

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 390026 г. Рязань, Россия

Разработана и валидирована биоаналитическая методика количественного определения малонового диальдегида (МДА) методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенный метод определения МДА включает стадию высвобождения связанного МДА без реакции дериватизации. Нижний предел количественного обнаружения составил 600 нмоль/л, объем необходимой пробы 10 мкл, время анализа 7 мин. Полученный в ходе исследования диапазон концентраций дает возможность использовать данную биоаналитическую методику для определения концентрации МДА в биологическом материале при оценке физиологических и патологических состояний.

Ключевые слова: малоновый диальдегид; ВЭЖХ-МС/МС; окислительный стресс.

Для цитирования: Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н. Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 369-373. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-369-373>

Для корреспонденции: Абаленихина Юлия Владимировна, канд. биол. наук, доц. каф. биологической химии с курсом клин. лаб. диагностики; e-mail: abalnihina88@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 24.02.2022

Принята к печати 10.03.2022

Опубликовано 18.07.2022

Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Yakusheva E.N.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF MALONDIALDEHYDE BY HPLC-MS/MS

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russian Federation

A bioanalytical technique for quantitative determination of MDA by HPLC-MS/MS. The proposed method for determining MDA includes the release stage of bound MDA and excludes the derivatization reaction. The lower limit of quantitative detection was 600 nmol/l, the volume of the required sample was 10 µl, the analysis time was 7 min. The range of concentrations obtained during the study makes it possible to use this bioanalytical technique to determine the concentration of MDA in biological material when assessing physiological and pathological conditions.

Key words: malondialdehyde; HPLC-MS/MS; oxidative stress.

For citation: Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Yakusheva E.N. Development and validation of a methodology for quantitative determination of malondialdehyde by HPLC-MS/MS. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 369-373 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-369-373>

For correspondence: Abalenikhina Yuliya Vladimirovna, PhD. Biol. sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with a course of clinical laboratory diagnostics; e-mail: abalnihina88@mail.ru

Information about authors:

Mylnikov P.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>;

Shchulkin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;

Abalenikhina Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>;

Yakusheva E.N., <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.02.2022

Accepted 10.03.2022

Published 18.07.2022

Введение. Окислительный стресс – это типовой патологический процесс, который характеризуется дисбалансом между активными формами кислорода (АФК) и емкостью антиоксидантных систем. В ходе ОС происходит генерация АФК, которые взаимодействуют с раз-

ными классами макромолекул: липиды, белки и нуклеиновые кислоты [1].

Самым активным процессом является перекисное окисление липидов (ПОЛ) – реакция кислорода с ненасыщенными жирными кислотами, в результате которой

образуется широкий спектр продуктов окисления. Малоновый диальдегид (МДА) является одним из наиболее известных продуктов ПОЛ [2].

Известно, что в небольших концентрациях (5-10 мкМ) МДА проявляет свойства сигнальной молекулы, запуская экспрессию генов коллагена, белков Sp1 и Sp3 [3], регулирует секрецию инсулина, повышает соотношение АТФ/АДФ и уровень цитозольного Ca²⁺ [4]. Однако более высокие его концентрации являются токсичными и определяются при патологических состояниях: атеросклероз [5], диабет [6], преэклампсия [7], лимфедема нижних конечностей [8], эндотелиальная дисфункция [9]. МДА является химически стабильным веществом и обладает высокой биодоступностью, что позволяет определять его в плазме, моче, тканях, клетках и использовать в качестве маркера ОС при различных патологических состояниях.

Наиболее распространенным методом количественного определения МДА является фотометрический анализ, в основе которого лежит его способность реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и образовывать окрашенный аддукт (МДА-(ТБК)₂) [10].

Реакция с ТБК является удобным и простым методом, однако она имеет невысокую специфичность к МДА и требует большого объема пробы, что затрудняет клинический анализ. ТБК может вступать в реакции с широким спектром компонентов, присутствующих в плазме, таких, как альдегиды, сахара и мочевины [11].

За последнее десятилетие было разработано несколько технологий определения МДА, таких как газовая хроматографическая масс-спектрометрия (GC-MS/MS), жидкостная хроматографическая масс-спектрометрия (LC-MS/MS) [12]. Все эти методы требуют предварительной дериватизации (ТБК [13], 2,4-динитрофенилгидразин [14], пентафторбензилбромид в водном ацетоне [15], пентафторбензил [15, 16]) и не учитывают стадию высвобождения МДА из связанного состояния, на долю которого приходится до 90% [17].

Таким образом, не вызывает сомнения, что количественное определение МДА имеет важное биологическое и клиническое значение, однако способ оценки требует оптимизации.

