — 0,999. На основании полученных результатов (табл. 3) можно утверждать о соблюдении линейности в диапазоне применения методики.

Аналитическая область методики может быть установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели с учетом ПКО. У валидируемой методики количественного определения золпидема в крови аналитическая область соответствует диапазону концентраций 70 – 1500 нг/мл, при этом нижний уровень концентрации золпидема ограничиваются найденными для него ПКО.

**Определение правильности методики.** Правильность аналитической методики количественного определения золпидема в крови доказывали на всем диапазоне ее применения. Определения проводились путем анализа модельных образцов крови с концентрациями 150, 500 и 1500 нг/мл. Оценка проводилась путем расчета разности между средним и принятым опорным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов среднего значения. Результаты 9 испытаний (по 3 концентрации, перекрывающих рабочий

## Результаты количественного определения золпидама в образцах модельной крови для подтверждения повторяемости методики

Показатель	Концентрация золпидама в образце, нг/мл								
	150			500			1500		
№ определения	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Найденная концентрация золпидама, нг/мл	144,02	130,92	162,5	443,48	414,3	479,72	1573,28	1395,46	1452,32
Среднее значение, $\bar{x}$ , нг/мл		145,81			445,83			1473,69	
Стандартное отклонение, $s$		15,866			32,773			90,815	
Коэффициент вариации, $s_x^-$ , %		10,9			7,4			6,2	
Критерий Стьюдента, $(0,05, n-1)$					4,30				
Полуширина доверительного интервала, нг/мл		39,39			81,36			225,46	
Доверительный интервал, нг/мл		145,81 ± 39,39			445,83 ± 81,36			1473,69 ± 225,46	

## Результаты количественного определения золпидама в образцах модельной крови для определения внутрилабораторной прецизионности методики

Концентрация золпидама в образце, нг/мл	№ определения	Найденная концентрация золпидама, нг/мл					Среднее значение, $\bar{x}$ , нг/мл	Стандартное отклонение, $s$	Коэффициент вариации, $s_x^-$ , %
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день			
150	1	150,22	144,02	148,42	182,2	136,98	157,95	22,656	14,3
	2	214,24	130,92	161,18	157,94	126,56			
	3	189,10	162,5	150,34	147,77	154,98			
500	1	561,32	443,48	520,94	647,54	581,02	543,70	77,250	14,2
	2	550,02	414,3	501,8	590,70	631,92			
	3	489,88	479,72	487,88	690,02	564,92			
1500	1	1178,32	1573,28	1485,44	1629,14	1517,02	1577,52	184,763	11,7
	2	1818,82	1395,46	1511,86	1636,44	1733,34			
	3	1912,56	1452,32	1781,68	1475,28	1561,84			

диапазон, с 3-кратным определением для каждой концентрации) представлены в табл. 4.

Таким образом, результаты определения с использованием методики количественного определения золпидама в крови можно считать правильными, т.к. найденные значения концентраций, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительного интервала соответствующего среднего результата анализа, полученного экспериментально по соответствующей методике. Кроме того, правильной признается методика, когда ее систематическая погрешность незначима, а это соблюдается при условии, если выполняется неравенство  $(d_i \sqrt{n})/s < t(P, f)$  [17]. В данном случае эта величина значительно меньше (находится в диапазоне 0,37 – 2,00), чем табличное значение критерия Стьюдента, равное 4,30 (при заданной доверительной вероятности  $p = 95\%$  и числе степеней свободы  $f = n - 1$ ).

**Определение прецизионности методики (повторяемость и промежуточная прецизионность).** Для подтверждения повторяемости (сходимости) были проанализированы 9 образцов модельной крови в 3 репликах для каждой концентрации. Пробоподготовка и анализ были проведены в один день, одними оператором и на одной и той же аппаратуре. Критерий приемлемости: коэффициент вариации должен быть не больше 15% [18].

Результаты определений и метрологические характеристики, представленные в табл. 5, позволяют сделать вывод о подтверждении прецизионности методики на уровне повторяемости, т.к. коэффициент вариации для всех исследований составил 6,2 – 10,9%.

Для определения внутрилабораторной прецизионности по одному фактору (время) готовили и анализировали серии образцов в течение 5 дней. Каждый день исследовали 9 образцов модельной крови с добавкой золпидама в 3 концентрациях, каждую из которых повторяли по 3 раза.

