

카베딜롤 (25 mg) 정제의 생물학적 동등성 및 약물동태연구

우수경 · 김호순 · 강종성 · 권광일[#]

충남대학교 약학대학

(Received August 1, 2001; Revised October 17, 2001)

Bioequivalence and Pharmacokinetics of Carvedilol (25 mg) Tablets in Volunteers

Su-Kyung Woo, Ho-Soon Kim, Jong-Seong Kang and Kwang-il Kwon[#]

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

Abstract — Carvedilol is a nonselective β -blocking agent with vasodilating properties that are attributed mainly to its blocking activity at α_1 -receptors. Carvedilol is used in the treatment of mild to moderate hypertension and angina pectoris and is often used in combination with other drugs. This study was carried out to evaluate the bioequivalence and pharmacokinetics of two carvedilol 25 mg tablet formulations according to the guidelines of Korea Food and Drug Administration (KFDA). Twenty healthy volunteers are enrolled and received a single dose (25 mg as carvedilol) of each drug in the fasting state, in a randomized 2-way crossover design. After oral administration, blood samples were collected for a period of 30 hours. Plasma concentrations of carvedilol were determined by a rapid and sensitive HPLC method with spectrofluorometric detection. The major pharmacokinetic parameters such as AUC_{0-30hr} , AUC_{inf} , C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, Cl/F and V_{β}/F were calculated. ANOVA test and t-test were utilized for the statistical analysis of each parameter. The results showed that the differences in AUC_{0-30hr} , C_{max} and T_{max} between two tablets were ~ 5.66 , 1.74 and 0.00% , respectively. Minimum detectable differences (Δ) at $\alpha=0.05$ were less than $\pm 20\%$ except T_{max} (8.44, 18.36, and 33.86%, respectively). The 90% confidence intervals of all parameters were within $\pm 20\%$ (-10.60~ -0.72, -9.00~12.49 and -19.81~19.81%, respectively). Therefore, it is concluded that the two formulations are bioequivalent for both the extent and the rate of absorption after single dose administration.

Keywords □ Carvedilol, Pharmacokinetics, Bioequivalence, HPLC/Fluorescence

카베딜롤 [(±)-1-carvazol-4-yloxy-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino)-2-propanol]은 비선택적인 β -수용체 차단제로서 α_1 -수용체 차단 작용까지 지니며, 내인성 교감신경 흥분 작용 (intrinsic sympathomimetic activity: ISA)이 없어서 기립성 저혈압의 부작용 빈도가 낮다.^{1,3)} S(-)체가 비선택적인 β -차단 작용을 나타내며, R(+)체는 β -차단작용 및 α_1 -차단작용을 모두 가진다.¹⁾

카베딜롤은 심장 박출량을 감소시키고, 운동이나 이소프로테레놀로 인한 심계항진과 반사성 기립성 심계

항진을 감소시킨다. 또한 카베딜롤은 혈관확장을 일으키며, 말초혈관저항을 감소시켜, 약물투여 30분 이내에 혈압을 강하 시킨다.³⁾ 혈관확장작용을 일으키는 것은 대부분 α_1 -차단작용 때문이며, 고농도에서는 칼슘 유입도 차단한다. α_1 -차단작용으로 인한 혈관확장으로 심장의 후부하(afterload)를 줄이고, 말초저항을 낮춰주어 과도한 심부담을 억제할 수 있다.^{1,2)}

카베딜롤의 생물학적 이용율(F)는 초회통과효과 때문에 25~35%이다.³⁾ 카베딜롤은 고지용성으로 총단백 결합율은 98% 이상이며 주로 알부민과 결합한다.⁴⁾ 대사체 중 몇몇은 β -차단작용을 가지며, 그 중 4-하이드록시페닐 카베딜롤은 카베딜롤보다 13배정도 효능이