Цель работы – разработать и валидировать методику количественного определения МДА методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материал и методы. Для исследования была использована субстанция МДА в виде тетрабутиламмониевой соли («Sigma Aldrich», Германия). Для приготовления хроматографической подвижной фазы были использованы ацетонитрил специальный для градиентной хроматографии («Panreac», Испания), вода ультрачистая класса 1, полученная на деионизаторе Millipore («Sim-

plicity Water purification system и формиат аммония) («Sigma Aldrich», Германия).

Методика разработана с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» («ThermoFisher Scientific», США), включающей в себя градиентный насос, оснащенный системой дегазации; автосемплером, колоночным термостатом. В качестве детектора в данную систему включен tandemный масс-селективный детектор TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление аналитической системой, запись показаний детектора и контроль инструментальных параметров осуществлялся с помощью модулей программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47).

Хроматографию проводили на колонке UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm, 3um, 100A в комплексе с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-3UM; температура колонки 35°C. Был использован изократический режим элюирования со скоростью потока 300 мкл/мин подвижной фазой, состоящей из 20% ацетонитрила и 80% водного раствора формиата аммония с концентрацией 10 мМоль/л.

Детектирование МДА проводили при следующих условиях. Осуществлялась ионизация путём формирования электроспрея в негативном режиме при атмосферном давлении. Использовались указанные далее условия источника ионов: напряжение электроспрея 2700 В, оболочечный газ (sheath gas) 50 отн. единиц (arb), вспомогательный газ (aux gas) 10 отн. единиц (arb), продувочный газ (sweep gas) 1 отн. единица (arb), температура испарителя 350 °С, ион-транспортующей трубки 300 °С. Для детектирования был использован режим SRM со следующими параметрами: разрешение Q1 и Q3 установлено на 0,7, скорость подачи аргона (CID gas) 1 мТорр. Определяемые переходы и дополнительные параметры представлены в табл. 1. Для количественного определения использовался переход m/z 71.1 Да → 41 Да.

Объём вводимой пробы 5 мкл, время удерживания при указанных условиях составило 3,05 мин. Общее время анализа равно 7 мин.

Пробоподготовка. В качестве матрицы использовали раствор Хэнкса после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 часов. Выбор матрицы обусловлен схожестью состава ионов и эндогенных веществ, в основном обуславливающих развитие матричного эффекта, с биологическими жидкостями при отсутствии содержания МДА.

С целью подготовки проб к хроматографированию проводилось осаждение белков путём смешивания 10 мкл пробы с 90 мкл ацетонитрила, последующим встряхиванием и дальнейшим центрифугированием при 10000g в течение 10 мин при температуре +4 °С. Полученный супернатант переносили в вials («ThermoFisher», США) со специальными вставками объёмом 300 мкл, после чего пробы помещали в автосемплер с поддерживаемой температурой +6 °С.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов. 1 мг тетрабутиламмониевой соли МДА растворяли в 1 мл метанола для получения раствора 1 мг/мл, после чего 100 мкл раствора разбавляли с 900 мкл воды деионизированной для получения концентрации 100 мкг/мл (стандартный раствор), что эквивалентно 320 мкМ малонового диальдегида в растворе. Из него готовили калибровочные растворы. Матричный и стандартный растворы хранили при температуре -80°C.

Таблица 1

Условия определения переходов прекурсор-продукт малонового диальдегида

Прекурсор, m/z	Продукт, m/z	Энергия столкновения, V	Фрагментация источника, V	Напряжение линз, V
71.1	41	27	10	35
71.1	43	9	10	35
71.1	53.2	6	10	35

Таблица 2

Отклонения концентраций малонового диальдегида в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нмоль/л	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %
600	592	1,33	556	7,33	675	12,50
1000	1035	3,50	1069	6,90	1092	9,20
2000	1881	5,95	1830	8,50	1651	17,45
6000	6578	9,63	6570	9,50	5694	5,10
10000	9262	7,38	10214	2,14	9666	3,34
16000	16250	1,56	16385	2,41	16059	0,37
20000	20002	0,01	18976	5,12	20762	3,81

Таблица 3

Точность и прецизионность методик количественного определения малонового диальдегида в транспортной среде внутри аналитического цикла

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Средняя концентрация, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
600	713	18,83	654	9,00	63,98	9,78
	717	19,50				
	663	10,50				
	600	0,00				
	577	3,83				
2000	2067	3,35	2071	3,53	171,86	8,29
	2209	10,45				
	1834	8,30				
	2259	12,95				
16000	1984	0,80	16236	1,47	599,88	3,69
	15655	2,16				
	17197	7,48				
	16392	2,45				
	16040	0,25				
	15896	0,65				

$$Y = -17,1959 + 31,9356 * X, R^2 = 0,9971;$$

$$Y = -17,0241 + 33,4093 * X, R^2 = 0,9966;$$

$$Y = -19,429 + 32,6500 * X, R^2 = 0,9968.$$

Для построения графиков принималось значение веса концентраций 1/X для более точного построения кривой в области низких концентраций в выбранном аналитическом диапазоне. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов от номинального значения приведены в табл. 2.

