

역상 고속액체크로마토그래프법을 이용한 혈장 및 뇨 중 로바스타틴의 정량

최혜진* · 김명민** · 최경업***

삼성서울병원 약제부*, 삼성생명과학연구소 임상약리학연구실**

(Received April 8, 1998)

Quantitative Analysis of Lovastatin in Human Plasma and Urine by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography

Hye Jin Choi*, Myoung Min Kim** and Kyung Eob Choi***

*Division of Pharmaceutical Services, Samsung Medical Center,

**Clinical Pharmacology Laboratory, Samsung Biomedical Research
Institute, Seoul 135-230, Korea

Abstract—Lovastatin (LOVA), a fungal metabolite isolated from cultures of *Aspergillus terreus*, is a competitive HMG-CoA reductase inhibitor used for the treatment of primary hypercholesterolemia, and has also been shown to suppress growth in a variety of non-glioma tumor cell lines. A sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet (UV) absorbance detection has been developed to quantitate LOVA in human plasma and urine samples using liquid-liquid extraction procedure. Baseline separation of LOVA and internal standard, simvastatin was achieved on a Novapak C₁₈ analytical column with a mobile phase containing 0.025M NaH₂PO₄: ACN (35:65, v/v%), adjusted pH to 4.5. The flow rate was set at 1.5 ml/min, and the column effluent was monitored by a UV detection at 238 nm. The limit of quantification was determined to be 0.5 µg/ml while extraction efficiency of LOVA ranged from 73.4~82.9% at LOVA concentrations of 0.5 to 10 µg/ml. Good linearity with correlation coefficients greater than 0.999 was obtained in the range of LOVA concentrations from 0.5 to 10 µg/ml. The accuracy and the precision were proven excellent with relative standard deviation (RSD, %) and relative error (RE, %) of less than 4.2 and 4.0, respectively. Intraday precision, evaluated at five LOVA concentrations (0.5, 1, 2, 5, 10 µg/ml) and expressed as RSD ranged from 0~1.82% while the interday precision at the same concentrations ranged from 0.7~10.5%. The analytical method described was then successfully employed for the determination of LOVA concentrations in plasma samples obtained during a phase II clinical trial using high doses of LOVA (30~40 mg/kg/day). This method could be further utilized for the ongoing pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring of the high-dose LOVA therapy in adenocarcinoma patients.

Keywords □ Lovastatin, high-dose therapy, HPLC, human plasma, urine samples.

로바스타틴은 *Aspergillus terreus* 균주의 배양액으로부터 분리된 비활성형 락톤(Fig. 1)으로 화학식은(1S-[1α(R)*, 3α, 7β, 8β(2S*), 4S*]-8αβ)]-2 Methylbutanoic acid 1,2,3,7,8,8α-hexahydro-3,7-dime-

thyl-8-[2-(tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)ethyl]-1-naphthalenyl ester이다.

로바스타틴은 prodrug으로서 경구투여 후 즉시 가수분해 되어 로바스타틴의 주 대사산물인 β-hydroxy acid 형태의 로바스타틴 산(Fig. 1)으로 변환된다. 로바스타틴 산은 로바스타틴의 활성화된 물질로서 콜레스테롤 생합성의 초기 율속단계 과정을 촉매하는 효소,

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3410-3360 (팩스) 02-3410-3399

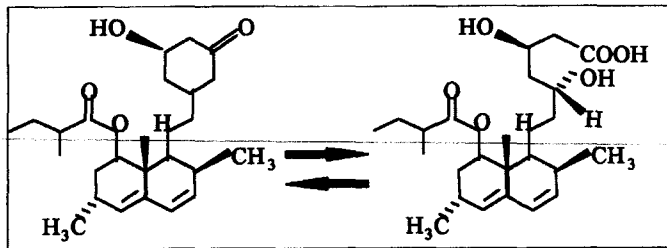


Fig. 1 — Structural formula of lovastatin and its active metabolite, lovastatin acid, showing the inactive prodrug in the lactone form (left) and the active inhibitor in the hydroxyacid form (right).

HMG-CoA reductase를 저해하여 혈청 콜레스테롤치를 저하시키는 작용을 한다.

