

# Identifikacija monakolina i citrinina u crvenoj fermentiranoj riži primjenom LC/MS/MS tehnike

ANA MORNAR, BILJANA NIGOVIĆ, MIRANDA SERTIĆ

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

## Identification of monacolins and citrinin in red fermented rice by LC/MS/MS technique

*Abstract* – Red fermented rice, also known as red yeast rice, Hongqu, Anka or red Koji, is the fermented product of rice on which red yeast (*Monascus purpureus*) has been grown. For a thousand of years it has been used in China to make rice wine, as a food preservative for maintaining the color and taste of fish or meat and as a traditional medicine for digestive and vascular function. A complete and detailed description of its manufacture and medicinal properties are found in the ancient Chinese pharmacopoeia, published during the Ming Dynasty (1368–1644 a.d.). Over the past decade, there has been increased scientific interest in red yeast rice, as an alternative therapy for hypercholesterolemia. Many studies have demonstrated that red yeast rice may be especially useful for treating patients who refuse to take statin drugs because of philosophical reasons or patients who are unable to tolerate statin therapy due to statin-associated myalgias. The major components found in red yeast rice, known as monacolins (polyketides), are reported to exhibit a cholesterol lowering action by inhibiting the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. Still, it is believed that the hypolipidemic effect of red yeast rice cannot be accounted for only by the monacolins, but by a synergy of all other components present in red yeast rice: plant sterols, isoflavones and isoflavone glycosides, selenium and zinc.

The most important toxic component in red fermented rice is citrinin, a mycotoxin produced by red yeast (*Monascus purpureus*). It has been known to cause kidney and liver damage in humans. Therefore, Japan has issued an advisory limit of 200 ppb while the European Union has a recommended limit of 100 ppb.

*The aim of our work was to develop a new LC/MS/MS method for identification of active components, monacolin K (lovastatin) and monacolin K acid and toxic component, citrinin, present in red yeast rice capsules.*

*(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia)*

## UVOD

Crvena fermentirana riža, također poznata kao Hongqu, Angkak ili Koji riža, dobiva se fermentacijom bijele riže pomoću plijesni *Monascus Purpureus* (slika 1.). Prva upotreba crvene fermentirane riže u prehrani kao dodatka jelima za poboljšanje okusa i boje zabilježena je u dinastiji Zhou (770.–221. godine pr. n. e.). U tradicionalnoj kineskoj medicini upotrebljava se za liječenje bolesti srca i krvnih žila te pri lošoj probavi i proljevu. Štoviše, postupak proizvodnje crvene fermentirane riže te njena medicinska svojstva detaljno su opisana u drevnoj Kineskoj farmakopeji još u vrijeme dinastije Ming (1368.–1644. godine). Pod nazivom Zhitai ili Xuezhikang, alkoholni ekstrakt crvene fermentirane riže uvršten je u tradicionalne kineske spise o ljekovitim tvarima kao preparat za poboljšanje cirkulacije (1). Osim u Kini i Japanu, nizozemski su istraživači zabilježili upotrebu crvene fermentirane riže u stanovništvu Jave 1884. godine. Tek nakon drugoga svjetskog rata doseljenici iz Azije počeli su širiti njenu upotrebu među stanovništvom Sjedinjenih Američkih Država (2).

Farmakološka aktivnost crvene fermentirane riže zasniva se na njenom bogatom sastavu. Uz zasićene i nezasićene masne kiseline, proteine, aminokiseline, škrob, fitosterole ( $\beta$ -sitosterol, kampesterol, stigmasterol i sapogenin), izoflavonoide, vlakna, elemente u tragovima i niacin, crvena fermentirana riža bogata je spojevima iz skupine monakolina koji nastaju tijekom postupka fermentacije bijele riže (3). Prvi spoj iz navedene skupine, monacolin K, izolirao je Endo 1979. u Japanu, no, iste godine u Sjedinjenim Američkim Državama iz plijesni *Aspergillus terreus* Hoffman i suradnici