Точность и прецизионность. Для оценки данных параметров выполняли анализ образцов холостой транспортной среды с добавлением МДА до концентраций 600, 2000 и 16000 нмоль/л. Анализ проводили в трёх

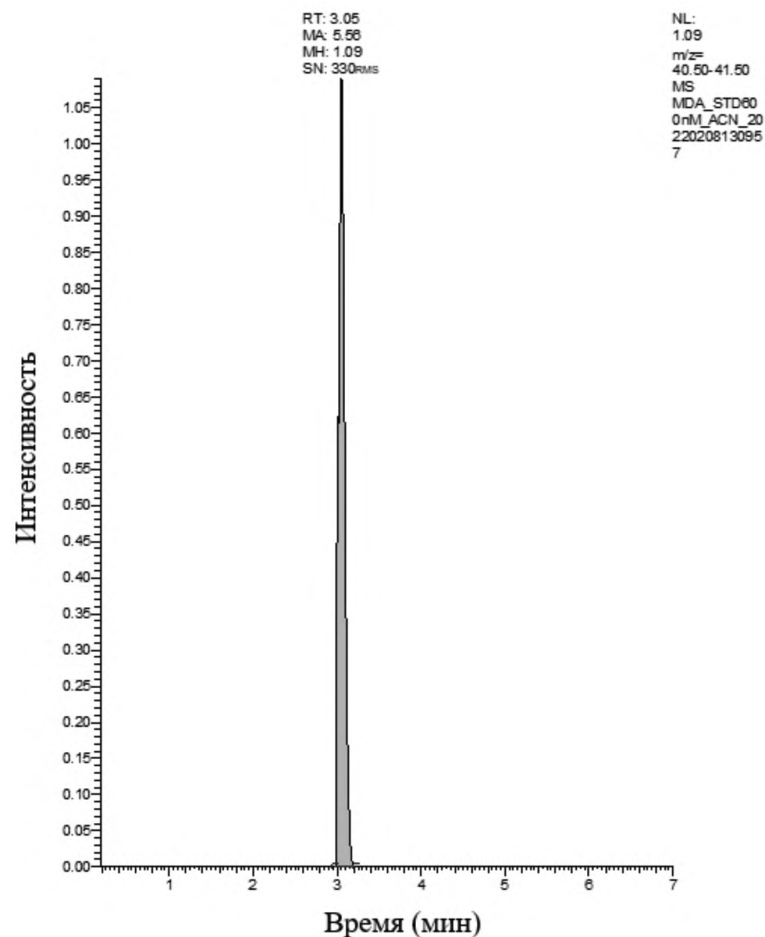
циклах, в ходе первого из которых определяли внутрицикловую точность и воспроизводимость, а в рамках второго и третьего – межцикловую. Для определения внутрицикловых параметров анализировали по 5 образцов каждой концентрации малонового диальдегида. Результаты данного теста представлены в табл. 3. Значения межцикловых параметров представлены в табл. 4. Полученные величины точности и прецизионности соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% для остальных точек).

Стабильность. Стабильность растворов МДА в концентрациях 600 и 16 000 нмоль/л в лизате клеток

Таблица 4

Точность и прецизионность методик количественного определения малонового диальдегида в транспортной среде между аналитическими циклами

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Средняя концентрация, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
600	703	17,17	615	2,5	76,12	12,37
	577	3,83				
	566	5,67				
2000	2259	12,95	2103	5,15	141,05	6,7
	1984	0,80				
	2067	3,35				
16000	16040	0,25	15803	1,23	294,72	1,86
	15473	3,29				
	15896	0,65				



Хроматограмма матрицы с добавлением стандарта малонового диальдегида до конечной концентрации 600 нмоль/л.

оценивалась при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, при хранении -80 °С в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождении в течение 24 ч в автосемплере. Анализировали по 3 образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Матричный эффект. Определяли площади пиков образцов с добавлением исследуемого вещества (МДА) в концентрациях 600 и 16000 нмоль/л в присутствии лизата клеток (матрицы) и чистого раствора МДА в такой же концентрации в отсутствие матрицы (см. рисунок). Относительное стандартное отклонение матричного эффекта, рассчитанное для серии из 6 образцов, не превысило 15%.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы холостой транспортной среды после пробы с концентрацией 20 000 нмоль/л на хроматограмме транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пику МДА.

Разработанная биоаналитическая методика является чувствительной, селективной, точной, прецизионной и может быть использована для количественной оценки МДА при физиологических и патологических состояниях.

