

ANALÝZA A IDENTIFIKÁCIA POLYFENOLICKÝCH ZLÚČENÍN V ZELENÝCH POTRAVINÁCH VYSOKOÚČINNOU KVAPALINOVOU CHROMATOGRAFIU V SPOJENÍ S TANDEMOVOU HMOTNOSTNOU SPEKTROMETRIU
ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN GREEN FOODS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY

ŠKVÁRA Pavel, KEZMANOVÁ Júlia, MIŠĽANOVÁ Csilla, VOJS STAŇOVÁ Andrea

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

Positívne účinky zelených potravín na ľudské zdravie sú dobre známe. Tieto účinky sú spôsobené hlavne obsahom polyfenolických látok v nich obsiahnutých. Cieľom tejto práce bolo využitie tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS) v kombinácii s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) pre analýzu a identifikáciu polyfenolických zlúčenín v zelených potravinách. HPLC-ESI-MS/MS analýzy vybraných výluhov pripravených z rôznych druhov zelených potravín (*Urtica dioica L.* and *Allium ursinum*) a ich polyfenolické profily boli získané pomocou LCMS-IT-TOF analyzátora s ionizáciou elektrosprejom. HPLC separácia prebiehala na kolóne Kinetex XB-C18 (100 x 2,1 mm; 2,6µm) s využitím gradientovej elúcie (voda + 0,1% kyselina mravčia: acetonitril + 0,1% kyselina mravčia, 5-90%) s prietokom mobilnej fázy 0,2 mL/min. MS/MS analýzy boli uskutočnené v pozitívnom aj negatívnom ionizačnom móde s rozsahom m/z 50 – 1000. Celkový čas analýzy bol 20 minút a dávkovaný objem bol 2 µL resp. 5 µL.

Kľúčové slová: Polyfenolické zlúčeniny. Zelené potraviny. HPLC-MS/MS analýza. Identifikácia.

ABSTRACT

The beneficial effects of green foods on human health are well known. These benefits are mainly due to polyphenol content. The aim of this work was utilization of tandem mass spectrometry (MS/MS) combined with high performance liquid chromatography (HPLC) for analysis and identification of polyphenolic compounds in green foods. HPLC-ESI-MS/MS analysis of selected extracts prepared from various types of green food (*Urtica dioica L.* and *Allium ursinum*) and their polyphenolic profiles were performed by LCMS-IT-TOF analyzer equipped with electrospray ionization. HPLC separations were carried out on Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 µm) using gradient elution (water+0.1% formic acid: acetonitrile+0.1% formic acid, 5 - 90%) with 0.2 mL/min flow rate of mobile phase. The MS/MS analyses were performed within 50-1000 m/z range in positive and negative ionization modes. Total analysis time was 20 minutes and injected volumes were 2 µL or 5µL, respectively.

Keywords: Polyphenolic compounds. Green food. HPLC-MS/MS analysis. Identification

ÚVOD

Z chemického hľadiska sú antioxidanty fenolové zlúčeniny odvodené od jednoduchých fenolov až po

zložité polyfenoly. Antioxidant je látka, ktorej molekuly obmedzujú aktivitu kyslíkatých zlúčenín - znižujú pravdepodobnosť ich vzniku alebo ich odvádzajú do menej reaktívneho stavu. Antioxidanty obmedzujú proces oxidácie v organizme alebo v zmesiach, v ktorých sa nachádzajú a v potravinách predlžujú ich životnosť. V organizme znižujú pravdepodobnosť vzniku niektorých typov chorôb [1].

Hlavným dôvodom pre sledovanie prítomnosti a aktivity antioxidantov je ich priaznivý vplyv na ľudský organizmus. Medzi ich zdraviu prospešné vlastnosti patria antioxidačné, antibakteriálne, antikarcinogénne, antialergénne a protizápalové účinky [2-4]. Antioxidanty v zelených potravinách patria do skupiny nízko-molekulových prírodných antioxidantov, ktorých odborný názov je fenolové zlúčeniny [5]. Zelené potraviny sa rozdeľujú do štyroch základných skupín: byliny a koreniny, ovocie, zelenina a orechy.