Slika 1. Crvena fermentirana riža

izolirali su i spoj mevinolin, danas poznat pod nazivom lovastatin (4). Vrlo brzo je otkriveno da su monakolin K i mevinolin isti spojevi. Nedugo nakon otkrića monakolina K iz crvene fermentirane riže izolirani su i ostali monakolini. Godine 1985. izolirani su monakolin J i L te potom dihidromonakolin L i monakolin X. Monacolin M izoliran je još 1976., ali iz plijesni *Monascus ruber*, dok je monakolin L izoliran iz *Aspergillus terreus*. Sada je poznato 14 spojeva iz skupine monakolina. Svi dosada poznati monakolini su sekundarni metaboliti, poliketidi, nastali tijekom postupka fermentacije riže, stoga su međusobno strukturno slični (5–8). Nadalje, brojna su istraživanja potvrdila da crvena fermentirana riža, odnosno gore opisani monakolini uspješno snižavaju koncentraciju kako kolesterola tako i triglicerida prisutnih u krvi pacijenata oboljelih od hiperkolesterolemije. Važno je istaknuti da se mehanizam snižavanja koncentracije kolesterola u krvi monakolinima zasniva na inhibiciji enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze, odnosno inhibiciji sinteze kolesterola potpuno istim mehanizmom kao i komercijalno dostupni statini poput lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina i rosuvastatina (9–11). No, kliničke su studije pokazale da 10 mg monakolina prisutnih u dnevnoj dozi crvene fermentirane riže (2,4 g) ima isti hipolipemički učinak kao i značajno veće doze lovastatina (od 10 do 40 mg) (12, 13). Takav snažan hipolipemički učinak crvene fermentirane riže moguće je objasniti prisustvom ne samo monakolina već i niza drugih sastavnica poput navedenih biljnih sterola, izoflavonoida i njihovih glikozida te elemenata u tragovima poput selena i cinka. Dakle, hipolipemički učinak crvene fermentirane riže zasniva se na više mehanizama. Uz već spomenutu inhibiciju enzima HMG-CoA reduktaze, uključeni su i ostali mehanizmi poput inhibicije apsorpcije egzogenog kolesterola te povećanje klirensa kolesteola iz sistemske cirkulacije (3).

U literaturi se često ističe da primjena crvene fermentirane riže ne uzrokuje značajnije neželjene popratne pojave, osim glavobolje te gastrointestinalnih tegoba. Ipak, potrebno je istaknuti da su u pojedinim pacijenata zabilježene i neželjene popratne pojave slične onima koje izazivaju statini, poput miopatije, rabdomiolize te hepatotoksičnosti. S obzirom da su monakolini strukturno slični statinima, štoviše najzastupljeniji monakolin, monakolin K, ima potpuno istu strukturu kao i lovastatin, bilo je i za pretpostaviti da primjena crvene fermentirane riže može, ipak, u nekih pacijenata u manjoj mjeri uzrokovati ozbiljnije neželjene popratne pojave slične nuspojavama statina (2).

Premda su medicinska svojstva crvene fermentirane riže u Aziji poznata već stotinama godina, tek kasnih devedesetih godina 20-tog stoljeća započeta je njena primjena u Sjedinjenim Američkim Državama kao dodatka prehrani radi snižavanja koncentracije kolesterola u krvi. No, 2001. Američka agencija za lijekove i hranu (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) zabranila je prodaju bilo kakvog dodatka prehrani koji sadrži crvenu fermentiranu rižu. Svoju odluku temeljili su na dokumentu iz 1994. DSHEA (engl. *Dietary Supplement Health and Education Act*) u kojem je

naznačeno da dijetetski proizvodi ne smiju sadržavati sastavnice koje su već odobrene kao lijek, osim ako nisu bile komercijalno dostupne prije odobrenja toga lijeka. Stoga su svi dijetetski proizvodi koji sadrže crvenu fermentiranu rižu, na kojima je označeno da sadrže više od 0,4 % monakolina, povučeni s tržišta u SAD-u (3, 14). Ipak, od 2003., dijetetski proizvodi koji sadrže crvenu fermentiranu rižu ponovo se polako vraćaju na tržište te se danas nalaze i u kombiniranim pripravcima s omega-3 masnim kiselinama i koenzimom Q10 kao i u pripravcima dodatno obogaćenim fitosterolima. Crvenu fermentiranu rižu moguće je nabaviti i otopljenu u voćnim sokovima bogatim biljnim vlaknima, fruktoooligosaharidima kratkih lanaca, koji pridonose smanjenju apsorpcije masnoća i šećera unesenih prehranom (15). Proizvođači često na tim proizvodima ne navode da li njihovi dijetetski pripravci sadrže monakoline i u kojoj količini te mogu li imati utjecaj na koncentraciju kolesterola u krvi.