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5937 (팩스) 042-823-6781

높다.⁵⁾ 경구 투여하면 1~1.5시간 후에 최고혈중농도에 도달하며, 카베딜롤의 반감기는 6~13 시간으로 보고되어 있다.⁶⁾

생물학적 동등성 시험(bioequivalence test)은 동일 유효성분을 포함하는 2가지 이상의 제제를 비교시 제제간의 생체이용율의 차이가 없다는 것을 증명하거나 확인하는데 그 의의가 있으며,⁷⁾ 제제학적으로 동등한 제제나 제제학적으로 대체 가능한 제제의 판매를 위해서는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성 시험 기준에 따라 생체시험을 통해 생체이용율에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하여야 한다.⁸⁾

본 연구는 카베딜롤의 기존 시판 제제인 딜라트렌 정(대조약)과 성분과 함량이 동일한 카베딜롤 정(시험약)의 생체이용율이 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하기 위한 것으로 생물학적 동등성 시험 기준에 따라 건강한 지원자 20명을 대상으로 라틴 방격법에 따라 생체내 이용율 시험을 한 후, 얻어진 카베딜롤의 혈장 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t), 최고 혈중 농도(C_{max})와 최고 혈장 농도 도달 시간(T_{max})에 대하여 분산분석(ANOVA, analysis of variance)을 행하여 생물학적 동등성 여부를 판정하였다. 또한 WinNonlin 프로그램을 이용하여 측정된 개개인의 시간별 혈중농도 변화로부터 카베딜롤의 상세한 약물동태 파라미터를 산출하였다.

실험방법

시약 및 기기

실험에 사용된 시험약 카베딜롤 정(제조번호: 324001, 제조일자: 2000. 4. 19)과 대조약 딜라트렌 정(제조번호: CA004, 유효기한: 2003. 2. 25)은 각각 카베딜롤을 25 mg 함유한다. HPLC용 메탄올, 아세트나이트릴과 분석에 사용된 황산 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다. 분석 기기로 HPLC용 펌프(Waters 2690 system), 형광검출기(Waters 474), 역상 컬럼(Spherisorb S5 C8, 4.6×150 mm, Waters) 등을 사용하여 혈장 샘플을 분석하였다.

피험자 선정

피험자는 만 20세 이상의 건강한 성인으로 식품의약품 안전청이 고시한 생물학적 동등성 시험 기준에 근거하여 충남대학교 병원에서 실시한 건강 진단 결과 검사 항목 중 정상범위를 벗어난 항목이 2가지 이하인

20명을 피험자로 최종 선정하였다.⁸⁾ 최종 피험자들은 동의서에 서명 후 본시험에 참가하였다. 피험자로 선정된 지원자들은 남자 11명과 여자 9명으로 구성되었고 평균체중은 57.65 kg(45~72 kg), 평균신장은 166.75 cm(154~182 cm) 그리고 평균 연령은 23.9세(22~26 세)이었다. 모든 지원자는 정해진 투약일 전 10일간 및 시험기간에는 음주를 삼가고 타 약물의 복용을 금하도록 하였으며 시험 전 3일부터는 커피 및 콜라 등 카페인 함유하고 있는 음식의 섭취를 금하도록 하였다.

약물 투약 및 혈액 채취

투약은 라틴 방격법에 따라 총 20명의 지원자를 임의로 두 그룹으로 나누어 2회에 걸쳐 실시하였고 휴약 기간은 5일로 하였다. 대조약과 시험약(카베딜롤 25 mg) 각 1정씩을 200 ml의 물과 함께 아침 식사를 하지 않은 상태에서 투약하였다. 채혈은 약물투여 전 및 투여 후 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 그리고 30시간에 실시하여 총 13회에 걸쳐 시행하였다. 채혈된 혈액은 헤파린이 처리된 튜브에 넣어 혈액응고를 방지한 상태로 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하였고 분리된 혈장은 혈청 분리관으로 옮겨 분석 시까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