로바스타틴의 약동학적 성상을 살펴보면, 경구투여 시 30% 정도만 흡수되고, 혈장 단백 결합율은 95% 이상으로 나타난다. 동물실험에서 로바스타틴이 뇌관문과 태반을 통과한다고 증명되었다. 대사는 주로 간에서 이루어지며, 로바스타틴 산과 최소 9개의 다른 대사물질들이 발견되었다. 로바스타틴은 주로 담즙을 통해 배설되며, 경구투여 72시간 후 분변으로 83%, 뇨중으로 10%가 배설된다.¹⁾

로바스타틴은 Jakobisiak *et al.* (1991)²⁾과 Keyomarsi *et al.* (1991)³⁾에 의해 다양한 종양세포와 정상적인 포유 세포주의 DNA 합성을 억제한다고 밝혀졌다. 마우스에 로바스타틴 5 mg/kg/hr을 7일동안 주입하였을 경우 신경아세포종 세포주인 C1300-N2A의 성장을 억제⁴⁾하였다. 이와같이, 항암효과가 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 밝혀졌으나, 그 작용기전에 대해서는 아직까지 확실하게 알려지지 않았다. 일반적으로 로바스타틴이 종양세포 성장에 관여하는 다양한 중간물질(e.g., isoprenylated protein)과 최종산물의 생성을 억제함으로써 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다.

최근 Myers 등이 암환자를 대상으로 제 1상 임상시험을 실시한 결과, 로바스타틴을 고용량인 35 mg/kg/day로 투여하였을 때 항암효과를 관찰할 수 있었다(not published). 로바스타틴의 주 활성대사체는 로바스타틴 산이며, 다른 대사물질의 활성에 대해서는 아직까지 알려지지 않았다.⁵⁾ 상용량(20 mg, qd)에서의 로바스타틴의 약동학적 특성에 대한 연구가 많이 실시되지 않았으며, 현재까지 로바스타틴의 혈장 농도 측정은 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 방법보다는 HMG-CoA reductase의 저해활동을 측정하는 방법을 주로 사용하였다.^{1, 5-8)} 효

소활성을 측정하여 농도를 구하는 방법은 비특이적이라는 단점이 있고, 기존 HPLC 분석법⁹⁾은 샘플 전처리 과정이 복잡하다는 단점이 있다. 본 연구실에서는 비교적 신속하고 간단한 HPLC 분석법을 개발하여 고용량 로바스타틴 치료를 받은 위암환자로부터 채취한 혈장 및 뇨중의 로바스타틴 정량에 적용하였다.

실험방법

시약 - 로바스타틴 표준품은 중외제약에서, 내부 표준물질로 사용된 심바스타틴 표준품은 한국 MSD에서 제공받았다. HPLC의 이동상 제조시 사용된 아세토니트릴(ACN)은 HPLC grade이었으며, 물은 Milli-Q 이온 교환 여과 시스템(Waters, MA, USA)으로 정제 및 탈이온화된 것을 사용하였다. 샘플 전처리 과정에서 주로 사용된 시약과 기타 시약은 모두 reagent grade 로써 Sigma Co. (MO, USA)에서 구입하였다.

기기 - 분석기기로는 Waters사(MA, USA)의 HPLC 시스템을 사용하였고, 이 시스템은 M717 Plus autosampler와 M510 펌프, 그리고 M486E Tunable UV 검출기로 구성되었다. 분석용 컬럼은 Novapak C₁₈ (150×3.9 mm, i.d., Waters)을 사용하였으며, guard 컬럼(insert용 역상 C₁₈, Vydac, CA, USA)을 분석용 컬럼 앞에 연결하여 사용하였다.

분석조건 - 이동상은 ACN과 0.025M NaH₂PO₄ (pH 4.5)를 65:35 (v/v%)의 조성으로 분석할때마다 제조하였으며, 필터 여과 및 초음파기로 공기를 제거한 후 사용하였다. 유속은 1.5 ml/min로 하였으며, 샘플은 100 μl씩 주입하였다. 컬럼온도는 실온으로 하였고, UV 238 nm에서 검출하였다.