Napriek tomu, že v zelených potravinách bolo doteraz detegované množstvo polyfenolických zlúčenín, je stále potreba vyvíjať nové spoľahlivé analytické metódy. Pre identifikáciu a stanovenie polyfenolických zlúčenín v zelených potravinách sa bežne používajú postupy založené na úprave vzorky pomocou extrakcie kvapalina-kvapalina nasledované separáciou a identifikáciou pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS/MS) [6]. Viacerí autori sa venujú identifikácii a charakterizácii fenolických zlúčenín vo vzorkách zelených potravín s využitím kombinácie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie s ionizáciou elektrosprejom (HPLC-ESI-MS) a chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku (HPLC-APCI-MS). Napríklad, HPLC-ESI-MS metóda bola použitá pre separáciu a identifikáciu fenolických kyselín vo vzorkách jablčnej drene [7], tanínov vo vzorkách gašťa-

nov [8], fenolických zlúčenín vo vzorkách podzemnice olejnej [9], paradajok [10], špenátu [11] a diarylheptanoidov vo vzorkách zázvoru [12]. Metóda HPLC-APCI-MS/MS bola použitá pre identifikáciu karotenoidov vo vzorkách manga a citrusov [13]. Pre analýzu vzoriek žihľavy dvojdomej [14] a medvedieho cesnaku [15] bola tiež použitá metóda HPLC-ESI-MS.

CIEĽ

Cieľom predloženej práce bola analýza a identifikácia polyfenolických zlúčenín vo vybraných vzorkách zelených potravín s využitím kombinácie techník vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie a tandemovej hmotnostnej spektrometrie.

MATERIÁL A METÓDY

Pre všetky HPLC-ESI-MS/MS analýzy bol použitý vysokorozlišovací hmotnostný spektrometer Shimadzu LC-MS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Tento hmotnostný spektrometer kombinujúci ionizáciu elektrosprejom (ESI), trojdimenziálnu iónovú pascu (IT) a analyzátor doby letu častíc (TOF) poskytoval vysokú citlivosť a rozlíšenie. HPLC chromatograf pozostával z: dávkovača (SIL-20A), vysokotlakých púmp (LC-20AD), termostatu (CTO-20A), DAD detektora (SPD-M20A), odplynovača mobilnej fázy spolu so zmiešavacou jednotkou (DGU-20A5) a kontrolného modulu (CBM-20A). Pre ovládanie hmotnostného spektrometra, zaznamenávanie a vyhodnotenie dát bol použitý software LC-MS Solutions v 3.5.1. (Shimadzu).

Pre chromatografickú separáciu polyfenolických zlúčenín bola použitá kolóna Kinetex XB-C18 (100 x 2,1 mm; 2,6 µm), (Phenomex, Torrance, CA, USA). Ako mobilná fáza bola použitá voda (A) a acetonitril (B), (obe s prídavkom 0,1% alebo 10 mmol/L kyseliny mravčej). Bola použitá gradientová elúcia 5-90% (B). Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 0,2 mL/min. Chromatografická kolóna bola vyhrievaná na teplotu 40 °C. Všetky MS analýzy boli uskutočnené v pozitívnom aj negatívnom ionizačnom móde. Napätia na ESI kapiláre boli +4,5 kV a -3,5 kV. Rozsah zaznamenávaných hodnôt bol nastavený od 50 do 1000 m/z. Teploty CDL kapiláry a výhrevného bloku boli nastavené na 200 °C. Dávkovaný objem bol 2 µL resp. 5 µL.

Chemikálie

Pre prípravu roztokov a mobilných fáz boli použité chemikálie: voda pre LC-MS, acetonitril pre LC-MS (obidve LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Nemecko), kyselina mravčia pre LC-MS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko). Štandardy vybraných polyfenolických zlúčenín boli zakúpené od spoločnosti Sigma-Aldrich.