혈장 중 카베딜롤의 정량

카베딜롤 표준품 일부의 무게를 측정하고 1 mg/ml이 되도록 메탄올을 가해 용해 시킨 후 메탄올로 희석하여 10, 20, 50, 100, 250, 500 그리고 1000 ng/ml의 표준용액을 만들었다. 공혈장 450 µl를 튜브에 정확히 취하고 위의 카베딜롤 표준용액을 각각 50 µl씩 정확히 가해 1, 2, 5, 10, 25, 50 ng/ml(저농도 범위) 및 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml(고농도 범위)의 검량선용 표준 혈장액을 조제하였다. 냉동고에 보관하였던 시료를 실온에 방치한 뒤 원심분리 한 혈장 500 µl 및 검량선용 표준 혈장에 독사조신(내부표준물질) 1 µg/ml 메탄올 용액 60 µl와 0.1 M Britton-Robinson buffer(pH 8.0) 500 µl를 정확히 가한 후 혼합하였다.⁹⁾ 여기에 에테르(ethyl ether) 5 ml를 가하고 10분간 추출 후 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 유기층을 튜브에 옮겼다. 분리된 유기층에 0.05 M 황산 300 µl를 가하여 30초간 진탕 및 3000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상부 유기층을 제거하고 남은 수층을 컬럼에 주입하여 분석하였다.^{6,9,10)}

이동상은 0.05 M 디부틸아민:아세트나이트릴을 40:60의 비율로 제조하였다. 디부틸아민은 1 M이 되도록 증류수를 가하고 인산을 이용하여 pH 2.5로 제조한 후 분석 시마다 증류수를 이용하여 0.05 M 디부틸아민 용액으로 희석하여 사용하였다.⁶⁾ 이동상의 유속은 1.5 ml/min이었으며, 형광 검출기의 여기(excitation) 파장은 238 nm이었고, 발광(emission) 파장은 350 nm이었다.^{6,9,10)} 컬럼의 온도는 항상 30°C로 유지하였으며 컬럼에 주입량은 50 μ l로 하였다.

위의 HPLC/Fluorescence 분석법에 따라 얻어진 크로마토그램으로부터 카베딜롤의 피크와 내부표준 물질로 사용한 독사조신 피크의 면적비로 검량선을 작성하였고 이 검량선에 의해 혈장 중 카베딜롤의 농도를 산출하였다.

약물동태 파라미터

각 제제의 경구투여 후의 카베딜롤에 대한 약물동태 파라미터(AUC_{0-30hr} , C_{max} , AUC_{inf} , T_{max} , Cl/F , K_a , K_{12} , K_{21} , α , β -phase 반감기 및 V_{β}/F)를 산출하여 비교(평가)하였다. AUC_{0-30hr} 는 사다리꼴 공식을 이용하여 산출하였고 C_{max} 는 측정 최고 농도, T_{max} 는 측정 최고농도를 나타낸 시간으로 하였다. 고유클리어런스(Cl/F)은 투여량을 AUC_{0-30hr} 로 나누어 계산하였다.¹¹⁾

Compartmental analysis를 위해 컴퓨터 프로그램 WinNonlin을 이용하여 지원자 각각의 혈중농도 데이터로부터 fitting(two-compartment model, first-order input, first-order out and no lag time)하였다. Fitting된 그래프로부터 K_a , K_{12} , K_{21} , α 및 β 값이 산출되었고 이 값을 이용하여 α -phase와 β -phase의 실질반감기($t_{1/2\alpha}$ or $t_{1/2\beta}=0.693/\alpha$ or β)를 구하였다. V_{β}/F 는 투여량을 AUC_{inf} 와 β 로 나누어 산출하였다.