Sigurnu upotrebu crvene fermentirane riže kao dijetetskog proizvoda dodatno otežava i činjenica da neke *Monascus* vrste proizvode značajne količine nefrotoksičnog mikotoksina citrinina, dosada nađenog uglavnom u *Aspergillus* i *Penicillium* vrstama. U Japanu je dozvoljena količina citrinina 200 ng/g crvene fermentirane riže, dok je u Europi dozvoljena količina značajno niža 100 ng/g. Istraživanja provedena u SAD-u i Kini potvrdila su prisutnost citrinina u gotovo pola ispitanih komercijalno dostupnih dijetetskih proizvoda (16–19). Štoviše, u pojedinim proizvodima nađene su koncentracije citrinina značajno veće od maksimalno dozvoljenih u Europi i Japanu.

Sve navedeno potaknulo je liječnike i farmaceute na razmišljanje da li preporučiti dijetetske proizvode koji sadrže crvenu fermentiranu rižu pacijentima oboljelim od hiperkolesterolemije. Većina se istraživača slaže da bi proizvodi od crvene fermentirane riže mogli biti izvrsni dijetetski preparati za snižavanje koncentracije kolesterola i triglicerida u krvi namijenjeni pacijentima koji više vole liječenje prirodnim proizvodima te pacijentima koji ne žele ili zbog izraženih neželjenih popratnih pojava ne smiju uzimati statine (1, 9, 12). No, proizvođači dijetetskih proizvoda koji sadrže crvenu fermentiranu rižu trebali bi provesti standardizaciju pripravaka s obzirom na sastav svih prisutnih farmakološki aktivnih tvari, posebice monakolina. Razlike između pojedinih proizvodnih serija trebale bi biti što manje. Proizvođači moraju jamčiti i sigurnost i zdravstvenu ispravnost svojih proizvoda te bi trebali sustavno provjeravati prisutnost ne samo citrinina, nego i drugih mikotoksina kao i ostalih štetnih tvari poput pesticida. Nadalje, opsežnije kliničke studije kojima bi se ispitala farmakološka aktivnost kao i toksičnost ne samo monakolina već i drugih sastavnica od esencijalne je važnosti. Potrebno je istaknuti da su informacije o interakcijama sastavnica crvene fermentirane riže s lijekovima kao i hranom nedostatne.

Cilj ovog rada je predložiti novu analitičku metodu za potvrdu identiteta farmakološki aktivnog monakolina K (lovastatina), najzastupljenijeg monakolina te mikotoksina citrinina u kapsulama crvene fermentirane riže primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije.