로바스타틴 표준용액의 제조 - 로바스타틴 스톡 용액(1.0 mg/ml)은 ACN/0.01M 초산 혼합액(ACN 10

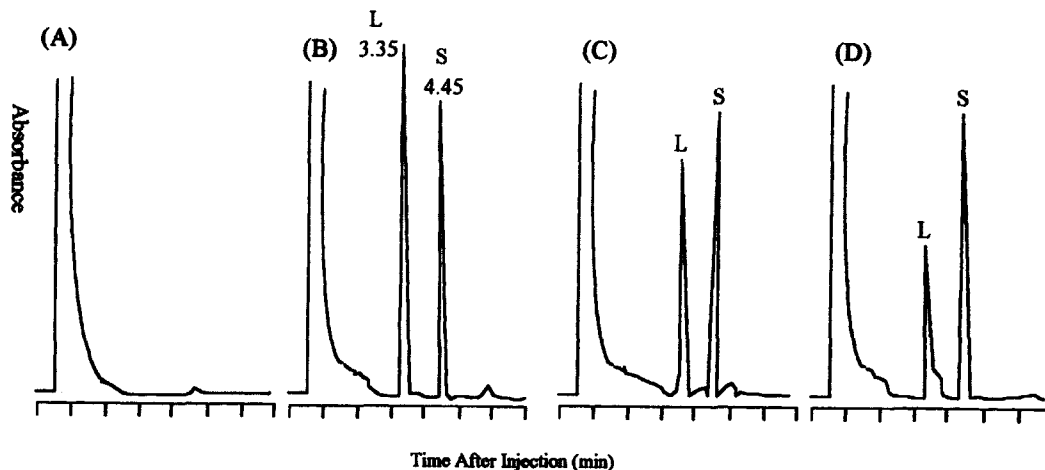


Fig. 2—Chromatograms of lovastatin (L) from plasma standards and samples after the last dose. (A) blank human plasma; (B) plasma standard spiked with 2 µg/ml of L and 10 µg/ml simvastatin (S); (C) plasma sample collected 2 hrs later after the last dose; (D) plasma sample collected 6 hrs later after the last dose.

ml에 6 µl의 빙초산을 가하여 제조)으로 제조하였다. 표준용액은 ACN : H₂O(80:20, v/v%)를 사용하여 10, 5, 2 및 1 µg/ml의 농도로 순차적으로 희석하여 제조하였다. 검량선은 Millennium[®] software program(Waters, MA, USA)의 Processing Method를 이용하여 구하였다.

심바스타틴 표준용액의 제조 - 로바스타틴과 같은 방법으로 제조한 내부 표준물질인 심바스타틴의 스톱용액(1.0 mg/ml)을 ACN으로 희석하여 10 µg/ml 농도로 만든 다음 사용하였다.

혈장 및 뇨중 로바스타틴 표준용액 spiking - 로바스타틴 스톱용액을 혈장 1 ml에 100 µl를 spiking한 후 이것을 이용하여 혈장에서 로바스타틴의 농도가 10, 5, 2, 1 및 0.5 µg/ml가 되도록 혈장을 사용하여 단계적으로 희석하여 사용하였다. 그리고, 또한 로바스타틴 스톱용액을 어떠한 약물도 사용하지 않은 사람에서 채취한 blank urine 1 ml에 100 µl를 spiking한 후 이것을 이용하여 뇨중 로바스타틴의 농도가 10, 5, 2, 1 및 0.5 µg/ml가 되도록 뇨를 사용하여 순차적으로 희석하여 사용하였다.

혈장 및 뇨 샘플 채취 - 고용량의 로바스타틴(30~40 mg/kg/day)을 처방에 따라 1일 4회로 7일동안 투여받은 위암환자 8명을 대상으로 혈액 및 뇨 샘플을 채취하였다. 혈액은 첫째날 첫 번째 용량을 투여하기 직전 및 투여 후 0.5, 1, 1.5, 2, 4 및 6시간까지 채취하였고, 뇨는 0~2시간 및 2~6시간간격으로 모아 각 시간간격

의 총 뇨량을 정확히 측정하고, 이 중 약 5 ml씩 분취하여 분석할때까지 -80°C에서 보관하였다. 제 7일째 마지막 용량을 투여한 다음 혈액은 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 12, 24, 48 시간후에 채취하였고, 뇨 샘플은 0~2, 2~6, 6~12, 12~24, 24~48시간간격으로 모아 각 시간간격의 총 뇨량을 정확히 측정한 후 이 중 약 5 ml씩 분취하여 분석할때까지 -80°C에서 보관하였다. 채취된 혈액은 바로 헤파린 처리된 시험관에 넣어 원심분리를 한 후 혈장만 분리하여 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 250 µl씩 소분한 후 분석할때까지 -80°C에서 보관하였다.