생물학적 동등성 평가

두 제제간의 생물학적 동등성 판정기준으로는 시험 약물의 AUC_{0-30hr} , C_{max} , 평균치의 차이가 대조약의 20% 이내로 하였으며, T_{max} 를 참고하였다. 투여시기별 차이와 시험 약물 및 시험군간의 차이는 ANOVA를 이용하여 분석하였다. 생동성 시험 통계처리용 프로그램 K-BEtest를 이용하여 $\alpha=0.05$ 에서 검출력($1-\beta$)은 0.8이상이고 최소 검출치는 0.2이하로 하여 분산분석에 의한 유의성을 검정하였으며 신뢰한계를 참고하였다.

실험결과 및 고찰

혈장내 카베딜롤의 농도 측정

카베딜롤의 피크와 내부표준 물질로 사용한 독사조

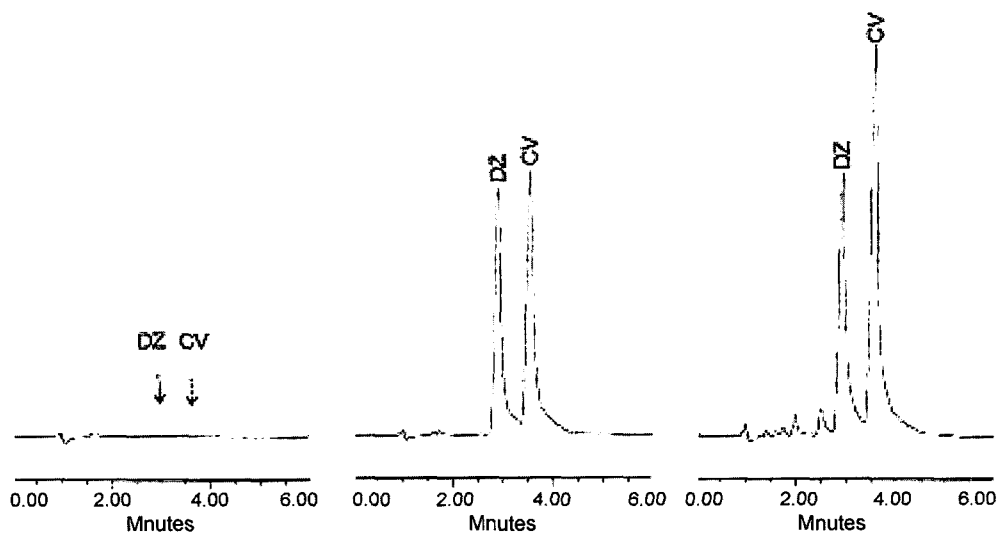


Fig. 1 - Chromatograms of carvedilol in human plasma.

Left: Blank plasma, the arrow and the dotted one indicate doxazosin and carvedilol elution point, respectively. Middle: Spiked plasma with 25 ng/ml of carvedilol. Right: Plasma sample of volunteer No. 13 at 2.0 hr after oral administration of 25 mg carvedilol. The peak was calculated to be 41.98 ng/ml of carvedilol. Peaks: DZ=doxazosin; CV=carvedilol.

신 피크의 면적 비로 검량선을 작성하였다. 카베딜롤 1~50 ng/ml(저농도 범위)의 농도에서 작성된 평균 검량선 공식은 $Y(\text{면적 비})=0.0452 \times (\text{카베딜롤의 농도}) + 0.0364 (r=0.9996, n=5)$ 이었고, 5~100 ng/ml(고농도 범위)의 농도에서 작성된 검량선 공식은 $Y(\text{면적 비})=0.0468 \times (\text{카베딜롤의 농도}) + 0.0524 (r=0.9998, n=5)$ 으로 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 1~50 ng/ml 및 5~100 ng/ml의 농도범위에 있어서 카베딜롤의 일 내 및 일간 변동계수(C.V.)는 모두 10% 이하로 나타났다. 이동상 용액 중 약물의 평균 피크 면적에 대한 추출 시료 중 약물의 피크 면적 비로부터 구한 추출 회수율(recovery)은 $85 \pm 8.32\%$ 이었다. 피크 출현 시간은 독사조신과 카베딜롤이 각각 2.9, 3.7분이었고, 측정한계(detection limit)는 0.2 ng/ml이었다. 이로부터 본 실험에 사용된 HPLC/Fluorescence 분석법은 혈장 내 카베딜롤의 농도 측정에 있어 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈장 내 카베딜롤의 HPLC /Fluorescence 분석 시 chromatograms을 Fig. 1에 나타내었다.