## Metode

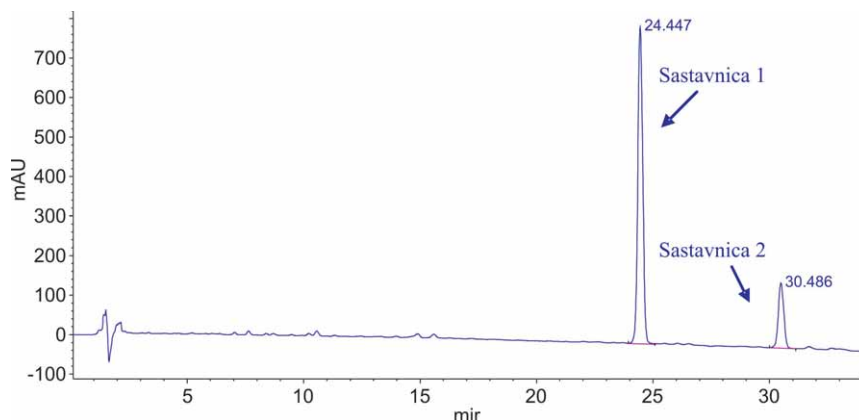
### Priprema uzoraka

Za ispitivanje prisutnosti monakolina i citrinina u kapsulama crvene fermentirane riže upotrijebljen je dijetetski proizvod komercijalno dostupan u javnim ljekarnama u Republici Hrvatskoj. Na deklaraciji je proizvoda naznačeno da se u jednoj kapsuli od 500 mg nalazi 1,5 % monakolina.

Sadržaj iz 10 kapsula je pomiješan i 0,5 g sadržaja preneseno je u odmjernu tikvicu od 20,0 mL te otopljen u 15 mL 70 % etanola, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka). Ekstrakcija analita iz uzorka provedena je na ultrazvučnoj kupelji (Elma, Singen, Njemačka) 60 minuta pri 30 °C. Nakon ekstrakcije, otopina je nadopunjena do oznake istim otapalom te centrifugirana 10 minuta na 25 °C pri 3000 rpm (Thermo Electron Industries, Saint Herblain, Francuska). Otopina je ostavljena stajati 30 minuta na sobnoj temperaturi te je filtrirana kroz 0,45 µm injekcijski filter (Chromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

### Analiza uzoraka primjenom LC/MS/MS

Tekućinska kromatografija provedena je na instrumentu Agilent 1100 koristeći obrnuto-faznu kolonu Symmetry C18, dimenzija 150 mm × 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Za identifikaciju monakolina i citrinina primjenjena je binarna gradijentna metoda čija se tekuća faza sastojala od 0,1 % otopine mravlje kiseline (otapalo A) i acetonitrila (otapalo B). Udio otapala B mijenjao se linearno u rasponu od 30 do 70 % tijekom 35 minuta. Volumen injektiranja je bio 5 µL. Protok pokretne faze podešen je na 1 mL/min, a temperatura kolone je održavana na 25 °C. Tijekom analize uzorci su čuvani na temperaturi od 4 °C u autoinjektoru. Optimalna valna duljina UV/Vis detektora je podešena s obzirom na maksimalnu apsorpciju ispitivanih spojeva u UV spektru ( $\lambda = 237$  i 321 nm). Dio pokretne faze eluirane s tekućinskog kromatografa doveden je do masenog spektrometra.



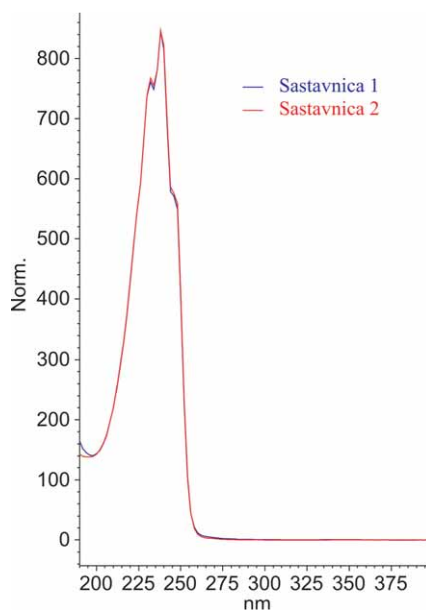
Slika 2. Kromatogram ispitivanog uzorka crvene fermentirane riže ( $\lambda = 237$  nm)

Masena spektrometrija provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series Ion Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Ionizacija ispitivanih spojeva provedena je primjenom elektrosprej ionizacije u pozitivnom modu. Dušik je korišten kao plin za sušenje i raspršivanje pokretne faze te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovom protoku od 5,0 L/min te tlaku 15,0 psi. Temperatura izvora podešena je na 350 °C dok je napon na kapilari iznosio 3,5 kV. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10.000, a zadržavani su do 200 ms. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od  $m/z$  100–500. Tlak plina helija bio je  $6 \times 10^{-6}$  mbar.