Odber a spracovanie vzorky

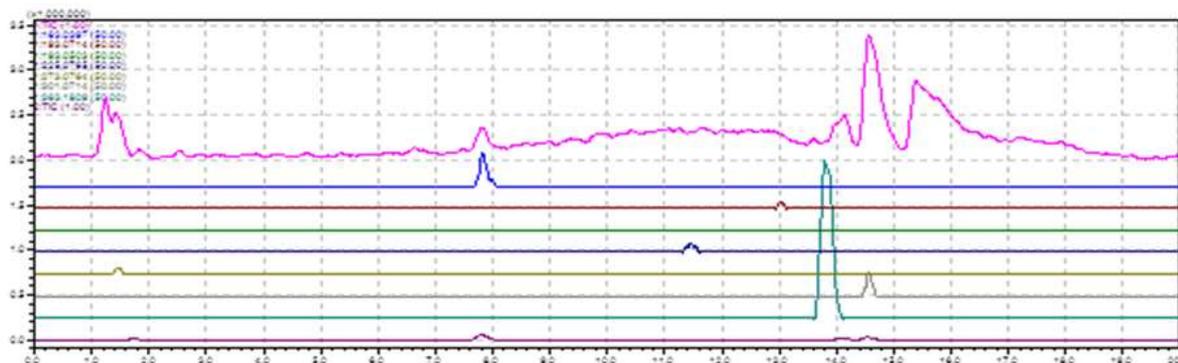
Vzorky žihľavy dvojdomej (*Urtica dioica* L.) boli zozbierané v marci 2017 v geografickej oblasti obce Hruštín a následne boli vysušené a skladované na tmavom a suchom mieste. Vzorky medvedieho cesnaku (*Allium ursinum*) boli zozbierané v marci 2017 v geografickej oblasti mesta Bratislava a následne boli vysušené a skladované na suchom a tmavom mieste. Pred analýzou boli výluhy všetkých vzoriek pripravené nasledujúcim spôsobom: jednotlivé návažky o hmotnosti približne 0,5 g (viď Tab. 1) boli zaliate vodou o teplote 97 °C. Doba vylúhovania bola 5, 10 a 15 minút. Výluhy boli následne prefiltrované cez filtračný papier a ochladené na izbovú teplotu. Po vychladnutí boli vzorky prefiltrované cez striekačkový mikrofilter (PVDF s veľkosťou pórov 0,22 µm) a následne analyzované pomocou HPLC-ESI-MS/MS metódy alebo uskladnené v chladničke pri teplote 4 °C maximálne 24 hodín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

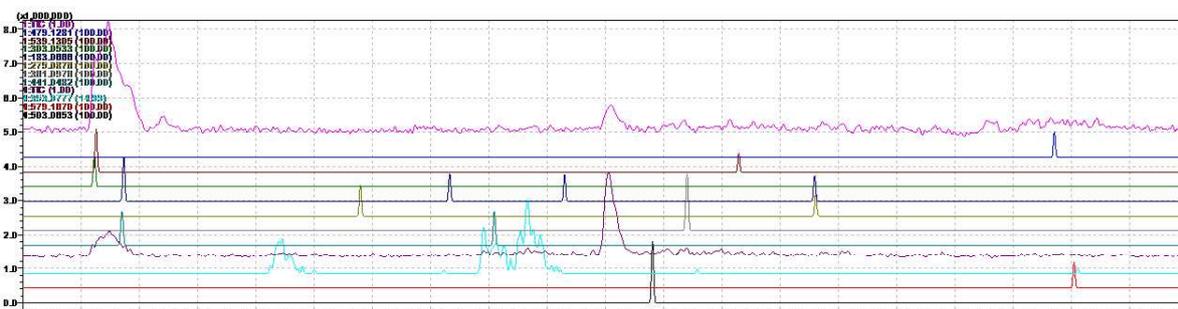
Prvá časť našej experimentálnej práce bola zameraná na optimalizáciu zloženia mobilných fáz pre spojenie HPLC-MS/MS vzhľadom na ionizáciu polyfenolických látok pomocou elektrospreja. Pre potvrdenie vplyvu zloženia mobilných fáz na výsledný MS signál bol navrhnutý jednoduchý experiment. Boli testované rôzne prídavky kyseliny mravčej (0,1% a 10 mmol/L) do vodnej (A) ako aj organickej (B) zložky mobilných fáz pre HPLC-ESI-MS/MS analýzy výluhov cesnaku medvedieho a žihľavy dvojdomej. Na obrázkoch 1 a 2 sú zobrazené výsledky z HPLC-ESI-MS analýzy výluhu žihľavy dvojdomej (doba vylúhovania bola 5 minút). Po porovnaní výsledkov získaných použitím rôznych mobilných fáz je zrejmé, že použitie mobilných fáz s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej je vhodnejšie pre analýzu výluhov žihľavy dvojdomej (pozorované výrazné zvýšenie signálu v MS).

Tabuľka 1 Popis prípravy vzoriek

Vz. č.	Názov rastliny	Spôsob úpravy	Navážka [g]	Čas zberu	Analyzovaná časť rastliny	Vzorky [mL]
1	žihľava dvojdomá	výluh (5 min)	0,5056	03/2017	listy, stonka	50
2	žihľava dvojdomá	výluh (10 min)	0,4999	03/2017	listy, stonka	50
3	žihľava dvojdomá	výluh (15 min)	0,5008	03/2017	listy, stonka	50
4	cesnak medvedí	výluh (5 min)	0,5048	03/2017	listy, stonka	50
5	cesnak medvedí	výluh (10 min)	0,5003	03/2017	listy, stonka	50
6	cesnak medvedí	výluh (15 min)	0,5033	03/2017	listy, stonka	50



Obr. 1 HPLC-ESI-MS analýza výluhu žihľavy dvojdomej (doba vylúhovania 5 min.) s prídavkom 10 mmol/L kyseliny mravčej do mobilných fáz. TIC v pozitívnom ionizačnom móde – horná časť obrázku, TIC v negatívnom ionizačnom móde – spodná časť obrázku, EIC identifikovaných polyfenolických zlúčenín – v strednej časti obrázku.