혈중 농도 및 약물동태 파라미터

대조약 또는 시험약 1정(카베딜롤으로서 25 mg)을 지원자 20명에게 경구 투여한 후 시간별로 측정된 혈장내의 카베딜롤 농도를 평균하여 시간에 따른 혈중 농도의 변화를 Fig. 2에 나타냈다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 두 제제 모두 경구투여 후 30분까지 빠른 흡수를 보이며 혈중농도가 증가한 후 8시간까지 긴 α -

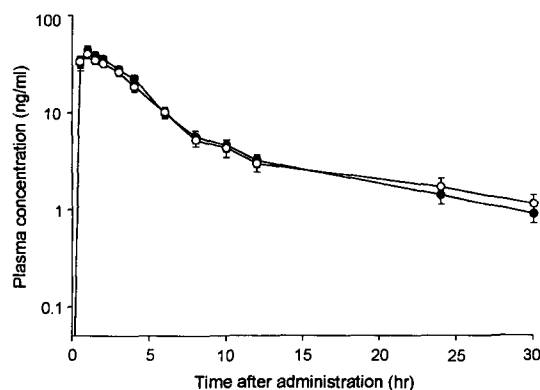


Fig. 2 - Time courses of carvedilol plasma concentrations after oral administration of one tablet (25 mg) each of reference drug (Dilatrend® Tab.: -●-) or test drug (Carvedilol Tab.: -○-) in human volunteers (Mean \pm S.E.M.)

phase를 나타내 충분히 농도가 감소한 뒤 8시간 이후에는 β -phase가 나타났다. 두 제제의 평균 혈중농도는 대체로 유사했으나 평균 최고 혈중농도 도달 시간인 1시간 이후 4시간까지는 대조약의 혈중농도가 시험약보다 약간 높게 나타났고 12시간 이후에는 대조약의 경우가 시험약보다 조금 빠르게 소실되는 형태를 나타내었다.

카베딜롤의 혈장농도에서 얻어진 약물동태 파라미터를 Table I에 나타내었다. 카베딜롤 25 mg 두제제의 약물동태 파라미터를 비교할 때 대조약의 AUC_{0-30hr} 는 $224.38 \pm 20.64 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{m}$ 이었고, 시험약의 AUC_{0-30hr} 는

Table I - Pharmacokinetic parameters of carvedilol in human volunteers after oral administration of one tablet (25 mg as carvedilol) each of test drug (Carvedilol Tab.) or reference drug (Dilatrend® Tab.)

Parameters	Reference drug Dilatrend® Tab.	Test drug Carvedilol Tab.	t-test**
AUC_{0-30hr} (ng · hr/ml)	$224.38 \pm 20.64^*$	211.68 ± 18.43	NS
C_{max} (ng/ml)	49.99 ± 3.85	50.87 ± 3.14	NS
AUC_{Cinf} (ng · hr/ml)	237.21 ± 22.75	232.89 ± 23.42	NS
T_{max} (hr)	1.20 ± 0.14	1.20 ± 0.18	NS
CV/F (L/hr)	131.00 ± 12.44	134.58 ± 10.68	NS
$t_{1/2\alpha}$ (hr)	0.43 ± 0.07	0.56 ± 0.22	NS
$t_{1/2\beta}$ (hr)	13.55 ± 6.53	13.41 ± 1.52	NS
K_a (hr ⁻¹)	0.40 ± 0.06	0.52 ± 0.11	NS
K_{12} (hr ⁻¹)	0.48 ± 0.08	0.45 ± 0.18	NS
K_{21} (hr ⁻¹)	0.074 ± 0.04	0.086 ± 0.01	NS
V β /F (L)	2184.67 ± 240.38	2271.21 ± 198.32	NS

*Mean \pm S.E.M.(n=20).