## Rezultati i rasprava

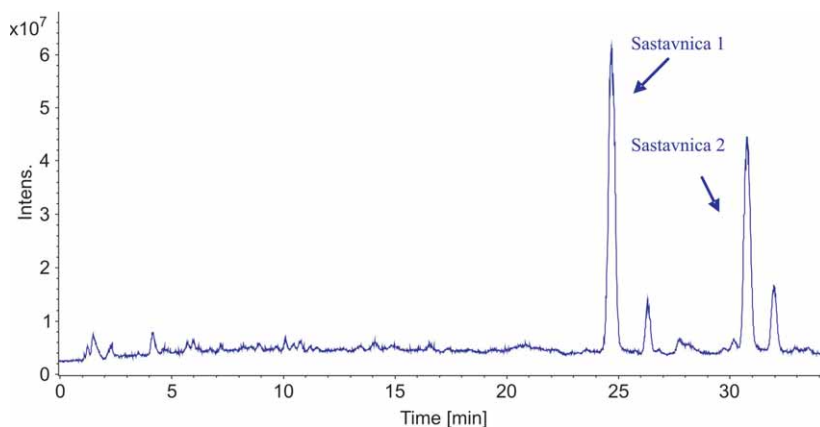
Identifikacija aktivnih i toksičnih sastavnica u kapsulama crvene fermentirane riže provedena je primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. LC/MS/MS tehnika izabrana je u tu svrhu budući da je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti izvrsna tehnika za razdvajanje sastavnica iz složene smjese, dok je masenom spektroskopijom moguće potvrditi prisutnost spojeva za koje su izolacija i pročišćavanje iznimno zahtjevni, za koje ne postoje komercijalno dostupni standardi te je moguće i razjasniti strukturu novo otkrivenih spojeva (20).

Crvena fermentirana riža izrazito je složen uzorak, stoga je bilo potrebno prvo ekstrahirati analite iz uzorka primjenom 70 % alkohola. Nadalje, provedena je optimizacija uvjeta za njihovo razdvajanje primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Preliminarna istraživanja su pokazala da se pri odabranim uvjetima postiže razdvajanje zastupljenijih sastavnica uz prihvatljivo vrijeme analize. Na slici 2. prikazan je kromatogram ispitivanog uzorka crvene fermentirane riže. Na kromatogramu je vidljivo da su u uzorku prisutne dvije glavne sastavnice, čija vremena zadržavanja iznose 24,45 (Sastavnica 1) i 30,49 min (Sastavnica 2). Identifikacija glavnih sastavnica crvene fermentirane riže provedena je primjenom dvaju detektora: UV/Vis (engl. *Diode Array Detector*, DAD) detektora te masene spektrometrije (engl. *Mass Spectrometry*, MS). Na slici 3. prikazani su UV spektri dviju glavnih sastavnica. Prema izgledu oba spektra može se zaključiti da se radi o kemijski sličnim sastavnicama, dok