혈장 및 뇨 샘플의 전처리 - 분석직전 혈장과 뇨 샘플을 꺼내서 실온에서 서서히 녹인후, 다음과 같은 액상 추출법으로 전처리를 하였다.

샘플 250 µl씩 담긴 에펜도르프 튜브에 50 µl의 ACN/초산 0.01M 혼합액과 50 µl의 내부 표준용액(10 µg/ml)을 차례로 가한 후 진탕하였다. 여기에 100 µl의 10% sodium dodecylsulfate(SDS)를 가하여 재진탕하고, 또 다시 500 µl의 ACN/초산 0.01M을 취하여 각각의 튜브에 가한 후 진탕하였다. 이것을 8,500 rpm에서 15분동안 원심분리한 후, 상등액을 1.2 ml씩 취하여 시험관에 옮겼다. 각 시험관을 히트 블록에 장착하고 37°C에서 질소 가스를 가하면서 용매를 증발시킨 후, 건조된 각각의 샘플에 300 µl의 ACN : H₂O(20:80)/0.01M 초산 혼합액(2 ml의 ACN과 8 ml의 H₂O를 가한 후, 총 10 ml에 대하여 6 µl의 빙초산을 가하여 제조)을 가하여 재용해하였다.

Assay validation - 액상 샘플 처리방법의 추출 효율을 구하기 위하여 혈장에서 처리한 로바스타틴의 피이크 면적에 추출비율을 곱한 후 혈장이 없는 표준용액에서의 로바스타틴 피이크 면적으로 나누어 주었다.

검출력의 한계는 signal-to-noise 비를 3:1로 하여 구하였고, 검량선은 회귀분석을 적용하여 로바스타틴의 5가지 혈장 농도(0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) 범위에서의 상관계수 값(r)을 구하였다.

분석의 정밀도와 정확도를 평가하기 위하여 산출된 검량선에서 각각에 대응하는 농도의 상대적 표준편차(RSD, %)와 상대적 오차(RE, %)를 계산하였다. Inter-assay의 정밀도와 정확도는 3주동안의 기간에 5회 분석한 결과로 나타냈으며, intra-assay에서는 하루동안 12시간 간격으로 실시하였다.

샘플의 분리능(resolution, R_s)을 평가하고자 로바스타틴과 심바스타틴의 capacity factor(k')와 분리 계수(α)를 구하여 다음의 식에 대입하여 평가하였다.

$$R_s = 1.18 \times \Delta t / (W_1 + W_2)$$

Δt : difference in retention time between the two peaks

W_1, W_2 : peak width at half height

결과 및 고찰

로바스타틴과 심바스타틴의 HPLC상 유지시간(retention time)은 각각 3.35 분 및 4.45분이었고, 분리

능 R_s 은 4.77로 나타났다. 혈장과 로바스타틴을 spike한 혈장의 크로마토그램은 Fig. 2(A) 및 (B)에 나타내었다. k' 와 α 값이 적합한 기준($2 \leq k' \leq 6, \alpha > 1$)에 포함되도록 이동상의 비율을 조절하여 최종적으로 ACN : 0.025M NaH_2PO_4 (v/v%)의 비율이 65:35로 확립하였고, 이에 따른 k_{a1}' , k_{a2}' , 및 α 값은 각각 2.72, 3.94 및 1.45이었다.

크로마토그램 작성 및 피이크 면적법을 이용한 농도 계산은 모두 Waters사의 Millennium[®] software program을 이용하여 실시하였다. Fig. 2(C) 및 (D)에 나타난 혈장 샘플 크로마토그램은 7일 투여기간 중 마지막 약물을 투여한 후, 각각 2시간과 6시간 후에 나타난 것이며, 6시간 후에 나타난 로바스타틴 피이크에서는 쇼울더(shoulder)를 형성하고 있는 것을 볼 수 있었다. 이것은 로바스타틴의 대사물질로 사료된다. 샘플 채취 시간을 48시간까지 실시하여 분석해 본 결과, 대부분 환자의 샘플에서 로바스타틴이 6시간 이후에는 noise보다 낮게 나왔다. Fig. 3에 뇨 및 로바스타틴을 spike한 뇨 샘플의 피이크를 나타내고 있으나, 뇨 샘플에서 로바스타틴은 거의 검출되지 않았다. 로바스타틴의 주요 대사물질인 로바스타틴 산은 prodrug인 로바스타틴보다 큰 극성을 지님으로 현분석조건에서 로바스타틴 앞부분에 나타날 것으로 추측된다.

