



Development of a UPLC-MS/MS Method for Determination of Tacrolimus and Cyclosporine A in Human Whole Blood

Shuanghu WANG¹ #, Ting DING¹ #, Jianmiao CHEN¹, Peiwu GENG¹,
Miaohua WEI¹, Xianqin WANG² *, Yunfang ZHOU¹ *

¹ The Laboratory of Clinical Pharmacy, The People's Hospital of Lishui,
Wenzhou Medical University, Lishui 323000, China.

² Analytical and Testing Center of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China.

SUMMARY. An accurate and validated liquid chromatography method and a triple quadrupole mass spectrometry method were developed and validated for determination of tacrolimus and cyclosporine A in human whole blood. Whole blood samples were prepared by precipitating protein with acetonitrile after adding ZnSO₄. The analytes were separated using a reversed-phase BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Waters, USA) maintained at 60 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (both containing 10 mM ammonium acetate by adding 0.1% formic acid) with a gradient elution pumped at a flow rate of 0.4 mL/min. The analytes were detected with positive electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode for target fragment ions m/z 822.36→769.37 for tacrolimus, m/z 1220.95→1203.74 for cyclosporine A and m/z 285.1→193.1 for diazepam (IS). Good linearity was achieved to quantify the concentration ranges of 0.5-10 ng/mL for tacrolimus and 10-500 ng/mL for cyclosporine A in human whole blood. The mean recoveries of tacrolimus and cyclosporine A from the whole blood exceeded 75.58%. The intra-run and inter-run assay precisions of tacrolimus and cyclosporine A were both less than 8.9%. The validated method proved stability of tacrolimus and cyclosporine A in human whole blood and the correlation study showed the capability of the method to be used as an alternative for whole blood analysis in therapeutic drug monitoring.

RESUMEN. Un método de cromatografía líquida preciso y validado y un método de espectrometría de masas de triple cuadrupolo se desarrollaron y validaron para la determinación de tacrolimus y ciclosporina A en sangre humana entera. Muestras de sangre entera se prepararon por precipitación de proteínas con acetonitrilo después de la adición de ZnSO₄. Los analitos se separaron usando una columna BEH C18 de fase inversa (2,1 x 50 mm, 1,7 μm, Waters, EE.UU.) mantenida a 60 °C. La fase móvil consistió en acetonitrilo y agua, ambos conteniendo acetato de amonio 10 mM mediante la adición de 0,1% de ácido fórmico) con gradiente de elución a un flujo de 0,4 mL/min. Los analitos se detectaron con ionización positiva por electrospray en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) para los fragmentos de iones diana m/z 822,36→769,37 para tacrolimus, m/z 1220,95 → 1203,74 para la ciclosporina A y m/z 285,1→193,1 para el diazepam (ES). Se logró una buena linealidad al cuantificar los intervalos de concentración de 0,5-10 ng/mL para tacrolimus y de 10-500 ng/mL para la ciclosporina A en sangre entera humana. Las recuperaciones medias de tacrolimus y ciclosporina A de la sangre entera superaron el 75,58%. Las precisiones intra- e inter-corridas del análisis de tacrolimus y ciclosporina A se encuentran a menos de 8,9%. El método validado demostró la estabilidad de tacrolimus y ciclosporina A en sangre entera humana y el estudio de correlación mostró la capacidad del método para ser utilizado como una alternativa para el análisis de sangre entera en la monitorización terapéutica.

KEY WORDS: Cyclosporine A, Human whole blood, Tacrolimus, Therapeutic drug monitoring, UPLC-MS/MS.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: zyf2808@126.com

These authors contributed equally to this work.