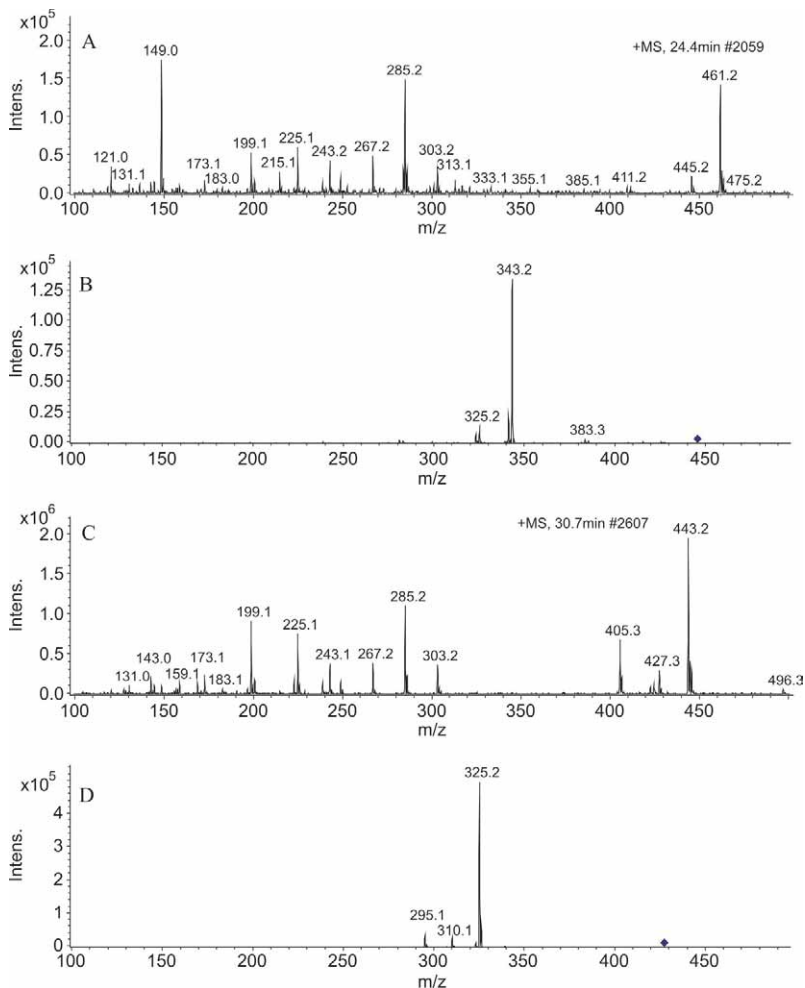
Slika 3. UV spektri glavnih sastavnica crvene fermentirane riže

njihov izgled (trozubi vrh s maksimumom apsorpcije na valnoj duljini 237 nm) upućuje na mogućnost da dvije glavne sastavnice pripadaju spojevima iz skupine monakolina. Da bi se mogla provesti bolja strukturna karakterizacija sastavnica crvene fermentirane riže, provedena je analiza primjenom masene spektrometrije. Na slici 4. prikazan je kromatogram dobiven praćenjem protoka ukupnih iona (engl. *Total Ion*



**Slika 4.** TIC kromatogram ispitivanog uzorka crvene fermentirane riže

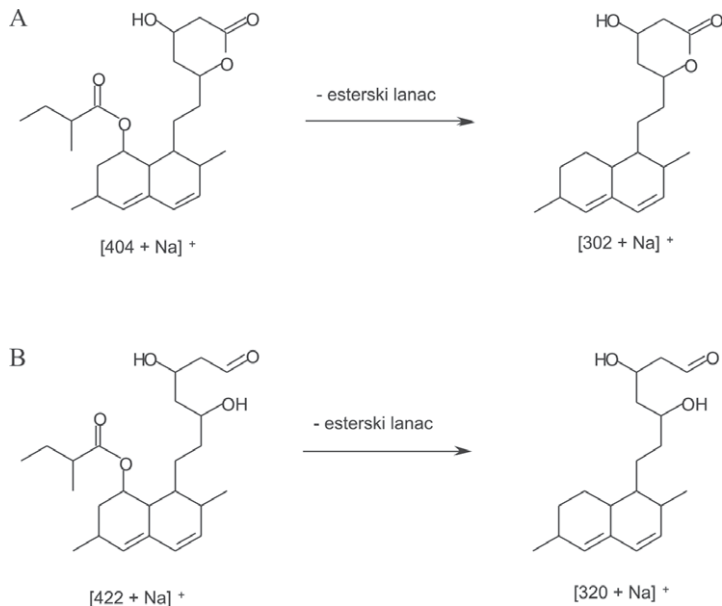
*Current*, TIC) masenim spektrometrom. Nadalje, na slici 5. prikazani su MS te MS2 spektri dviju glavnih sastavnica ispitivanog uzorka. Na MS spektru Sastavnice 1 moguće je uočiti glavne ione pri  $m/z$  445 te 461, dok na spektru Sastavnice 2 ione pri  $m/z$  405, 427 i 443. Budući da je monakolin K najzastupljeniji spoj iz skupine monakolina, naša su se istraživanja usmjerila prvenstveno u smjeru utvrđivanja njegova prisustva. S obzirom na izgled UV spektra te iona nađenih u MS spektru moguće je pretpostaviti da je Sastavnica 2, monakolin K. Ion pri  $m/z$  405 predstavlja molekulski ion monakolina K,  $(M + H)^+$ , dok ioni pri  $m/z$  427 i 443 predstavljaju njegove adukture s ionom natrija,  $(M + Na)^+$ , odnosno kalija,  $(M + K)^+$ . No, za detaljniju strukturnu karakterizaciju bilo je potrebno snimiti i MS2 spektar Sastavnice 2. Fragmentacijom iona pri  $m/z$  427 dobiven je jednostavan, ali vrlo informativan MS2 spektar sa samo jednim glavnim fragmentnim ionom ( $m/z$  325). Dobiveni MS2 spektar upućuje na mogućnost da je dobiveni fragmentni ion mogao nastati nakon gubitka esterskog lanca s molekule monakolina K. Nadalje, cilj rada bio je razjasniti strukturu i Sastavnice 1. Budući da je vrijeme zadržavanja Sastavnice 1 bilo kraće od Sastavnice 2, zaključeno je da je Sastavnica 1 hidrofilniji spoj od identificiranog monakolina K. Monakolini se u crvenoj fermentiranoj riži javljaju u obliku laktone i kiseline. Monakolin K u obliku kiseline je značajno hidrofilniji od laktonskog oblika ( $\log P$  vrijednost monakolina K izračunata ALOGPs 2,1 programom iznosi 3,99, dok monakolina K u obliku kiseline iznosi 2,85) (21). Stoga je bilo moguće očekivati da je Sastavnica 1 monakolin K u