추출효율은 로바스타틴 0.5~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 73.4~82.9%로 나타났고, 평균 추출효율은 77.7%였다(Table I). 검출력의 한계는 signal-to-noise 비를 3:1로 하였을때 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 검량선은 로바

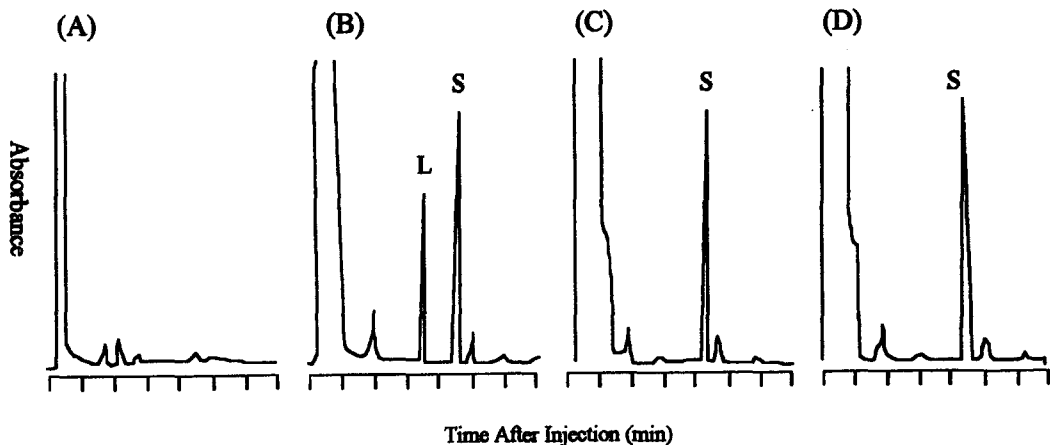


Fig. 3—Chromatograms from urine standards and samples after the last dose. (A) Blank urine; (B) urine standard spiked with 2 $\mu\text{g/ml}$; (C) urine sample collected during 0~2 hrs; (D) urine sample collected during 2~6 hrs.

Table I—Peak areas of lovastatin at 0.5, 1, 2, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the corresponding extraction ratios

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Peak Area ($\mu\text{V}^* \text{ sec}$)		Extraction Efficiency (%) (Plasma \times 300*/350) \times 100 Plasma Free STD
	Plasma	Plasma Free Standard (STD)	
0.5	67810	98536	82.9
0.1	130204	196918	79.7
2.0	254817	394554	77.8
5.0	606961	996212	73.4
10.0	1236297	1995872	74.6
Average			77.7

* Fraction in which 250 μl of the sample was used for the extraction and later reconstituted with 300 μl of the solvent and of which 100 μl was finally injected for the analysis.

Table II—Precision and accuracy of the method with human plasma standards

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Conc. Measured ($\mu\text{g}/\text{ml}$) \pm SD	RSD (%)	RE (%)
0.5	0.49 \pm 0.015	3.1	2.0
1.0	0.96 \pm 0.04	4.2	4.0
2.0	1.99 \pm 0.01	0.5	0.5
5.0	5.12 \pm 0.12	2.3	2.4
10.0	9.94 \pm 0.05	0.5	0.6

스타틴 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위에서 상관계수(r)가 0.9998인 직선성을 나타내었다($Y=4.66X+0.13$, X : 샘플 농도, Y : 피크 면적). 검량선의 정밀도와 정확도는 각각 Table II에 RSD(%), Relative Standard Deviation)와 RE(%), Relative Error)로 나타내었다.

분석의 inter 및 intraday variability 시험결과를

다음과 같이 Table III에 나타내었다. Table III-A에 의하면 interday의 정밀도는 0.7~10.5%의 RSD로 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서만 10% 정도로 나타내었을 뿐 기타 농도에서는 $\leq 4.0\%$ 차이를 보였다. 또한, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 제외하고는 $\leq 2.0\%$ 의 RE를 나타내어 분석의 정확성을 확증해주었다. 한편, intraday의 정밀도는 RSD가 모두 2%이하의 값을 보였다.

