



HPLC Method for Simultaneous Determination of Entecavir and Tenofovir in Human Spiked Plasma and Pharmaceutical Dosage Forms

Hamza ALTAF¹, Muhammad ASHRAF², Muhammad M. HAYAT³,
Abid HUSSAIN^{1*}, Yusuf ALI¹, Nadeem SHAHZAD⁴, Muhammad B. AHMAD⁴,
Jameel RAHMAN⁵, Naheed AKHTAR¹, & Saif ur REHMAN¹

¹ Department of Pharmacy, University of Poonch, Rawala Kot Azad Kashmir, Pakistan

² Department of Biochemistry and Biotechnology,
The Islamia University of Bahawalpur, Bahawalpur, Pakistan.

³ Department of Pharmacy, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan.

⁴ Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Alternative Medical Health Sciences,
The Islamia University of Bahawalpur, Bahawalpur, Pakistan.

⁵ Department of Chemistry, The Islamia University of Bahawalpur, Bahawalpur, Pakistan.

SUMMARY. A new RP-HPLC method has been developed and validated for the simultaneous determination of entecavir and tenofovir in human spiked plasma and tablet form. Both drugs were separated on C₁₈ Hypersil column (150 × 4.6 mm, 5 μm particle size) by using a mobile phase consisted of 25 mM Na₂HPO₄ buffer and methanol with a ratio of 85:15, at a pH of 6.0 on a flow rate of 1.0 mL/min and detection was performed at 255 nm. The method was linear in range of 2.5-100 ng/mL and 25-1000 ng/mL for entecavir and tenofovir, respectively. The method has good linearity with $r^2 = 0.999$ and the intra-day and inter-day precision was < 3.0% for both drugs. The limit of detection values were 1.25 and 12.5 ng/mL, while the limit of quantification were 2.5 and 25 ng/mL for entecavir and tenofovir, respectively. The method demonstrates good robustness, resisting to small deliberate changes in pH, flow rate and in the mobile phase. The developed method was successfully applied for determining the drug concentration in human spiked plasma and tablet dosage form, where it exhibited good performance and reproducibility.

RESUMEN. Se ha desarrollado y validado un nuevo método de RP-HPLC para la determinación simultánea de entecavir y tenofovir en plasma humano y tabletas. Ambos fármacos fueron separados en una columna C₁₈ Hypersil (150 × 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula) usando una fase móvil de tampón Na₂HPO₄ 25 mM y metanol en una relación de 85:15, a un pH de 6,0 con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min y la detección se realizó a 255 nm. El método fue lineal en el rango de 2,5 a 100 y 25-1000 ng/mL para entecavir y tenofovir, respectivamente. El método tiene una buena linealidad con $r^2 = 0,999$ y la precisión intra-día y entre días es < 3,0% para ambos medicamentos. El límite de detección fue de 1,25 y 12,5 ng/mL, mientras que el límite de cuantificación fue de 2,5 y 25 ng/mL para entecavir y tenofovir, respectivamente. El método demuestra una buena robustez y resistencia a pequeños cambios deliberados en el pH, la tasa de flujo y en la fase móvil. El método desarrollado se aplicó con éxito para determinar la concentración de fármacos en plasma humano y tabletas, con buen rendimiento y reproducibilidad.

KEY WORDS: entecavir, tenofovir, RP-HPLC, spike plasma, table dosage form.

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: abidhussainkk@gmail.com