**Significance by paired t-test, NS ; Not Significantly different (p>0.05).

Table II – Statistical summary of carvedilol bioequivalence study between test drug (Carvedilol Tab.) and reference drug (Dilatrend® Tab.) drug on major pharmacokinetic parameters

Parameter	Criteria	% Difference	F-test	Detection limit	Confidence interval
AUC _{0-30hr}		-5.66%	3.95*	8.44%	-10.60~-0.72%**
C _{max}		1.74%	0.08	18.36%	-9.00~12.49%
T _{max}		0.00%	0.00	33.86%	-19.81~19.81%

*F-value between test and reference formulations by ANOVA.

**Confidence interval of % difference (delta %).

211.68±18.43 ng·hr/ml로 나타나 모두 대조약의 경우가 약간씩 높았으나 두 제제간의 차이에 통계적인 유의성은 없었다.

C_{max}를 비교해보면 대조약이 49.99±3.85 ng/ml, 시험약이 50.87±3.14 ng/ml로 나타났고 T_{max}는 각각 1.20±0.14 hr와 1.20±0.18 hr로 두 파라미터 모두 유의성은 없었다. 고유클리어런스(CI/F)는 대조약이 131.00±12.44 L/hr이었고 시험약은 134.58±10.68 L/hr로 각각 산출되었다.

WinNonlin 프로그램을 이용하여 개인의 혈중농도 데이터를 각각 fitting하였을 때 카베딜롤의 혈중농도 변화 곡선은 two-compartment model을 따르고 있음을 알 수 있었다. 이때의 AIC 값은 15.27±24.48으로 one-compartment model을 적용하였을 때의 AIC값인 69.16±16.44보다 작았으며 실측 값과 fitting에 의한 예측 값과의 상관계수(correlation) 또한 0.956±0.036으로 좋게 나타나 two-compartment model이 카베딜롤의 혈중농도변화를 설명하는데 더 적절한 모델인 것으로 판단하였다. 산출된 두 제제의 파라미터를 비교해 보면, α-phase 반감기와 β-phase 반감기는 대조약이 각각 0.43±0.07 hr, 13.55±6.53 hr이었고, 시험약은 각각 0.56±0.22 hr, 13.41±1.52 hr으로 나타났다. 두 제제 모두 1시간 이내의 짧은 α-phase 반감기와 13시간 정도의 긴 β-phase 반감기를 나타내었다. Vβ/F는 대조약이 2184.67 L, 시험약이 2271.21 L로 산출되었다.

통계학적 고찰

대조약과 시험약을 각각 경구투여 후 측정된 카베딜롤의 혈장농도로부터 산출된 AUC_{0-30hr}, C_{max}, 및 T_{max} 각각의 데이터를 가지고 시험약과 대조약의 평균치, 분산분석에 의한 유의성 검정(t-test, ANOVA), 검출력(power test) 및 신뢰한계를 계산하였고 그 결과

를 Table II에 나타내었다.

두 제제간 평균치의 차이는 AUC_{0-30hr}, C_{max}, 및 T_{max}가 각각 5.66%, -1.74% 및 0.00%로 모두 20% 범위 내에 있었다. 유의수준 α=0.05, 검출력=0.8에서 AUC_{0-30hr}, C_{max}의 최소 검출차를 계산한 결과 각각 8.44%, 18.36%로서 20% 범위 내에 있었으며 90% 신뢰한계는 각각 -10.60~-0.72%, -9.00~12.49%로 나타났다. T_{max}는 F 검정 시(α=0.05) 투여 약물간의 차이에 대한 유의성은 없었으며 검출력 시험 시 α=0.05에서 비심도(λ)는 1.75로서 시험약의 최소 검출차가 33.86%로 20% 범위를 벗어났으나 신뢰한계(90%)는 -19.81~19.81%로 ±20% 이내에 있었다.