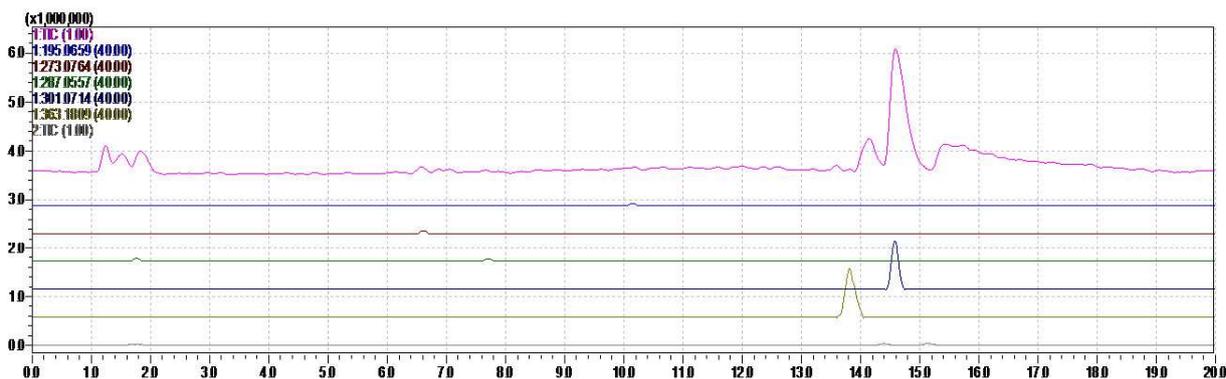


Obr. 2 HPLC-ESI-MS analýza výluhu žihľavy dvojdomej (doba vylúhovania 5 min.) s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej do mobilných fáz. TIC v pozitívnom ionizačnom móde – horná časť obrázku, TIC v negatívnom ionizačnom móde – spodná časť obrázku, EIC identifikovaných polyfenolických zlúčenín – v strednej časti obrázku.

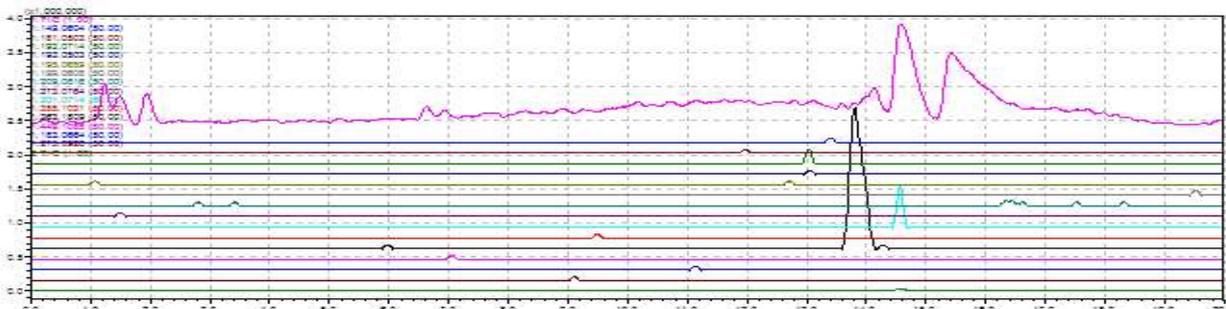
Podobný postup bol zvolený aj pri výbere vhodného zloženia mobilných fáz pre HPLC-ESI-MS/MS analýzu výluhov cesnaku medvedieho. Na obrázku 3 sú zobrazené výsledky analýzy výluhu cesnaku medvedieho (s dobou vylúhovania 15 minút) s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej do mobilných fáz. Obrázok 4 zobrazuje výsledky z HPLC-ESI-MS/MS analýzy výluhu cesnaku medvedieho s dobou vylúhovania 15 minút s prídavkom 10

mmol/L kyseliny mravčej do mobilných fáz. Zo získaných výsledkov bolo zreteľné, že prídavok 10 mmol/L kyseliny mravčej do mobilných fáz je vhodnejší vzhľadom na ionizáciu analytov.