이상의 결과에 의하면, 로바스타틴을 상용량보다 80~100배 정도의 고용량(35 mg/kg/day)으로 투여하였음에도 불구하고 극히 미량(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만) 만이 검출된 것으로 보아, 대부분이 인체에 들어가자마자 활성 대사물질인 로바스타틴 산으로 대사된 것으로 추측된다. 이의 근거로는 6시간 이후의 혈장샘플에서 로바스타틴이 거의 검출되지 않은 것과, 혈장샘플 분석중에서 시

Table III—Inter/intraday precision and accuracy of the method with human plasma standards of lovastatin

A. 3-week period (Interday)

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Conc. Measured ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					Mean	SD	RSD (%)	RE (%)
	1회	2회	3회	4회	5회				
0.5	0.57	0.48	0.62	0.55	0.64	0.57	0.06	10.5	14.0
1.0	0.99	0.96	1.06	1.01	1.02	1.01	0.04	4.0	1.0
2.0	1.94	1.99	1.97	2.00	1.89	1.96	0.04	2.0	2.0
5.0	4.99	5.12	4.72	4.88	4.90	4.92	0.15	3.0	1.6
10.0	10.01	9.95	10.13	10.06	10.07	10.04	0.07	0.7	0.4

B. 12-hr period (Intraday)

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Conc. Measured ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Mean	SD	RSD (%)	RE (%)
	0 hr	12 hr later				
0.5	0.56	0.54	0.55	0.07	1.82	10.0
1.0	1.04	1.04	1.04	0.0	0.00	4.0
2.0	1.93	1.89	1.91	0.13	1.6	4.5
5.0	5.02	4.94	4.98	0.06	1.2	0.4
10.0	10.06	9.98	10.02	0.06	0.6	0.2

간이 지남에 따라 로바스타틴 피이크의 뒷부분에 쇼올더가 크게 나타난 것을 예로 들 수 있다(Fig. 2(D) 참조). 이번 연구에서는 이 대사물질로 추측되는 로바스타틴 산 분리 정량을 못하였지만 앞으로 로바스타틴과 그 대사체인 로바스타틴 산의 분리 정량법을 확립할 예정이다. 로바스타틴은 대부분 분변으로 배설되지만, 뇨 중으로도 10% 정도 배설되기 때문에, 뇨 중 로바스타틴 분석이 가능하리라 추측하였으나, Fig. 3(C)에서와 같이 2시간째에도 검출되지 않았다. 이것으로 보아 뇨로 배설되는 로바스타틴의 형태는 활성 대사물질인 것으로 사료된다.

지금까지의 로바스타틴 분석이 비특이적인 효소 정량법으로 이루어져 활성대사물질까지 동시에 분석되어 약동학적 특성을 나타내는데 있어 오류가 발생될 수 있었고, 기존의 HPLC 분석법⁹⁾에서 사용된 고형상 추출법(solid phase extraction)은 고가인 반면, 본 연구에서 개발된 HPLC 분석법은 다량의 혈장 샘플을 비교적 신속하고 정확하게 분석할 수 있으면서도 경제적으로 저렴한 편이다. 본 연구에서의 검출한계농도는 기존의 방법보다 우수하지 못했으나, 로바스타틴을 고용량으로 투여한 후 채취한 샘플에 적용하였기에 검출한계농도가 그다지 중요하지 않았다고 사료된다. 본 분석법의 재현성은 기존의 것과 거의 동일하거나 우수하였다.

결 론

혈장 중 로바스타틴 농도 측정을 위해 HPLC 방법을 도입하여 정확하면서도 액상 추출법을 이용한 비교적 간편화된 분석법으로 확립하였다. 본 분석법의 특징은 다음과 같이 정리할 수 있다.

1. 분석용 칼럼은 Novapak C₁₈을 사용하였고, 이동상은 ACN과 0.025M NaH₂PO₄(pH 4.5)를 65:35(v/v)의 비율로 하여 유속 1.5 ml/min 및 UV 238 nm에서 검출하였다.
2. 혈장샘플 전처리방법으로 액상추출법을 사용하여 다량의 샘플을 경제적으로 분석할 수 있었다.
3. $k_1' = 2.72$, $k_2' = 3.94$, $\alpha = 1.45$, $R_s = 4.77$ 로 산출되었으며, 로바스타틴은 3.35분, 심바스타틴은 4.45분에 각각 검출되었다.
4. 평균 추출효율은 로바스타틴 0.5~10 µg/ml 농도 범위에서 77.7%로 나타났으며, 검출력의 한계는 signal-to-noise비를 3:1로 하였을 때 0.5 µg/ml이었다.