**Slika 5.** MS spektar Sastavnice 1 (a), MS2 spektar Sastavnice 1 (b), MS spektar Sastavnice 2 (c), MS2 spektar Sastavnice 2 (d)

obliku kiseline. Kao što je već navedeno UV spektar Sastavnice 1 odgovara spoju iz skupine monakolina. Nadalje, na MS spektru Sastavnice 1 uočeni su ioni pri  $m/z$  445 te 461 koji bi mogli predstavljati aduktove molekuskog iona monakolina K u obliku kiseline s ionom natrija,  $(M + Na)^+$ , odnosno kalija,  $(M + K)^+$ . Ipak, za detaljniju strukturnu karakterizaciju bilo je potrebno snimiti i MS2 spektar Sastavnice 1. Fragmentacijom iona pri  $m/z$  445 također je dobiven jednostavan MS2 spektar sa samo jednim glavnim fragmentnim ionom ( $m/z$  343). Kao i u slučaju monakolina K, dobiveni MS2 spektar upućuje na mogućnost da je fragmentni ion mogao nastati nakon gubitka esterskog lanca s molekule monakolina K u obliku kiseline. Na slici 6. prikazan je predloženi fragmentacijski put monakolina K te monakolin K kiseline (22).





**Slika 6.** Fragmentacijski put (a) monakolina K (lovostatina) te (b) monakolin K kiseline

Potrebno je istaknuti da se u ispitanom uzorku crvene fermentirane riže monakolin K nalazi većim dijelom u obliku kiseline nego u obliku laktone (omjer površina pikova monakolin K kiseline i monakolin K laktone iznosi 4,2).

Osim identifikacije aktivnih sastavnica crvene fermentirane riže, cilj rada bio je ispitati i prisutnost toksičnih sastavnica, odnosno mikotoksina citrinina, često prisutnog u crvenoj fermentiranoj riži i u dijetetskim proizvodima na bazi crvene fermentirane riže. Provedena su ispitivanja pokazala da u ispitanim kapsulama nije pronađen citrinin.