Na HPLC-ESI-MS/MS analýzy ostatných výluhov žihľavy dvojdomej s dobou vylúhovania 5, 10 a 15 minút boli použité mobilné fázy s optimálnym zložením (výsledky získané počas optimalizácie). Experimentálne podmienky pre chromatografickú



Obr. 3 HPLC-ESI-MS analýza výluhu cesnaku medvedieho (doba vylúhovania 15 min.) s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej do mobilných fáz. TIC v pozitívnom ionizačnom móde – horná časť obrázku, TIC v negatívnom ionizačnom móde – spodná časť obrázku, EIC identifikovaných polyfenolických zlúčenín – v strednej časti obrázku.



Obr. 4 HPLC-ESI-MS analýza výluhu cesnaku medvedieho (doba vylúhovania 15 min.) s prídavkom 10 mmol/L kyseliny mravčej do mobilných fáz. TIC v pozitívnom ionizačnom móde – horná časť obrázku, TIC v negatívnom ionizačnom móde – spodná časť obrázku, EIC identifikovaných polyfenolických zlúčenín – v strednej časti obrázku.

separáciu a hmotnostne spektrometrickú detekciu sú detailne popísané v časti Materiál a metódy.

Vo výluhu žihľavy dvojdomej s dobou vylúhovania 15 minút bola zistená prítomnosť 12 polyfenolických zlúčenín. Výsledky z analýzy tejto vzorky sú zosumarizované v tabuľke 2.

Pre identifikáciu polyfenolických zlúčenín boli urobené MS/MS analýzy. Na obrázku 5 sú zobrazené hmotnostné spektrá prislúchajúce kyseline kávovej získané z MS/MS analýzy výluhu žihľavy dvojdomej s dobou vylúhovania 15 minút. V MS¹ je viditeľný ión s pomerom m/z 179,0358, ktorý prislúcha molekulovému iónu [M-H]⁻ kyseliny kávovej v negatívnom ionizačnom móde. V MS² spektre dominuje fragmentový ión s pomerom m/z 135,0472, ktorý vznikol odštiepením karboxylovej skupiny z molekuly kyseliny kávovej.

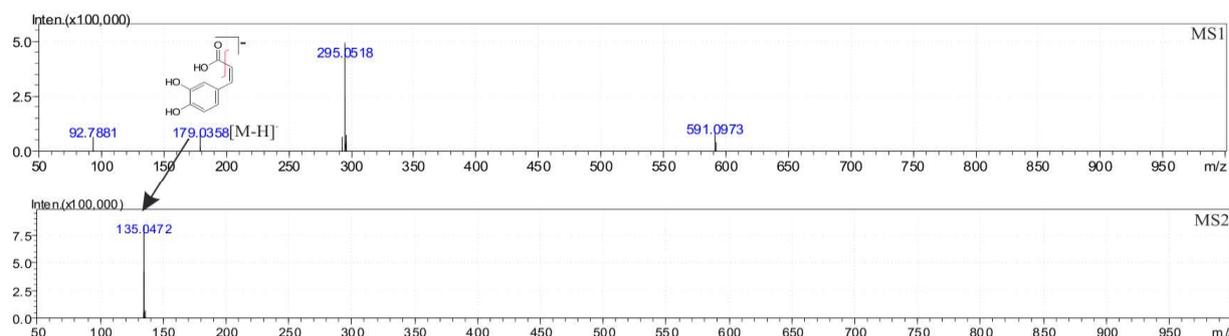
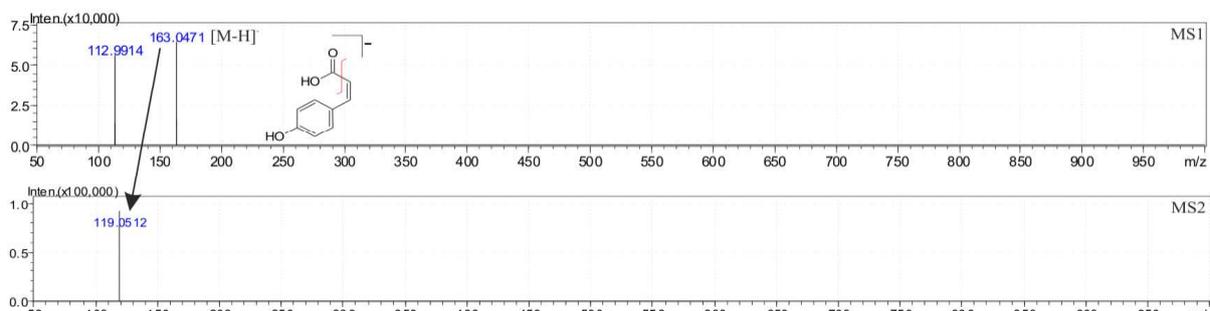
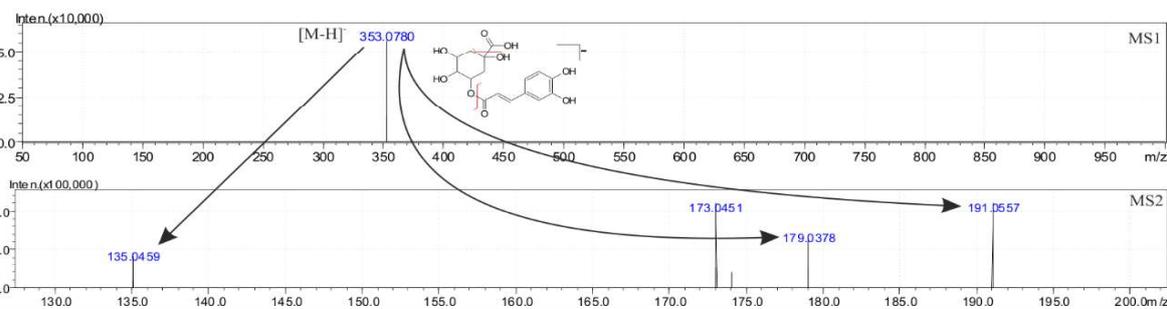
Na obrázku 6 sú uvedené MS¹ a MS² spektrá prislúchajúce kyseline kumárovej získané analýzou výluhu žihľavy dvojdomej. V MS¹ je zobrazený ión s pomerom m/z 163,0471 prislúchajúci molekulo-