Результаты, подтверждающие внутрилабораторную прецизионность методики количественного определения золпидама в крови, представлены в табл. 6. Как видно из таблицы, коэффициент вариации на всех уровнях концентрации не превысил 15%.

Проведенные валидационные испытания подтвердили соответствие методики количественного определения золпидама установленным критериям и позволяют надежно определять содержание данного снотворного средства в образцах крови.

Таким образом, представленная методика количественного определения золпидама в крови соответствует необходимым критериям приемлемости, обладает высокой специфичностью и чувствительностью и может успешно применяться для оценки степени тяжести ин-

токсикации в токсикологической и судебно-медицинской практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Котова, И. В. Рябоконе, *Лечащий врач*, № 5, (2013). <http://www.lvrach.ru/2013/05/15435695/>
2. S. A. Hollingworth and D. J. Siskind, *Pharmacoepidemiol. Drug Safety*, **19**(3), 280 – 288 (2010).
3. F. Hoffmann, W. Scharffetter and G. Glaeske, *Der. Nervenarzt.*, **80**(5), 578 – 583 (2009).
4. W. F. Huang and I. C. Lai, *Drugs & Aging*, **22**(11), 957 – 965 (2005).
5. D. F. Kripke, R. D. Langer and L. E. Kline, *BMJ Open*, **2**(1), e000850 (2012).
6. P. Kovacic and R. Somanathan, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2**(1) 52 – 57 (2009).
7. P. Guinebault, C. Dubruc, P. Hermann and J. P. Thenot, *J. Chromatogr. B*, **383**(1), 208 – 211 (1986).
8. B. Levine, S. C. Wu, J. E. Smialek, *J. Forensic. Sci.*, **44**(2), 369 – 371 (1999).
9. P. Oulis, G. Nakkas and V. G. Masdrakis, *Clin. Neuropharmacol.*, **34**(2), 90 – 91 (2011).
10. Y. Gaillard, J. P. Gay-Montchamp and M. Ollagnier, *J. Chromatogr.*, **622**(2), 197 – 208 (1993).
11. T. P. Rohrig, L. A. Harryman and M. C. Norton, *Methods Mol. Biol.*, **603**, 519 – 526 (2010).
12. L. Sun, L. Zhang, Q. Xu, et al., *Chinese J. Chromatogr.*, **28**(1), 38 – 42 (2010).
13. V. Ascalone, L. Flaminio, P. Guinebault, et al., *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **581**(2), 237 – 250 (1992).
14. L. Reidy, W. Gennaro, B. W. Steele and H. C. Walls, *J. Anal. Toxicol.*, **32**(8), 688 – 694 (2008).
15. Е. А. Крылова, Ю. А. Хомов, С. С. Катаев, *Вестник РУДН*, № 4, 264 – 268 (2010).
16. *Государственная фармакопея Российской Федерации XII*, Т. 1, “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”, Москва (2008).
17. И. Л. Кнунянц (ред.), *Большая российская энциклопедия*, Москва (2003), с. 476.
18. *Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации*, Спорт и культура, Москва (2007).

Поступила 01.07.14

## VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ZOLPIDEM IN WHOLE BLOOD BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

E. A. Krylova<sup>1</sup>, S. S. Kataev<sup>1</sup>, Y. A. Khomov<sup>2</sup>, and O. N. Dvorskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Perm Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Perm, 614977 Russia;

<sup>2</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614990 Russia

A method for the quantitative determination of zolpidem in whole blood by GC/MS has been developed and validated. Imipramine hydrochloride is used as the internal standard. The multiple regression coefficient for the obtained calibration straight line is  $r = 0.999$ . The proposed technique is metrologically assessed with respect to eight statistical parameters. The efficiency of zolpidem extraction from the model blood at three levels of concentration has been determined. The recovery of target substance was achieved within 96–99%. The technique is assessed with respect to specificity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity, analytical area, correctness, and precision (repeatability and intralaboratory precision). The obtained results are within acceptable limits for statistical processing. The LOD of zolpidem in whole blood is 24.0 ng/mL and the LOQ is 72.7 ng/mL.

**Keywords:** zolpidem; quantitative determination; validation.