## ZAKLJUČAK

Brojna su istraživanja pokazala da crvena fermentirana riža, koja se dobiva fermentacijom bijele riže pomoću plijesni *Monascus purpureus*, uspješno snižava koncentraciju kolesterola i triglicerida prisutnih u krvi pacijenata oboljelih od hiperkolesterolemije. Većina istraživača se slaže da bi dijetetski proizvodi od crvene fermentirane riže mogli biti izvrsni dijetetski preparati za snižavanje koncentracije kolesterola i triglicerida u krvi namijenjeni pacijentima koji više vole liječenje proizvodima prirodnog podrijetla kao i pacijentima koji ne žele ili zbog izraženih neželjenih popratnih pojava ne smiju uzimati statine. No, proizvođači dijetetskih proizvoda koji sadrže crvenu fermentiranu rižu trebali bi provesti standardizaciju proizvoda na sastav svih prisutnih farmakološki aktivnih tvari posebice monakolina te ispitati prisustvo mikotoksina.

Stoga je u ovom radu predložena nova LC/MS/MS metoda za identifikaciju aktivnih i toksičnih sastavnica prisutnih u kapsulama crvene fermentirane riže. Nakon provedenog laboratorijskog ispitivanja moguće je zaključiti da su u odabranom uzorku, komercijalno dostupnom na području Republike Hrvatske, pronađene aktivne sastavnice monakolin K te monakolin K u obliku kiseline, dok citrinitin, nefrotoksičan mikotoksin često prisutan u crvenoj fermentiranoj riži, nije identificiran.

*Zahvala* – Autorice se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa na financijskoj potpori u okviru projekta Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari (no. 006-0061117-1240).

Literatura – References

1. Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VLW. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast rice dietary supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69:231–236.
2. Gordon RY, Becker DJ. The Role of Red Yeast Rice for the Physician. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2011; 13:73–80.
3. Journoud M, Jones PJH. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. *Life Sci.* 2004; 74:2675–2683.
4. Endo A. The origin of the statins. *Int. Cong.* 2004; 1262:3–8.
5. Li Y, Zhang F, Wang Z, Hu Z. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2004; 35: 1101–1112.
6. Li YG, Liu H, Wang ZT. A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2005; 39: 82–90.
7. Huang HN, Hua YY, Bao GR, Xie LH. The Quantification of Monacolin K in Some Red Yeast Rice from Fujian Province and the Comparison of the Other Product. *Chem. Pharm. Bull.* 2006; 54:687–689.
8. Chairote E, Chairote G, Niamsup H, Lumyong S. The presence and the content of Monacolins in Red Yeast rice prepared from Thai glutinous rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 24:3039–3047.
9. Becker DJ, Gordon RY, Halbert SC, French B, Morris PB, Rader DJ. Red Yeast Rice for Dyslipidemia in Statin-Intolerant Patients A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150:830–839.
10. Liu J, Zhang J, Shi Y, Grimsgaard S, Alraek T, Fønnebo V. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin. Med.* 2006; 1:4.
11. Nigović B, Fabijanić P, Bačić-Vrca V. Statini. *Farm. Glas.* 2007; 63:315–331.
12. Ong HT, Cheah JS. Statin alternatives or just placebo: an objective review of omega-3, red yeast rice and garlic in cardiovascular therapeutics. *Chin. Med. J.* 2008; 121:1588–1594.
13. Li C, Zhu Y, Wang Y, Zhu JS, Chang J, Kritchevsky D. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 1998; 18:71–81.
14. Havel RJ. Dietary supplement or drug? The case of Cholestin. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69:175–176.

15. [www.amazon.com](http://www.amazon.com), pristupljeno 4. prosinca 2011.
16. Gordon RY, Cooperman T, Obermeyer W, Becker DJ. Marked Variability of Monacolin Levels in Commercial Red Yeast Rice Products. Arch. Intern. Med. 2010; 170:1722–1727.
17. Chen F, Hu X. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. Int. J. Food Microbiol. 2005; 103: 331–337.
18. Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. Int. J. Food Microbiol. 2008;126: 20–23.
19. Wang YZ, Ju XL, Zhou YG. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. Food Microbiol. 2005; 22:145–148.
20. Tistaert C, Dejaegher B, Vandar Heyden Y. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. Anal. Chim. Acta. 2011; 690:148–161.
21. <http://www.vcclab.org>, pristupljeno 15. prosinca 2011.
22. Wang H, Wu Y, Zhao Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 2001; 36:58–70.

*Primljeno 19. siječnja 2012.*