vému iónu [M-H]⁻ kyseliny kumárovej v negatívnom ionizačnom móde. V MS² spektre získanom fragmentáciou molekulového iónu kyseliny kumárovej je viditeľný ión s pomerom m/z 119,0612, ktorý vznikol odštiepením karboxylovej skupiny z molekulového iónu.

Pomocou HPLC-ESI-MS/MS analýzy výluhu žihľavy dvojdomej boli získané MS¹ a MS² spektrá prislúchajúce kyseline chlorogénovej, ktoré sú zobrazené na obrázku 7. V MS¹ spektre je viditeľný ión s pomerom m/z 353,0780, ktorý prislúcha molekulovému iónu [M-H]⁻ kyseliny chlorogénovej v negatívnom ionizačnom móde. V MS² spektre získanom fragmentáciou prekurzorového iónu s pomerom m/z 353,0780 sú viditeľné nasledujúce fragmentové ióny: ión s pomerom m/z 191,0557, ktorý vznikol odštiepením -C₉O₃H₇ z molekulového iónu kyseliny chlorogénovej a ión s pomerom m/z 179,0378, ktorý vznikol odštiepením -C₇O₅H₆ z molekulového iónu kyseliny chlorogénovej. V MS² spektre taktiež vidíme ión s m/z 173,0451, ktorý prislúcha

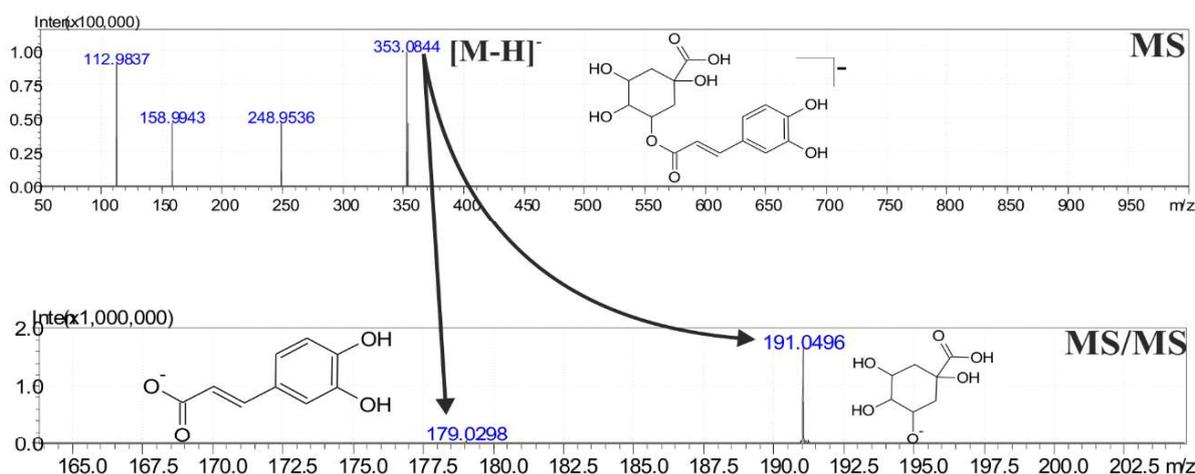
Tabuľka 2 Identifikované polyfenolické zlúčeniny v 15 min. výluhu žihľavy dvojdomej