5. Interday 및 intraday의 정밀도는 로바스타틴 0.5~10 µg/ml 농도 범위에서 각각 10.5% 및 1.82% 이하로 나타났다.

이와같은 신속하고 정확한 분석법은 임상연구에 적합하게 적용될 수 있어 향후 암치료를 위한 로바스타틴 고용량 투여후의 약동학적 연구에 필수적인 요소가 되리라고 본다. 또한, 본 HPLC 방법은 활성물질인 로바스타틴 산(Lovastatin acid) 분석법 확립에 있어서 기초를 제공하여 본 연구실에서 현재 개발단계에 있다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 로바스타틴과 심바스타틴 표준물질은 각각 중외제약(주)과 한국엠에스디(주)로부터 공급받았고, 환자샘플은 삼성의료원 혈액종양내과에 의해 제공되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Henwood, J. M. and Heel, R. C. : Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* **36**, 429 (1988).
- 2) Jakobisiak, M., Bruno, S., Skierski, J. S. and Darzynkiewicz, Z. : Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3628 (1991).
- 3) Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V., Pardee, A. B. : Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*, **51**, 3602 (1991).
- 4) Maltese, W. A., Defendini, R., Green, R. A., Sheridan, K. M. and Donley, D. K. : Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mev-inolin, a competitive inhibitor of hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Clin. Invest.* **76**, 1748 (1985).
- 5) Pan, H. Y., Devault, A. R., Wang-Iverson, D., Ivashkiv E., Swanson, B. N. and Sugerma, A. A. : Comparative pharmacokinetics of pravastatin and lovastatin. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 1128 (1990).
- 6) McKenney, J. M. : Lovastatin: A new cholesterol-lowering agent. *Clin Pharm.* **7**, 21 (1988).

- 7) Krukemyer, J. J. and Talbert, R. L. : Lovastatin : A new cholesterol-lowering agent. *Pharmacotherapy* **7**, 198 (1987).
- 8) Merck Sharp and Dohme : Mevacor[®] package insert, in Physician's Desk Reference. Oradell, N. J., *Medical Economics Co., Inc.* 1412 (1990).
- 9) Stubbs, R. J., Schwartz, M. and Bayne, W. F. : Determination of mevinolin and mevinolinic acid in plasma and bile by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **383**, 438 (1986).
- 10) Sebt, S. M., Tkalcevic, G. T. and Jani, J. P. : Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Commun.* **3**, 141, (1991).
- 11) Vincent, T. S., Wulfert, E. and Merler, E. : Inhibition of growth factor signaling pathways by lovastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1284 (1991).
- 12) Pentikainen, P. J., Saraheimo, M., Schwartz, J. I., Amin, R. D., Schwartz, M. S., Brunner-Ferber, F. and Rogers, J. D. : Comparative Pharmacokinetics of lovastatin, simvastatin and pravastatin in Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **32**, 136 (1992).
- 13) Carlucci, G., Mazzeo, P., Bior, L. and Bologna, M. : Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 693 (1992).
- 14) Vyas, K. P., Kari, P. H., Pitzenberger, S. M., Halpin, R. A., Ramjit, H. G., Arision, B., Murphy, J. S., Hoffman, W. F., Schwartz, M. S., Ulm, E. H. and Duggan, D. E. : Biotransformation of lovastatin: I. Structure elucidation of *in vivo* metabolites in the rat and mouse. *Drug Metab. Dispos.* **18**, 203 (1990).
- 15) Vyas, K. P., Kari, P. H., Prakash, S. R. and Duggan, D. E. : Biotransformation of lovastatin: II. *In vitro* metabolism by rat and mouse liver microsomes and involvement of cytochrome P-450 in dehydrogenation of lovastatin. *Drug Metab. and Dispos.* **18**, 218 (1990).
- 16) Wejde, J., Carlberg, M., Hjertman, M. and Larsson, O. : Isoprenoid regulation of cell growth: Identification of mevalonate-labelled compounds inducing DNA synthesis in human breast cancer cells depleted of serum and mevalonate. *J. Cell. Physiol.* **155**, 539 (1993).
- 17) Snyder, L. R., Kirkland J. J. and Glajch, L. G. : *Practical HPLC Method Development* 2nd ed., John Wiley & sons Inc., New York, p. 22 (1997).