시험약 카베딜롤 정과 대조약 딜라트렌 정의 각 파라미터에 대한 통계학적 분석 결과를 볼 때 생물학적 동등성 시험 판단 기준에 적합하였으며 두 제제간의 생물학적 동등성이 인정되었다.

결론

카베딜롤 25 mg 정제의 지원자에 대한 생체 이용률(bioavailability)을 비교하기 위하여 대조약(딜라트렌 정) 및 시험약(카베딜롤 정)을 각각 1정을 20명의 지원자에게 교차 투여한 후 카베딜롤의 혈장 농도를 HPLC/Fluorescence법을 이용하여 분석하여 얻어진 약물동태 파라미터를 통계 처리한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조약에 대한 시험약의 AUC_{0-30hr}의 차이는 5.66%, 최소 검출치는 8.44%이었고 C_{max} 역시 대조약에 대한 평균치의 차이가 -1.74%, 최소 검출치는 18.36%로서 모두 20% 이내이었다

2. T_{max}는 대조약에 대한 차이는 0%로 동일하게 나타났다으며 최소 검출치는 33.86%로 20%를 벗어났으나 신뢰한계는 -19.81%~19.81%로 ±20% 이내이었다.

3. 산출된 약물동태 파라미터로서 두제제의 $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, Cl/F , K_{α} , K_{12} , K_{21} 및 $V\beta/F$ 는 각각 유사한 값을 나타내 모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

따라서 대조약과 시험약을 경구투여 후 얻은 혈장농도로부터 생체 이용율을 비교한 결과 두 제제는 생물학적으로 동등한 것으로 판정되었다.

문 헌

- 1) Fishman, W. H. : Carvedilol. *NEJM* **339**, 1759 (1998).
- 2) Covington, T. R. : Drug Facts and Comparison. 52nd ed., St. Louis, Missouri, Facts and Comparisons (1998).
- 3) Bristow, M. R. : Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am. J. Cardiol.* **71**, 12C (1993).
- 4) Oravcova, J., Sojkova, D. and Lindner, W.: Comparison of the Hummel-Dreyer method in HPLC and Capillary electrophoresis conditions for study of the interaction of (RS)-, (R)- and (S)-carvedilol with isolated plasma proteins. *J. Chromatogr. B* **682**, 349 (1996).
- 5) Gehr, T. W. B., Tenero, D. M., Boyle, D. A., Qian, Y., Sica, D. A. and Shusterman, N. H. : The pharmacokinetics of carvedilol and its metabolites after single and multiple dose oral administration in patients with hypertension and renal insufficiency. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 269 (1999).
- 6) Varin, F., Cubeddu, X. L. and Powell J. R. : Liquid chromatographic assay and disposition of carvedilol in healthy volunteers. *J. Pharm. Sci.* **75**(12), 1195 (1986).
- 7) Guidelines for Biopharmaceutical Studies in Man. APHA Academy of Pharmaceutical Science. **17** (1972).
- 8) 식품 의약품 안전청 고시 제98-86호. 생물학적 동등성 시험 기준, 8. 26 (1998).
- 9) Reiff, K. : HPLC method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids. *J. Chromatogr.* **413**, 355 (1987).
- 10) Hokama, N., Hobara, N., Kameyal, H., Ohshiro, S. and Sakanshi, M. : HPLC method for the determination of carvedilol and its demethyl metabolite in body fluids. *J. Chromatogr. B* **732**, 233 (1999).
- 11) Shargel, L. and Yu, A. B. C. : Applied pharmaceutics and pharmacokinetics. 4th Ed., p67 (1999).