Fenolická látka	Retenčný čas [min]	[M+H] ⁺ teoretická	[M+H] ⁺ nameraná	[M-H] ⁻ teoretická	[M-H] ⁻ nameraná
kys. 3,4-dimetoxy-škoricová	2,0	-	-	207,0656	207,0717
sulfátovaná kys. rozmarínová	4,5	-	-	439,0338	439,0221
kys. chlorogénová	6,6	355,1031	355,0981	353,0871	353,0780
kvercetín-3-O-glukozid	7,8	465,1035	465,0865	-	-
umbelliferón	7,9	163,0397	163,0397	-	-
kys. kávová	7,9	-	-	179,0343	179,0358
izorhamnetín	7,9	317,0663	317,0652	-	-
narirutín	8,4	581,1877	581,1718	-	-
kys. syringová	8,5	-	-	197,0448	197,0450
kys. o(p)-kumárová	8,7	-	-	163,0393	163,0411
rutín	8,7	611,1614	611,1436	-	-
kys. sinapová	12,9	225,0765	225,0779	-	-

**Obr. 5** MS spektrá prislúchajúce kyseliny kávovej získané HPLC-ESI-MS/MS analýzou výluhu žihľavy dvojdomej v negatívnom ionizačnom móde. Doba lúhovania 15 min.**Obr. 6** MS spektrá prislúchajúce kyseliny kumárovej získané HPLC-ESI-MS/MS analýzou výluhu žihľavy dvojdomej v negatívnom ionizačnom móde. Doba lúhovania 15 min.**Obr. 7** MS spektrá prislúchajúce kyseliny chlorogénovej získané HPLC-ESI-MS/MS analýzou výluhu žihľavy dvojdomej v negatívnom ionizačnom móde. Doba lúhovania 15 min.

Tabuľka 3 Identifikované polyfenolické zlúčeniny vo výluhu cesnaku medvedieho s dobou vylúhovania 10 minút

Fenolická látka	Retenčný čas [min]	[M+H] ⁺ teoretická	[M+H] ⁺ nameraná	[M-H] ⁻ teoretická	[M-H] ⁻ nameraná
izoramnetín	1,45	317,0663	317,0755	-	-
naringenín	1,61	273,0764	273,0757	-	-
kys. p-kumárová / kys. o-kumárová	2,48	165,0553	165,0548	-	-
umbelliferón	3,32	163,0397	163,0385	-	-
kys. veratrová	7,04	183,0664	183,0653	-	-
matairezínol	10,28	359,1496	359,1456	-	-
kys. syringová	11,35	199,0608	199,0672	-	-
daidzeín	11,57	255,0659	255,0736	-	-
kys. vanilová	11,75	169,0503	169,0505	-	-
naringenín	12,92	-	-	271,0604	271,0689
skopoletín	13,01	193,0503	193,0522	191,0343	191,0314
kys. chinová	13,02	193,0714	193,0755	-	-
kys. p-hydroxy-benzoová	13,05	139,0397	139,0364	-	-
sekoizolaricire-zínol	13,75	363,1809	363,1885	-	-
kys. chlorogénová	15,63	355,1031	355,1100	-	-
kys. 3,4-dimetoxyškoricová	18,71	209,0816	209,0857	-	-

**Obr. 8** MS spektrá prislúchajúce kyseliny chlorogénovej získané HPLC-ESI-MS/MS analýzou výluhu cesnaku medvedieho v negatívnom ionizačnom móde. Doba luhovania 10 min.

tomuto odštiepeniu. Ión s m/z 135,0459 v MS², ktorý vidíme v spektre kyseliny chlorogénovej vznikol odštiepením karboxylovej skupiny z iónu m/z 179,0378.

Ďalším krokom našej práce bola HPLC-ESI-MS/MS analýza výluhov cesnaku medvedieho s dobami vylúhovania 5, 10 a 15 min. Ako už bolo vyššie uvedené, optimálne bolo použitie prídavku 10 mmol/L kyseliny mravčej do oboch zložiek mobilných fáz. Vo výluhu cesnaku medvedieho s dobou vylúhovania 10 minút bola potvrdená prítomnosť 16 polyfenolických zlúčenín. Výsledky analýzy tejto vzorky sú zosumarizované v tabuľke 3. Rovnako, ako v prípade HPLC-ESI-MS analýzy výluhov

zo žihľavy dvojdomej aj pri identifikácii polyfenolických látok vo výluhoch cesnaku medvedieho bola využitá tandemová hmotnostná spektrometria. Pre ilustračné účely sú na obrázku 8 zobrazené MS¹ a MS² spektrá prislúchajúce kyseliny chlorogénovej. V MS¹ spektre vidíme molekulový ión [M-H]⁻ s m/z 353,0844, ktorý prislúcha kyseliny chlorogénovej vo výluhu cesnaku medvedieho s dobou vylúhovania 10 min. V MS² spektre sú viditeľné ióny s pomerom m/z 191,0496 a 179,0298, ktoré vznikli fragmentáciou z prekursorového iónu s pomerom m/z 353,0844 a prislúchajú charakteristickým fragmentovým iónom kyseliny chlorogénovej.

ZÁVER

V našej experimentálnej práci sme sa zamerali na možnosti využitia tandemovej hmotnostnej spektrometrie v spojení s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC-MS/MS) pre analýzu a identifikáciu polyfenolických zlúčenín vo výluhoch rôznych druhov zelených potravín. Z jednotlivých údajov získaných HPLC-MS/MS analýzou výluhov z rôznych druhov zelených potravín bolo možné získať informácie o zložení analyzovaných vzoriek ako aj informácie o charaktere a štruktúre v nich zastúpených polyfenolických zlúčenín. Použitím navrhutej HPLC-ESI-IT-TOF-MS metódy bolo možné potvrdenie prítomnosti 12 antioxidantov vo výluhoch žihľavy dvojdomej a 16 antioxidantov vo výluhoch cesnaku medvedieho. Na základe získaných výsledkov je možné skonštatovať, že použitá HPLC-MS/MS metóda je vhodná pre charakterizáciu a identifikáciu polyfenolických zlúčenín vo výluhoch pripravených zo zelených potravín.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (VVCE-0070-07 a APVV-0583-11).

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] GIL E.S., COUTO R.O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23 (3): 542–558.
- [2] BOROS B., JAKABOVÁ S., DÖRNYEI Á., et al. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *J Chromatogr A*. 2010; 1217 (51): 7972–7980.
- [3] GINJOM I., D'ARCY B., CAFFIN N., et al. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry*. 2011; 125 (3): 823–834.
- [4] ATOUI A., MANSOURI A., BOSKOU G., et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. 2005; 89 (1): 27–36.
- [5] TSAO R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2 (12): 1231–1246.
- [6] ORČIĆ D., FRANCIŠKOVIĆ M., BEKVALAC K., et al. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*. 2014; 143: 48–53.
- [7] BASKARAN R., PULLENCHERI D., SOMASUNDARAM R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*. 2016; 82: 121–127.
- [8] COMANDINI P., LERMA-GARCÍA M.J., SIMÓ-ALFONSO E.F., et al. Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD–MS. *Food Chemistry*. 2014; 157: 290–295.
- [9] MA Y., KOSIŃSKA-CAGNAZZO A., KERR W.L., et al. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanched peanut skins by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2014; 1356: 64–81.
- [10] JIANG H., TIMMERMANN B.N., GANG D.R. Characterization and identification of diarylheptanoids in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007; 21 (4): 509–518.
- [11] LUCINI L., PELLIZZONI M., BAFFI C., et al. Rapid determination of lycopene and β -carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Sci Food Agric*. 2011; 92 (6): 1297–1303.
- [12] DACHTLER M., GLASER T., KOHLER K., et al. Combined HPLC–MS and HPLC–NMR On-Line Coupling for the Separation and Determination of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in Spinach and in Retina. *Analytical Chemistry*. 2001; 73 (3): 667–674.
- [13] PETRY F.C., MERCADANTE A.Z. Composition by LC-MS/MS of New Carotenoid Esters in Mango and Citrus. *J Agric Food Chem*. 2016; 64 (43): 8207–8224.
- [14] FARAG M.A., WEIGEND M., LUEBERT F., et al. Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry*. 2013; 96: 170–183.
- [15] VLASE L., PÂRVU M., PARVU A.E., et al. Phytochemical analysis of *Allium Fistulosum* L. and *A. Ursinum* L. *Dig J Nanomater Biostruct.*. 2012; 8: 457–467.