Обсуждение. МДА является высокореактивным соединением [21], поэтому при проведении количественного анализа, стоит учитывать, что он может связываться с аминокислотами и белками, а значит присутствует в образце в свободном и связанном виде [22]. Свободный МДА легко вступает в реакцию с ТБК (или другим агентом дериватизации), а связанный МДА должен вернуться в свою свободную форму перед вступлением в реакцию [23]. Некоторая часть связанного МДА становится свободной в процессе дериватизации, однако этот процесс не является контролируемым и не имеет определенного процентного выхода, что будет отражаться на конечном результате [23].

Предложенный метод определения МДА включает процесс предварительной обработки проб ацетонитрилом, что способствует осаждению белка [24] и высвобождению связанного МДА, таким образом, в результате анализа определяется его общее количество.

Кроме этого, методика отличается от существующих аналогов отсутствием стадии дериватизации с реагентами, что, во-первых, позволяет определять свободный МДА, во-вторых, сокращает время анализа, исключая стадию кипячения (реакция с ТБК длится 45 мин при 100 °С).

В сравнении с другими методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации МДА, в разработанной методике не используется дериватизация и твердофазная экстракция, что существенно упрощает процедуру анализа [25].

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения МДА методом ВЭЖХ-МС/МС. Валидация выполнена по следующим параметрам: линейность, селективность, точность, прецизионность, предел количественного определения, стабильность образцов, перенос пробы, матричный эффект. Предложенная методика отличается стадией осаждения

белка, в ходе которой высвобождается связанный МДА, и отсутствием реакции дериватизации. Нижний предел количественного обнаружения составил 600 нмоль/л, объем необходимой пробы 10 мкл, время анализа 7 минут. Полученный в ходе исследования диапазон концентраций дает возможность использовать данную биоаналитическую методику для определения концентрации МДА в биологическом материале при оценке физиологических и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 10-17, 19-25
см. REFERENCES)

8. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Максаев Д.А. Клиническая эффективность биофлавоноидов в лечении лимфедемы нижних конечностей. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2021; 29(2): 245-50. DOI: 10.17816/PAVLOVJ63283.
9. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Егоров А.А., Никулина Н.Н., Никифоров А.А. Эндотелиальная дисфункция у пациентов на программном гемодиализе. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(1): 79-85. DOI: 10.23888/HMJ20197179-85.
18. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013.

REFERENCES

1. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev. Plant Biol.* 2004; 55: 373-99. DOI: 10.1146/annurev.arplant.
2. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2005; 15(4): 316-28. DOI: 10.1016/j.numecd.2005.05.003.
3. García-Ruiz I., de la Torre P., Díaz T., Esteban E., Fernández I., Muñoz-Yagüe T., Solís-Herruzo J.A. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(34): 30551-8. DOI: 10.1074/jbc.M203368200.
4. Wang X., Lei X.G., Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 2014; 382(1): 8-16. DOI: 10.1016/j.mce.2013.09.003.
5. Sri Iswari R., Dafip M., Purwantoyo E. Malondialdehyde (MDA) Production in Atherosclerosis Supplemented with Steamed Tomato. *Pak. J. Biol. Sci.* 2021; 24(3): 319-25. DOI: 10.3923/pjbs.2021.319.325.
6. Moore C.J., Shao C.H., Nagai R., Kutty S., Singh J., Bidasee K.R. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor (RyR2) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in diabetes. *Mol. Cell Biochem.* 2013; 376(1-2): 121-35. DOI: 10.1007/s11010-013-1558-1.
7. Mazloomi S., Alimohammadi S., Khodadadi I., Ghiasvand T., Shafiee G. Evaluation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity and the levels of homocysteine and malondialdehyde (MDA) in the serum of women with preeclampsia. *Clin. Exp. Hypertens.* 2020; 42(7): 590-4. DOI: 10.1080/10641963.2020.
8. Kalinin R.E., Suchkov I.A., Maksaev D.A. Clinical effectiveness of bioflavonoids in the treatment of secondary lower limb lymphedema. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akad. I.P. Pavlova*. 2021; 29(2): 245-50. DOI: 10.17816/PAVLOVJ63283. (in Russian)
9. Kalinin R.E., Suchkov I.A., Egorov A.A., Nikulina N.N., Nikiforov A.A. Endothelial dysfunction in program hemodialysis-dependent patients. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(1): 79-85. DOI: 10.23888/HMJ20197179-85. (in Russian)
10. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in

- aging, CCl4 intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.* 1980; 23(3): 302-11. DOI: 10.1016/0006-2944(80)90040-x.
11. Sun Q., Faustman C., Senecal A., Wilkinson A.L., Furr H. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. *Meat Sci.* 2001; 57: 55-60.
12. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* 2017; 524:13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
13. Yu L.W., Latriano L., Duncan S., Hartwick R.A., Witz G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans,trans-muconaldehyde. *Anal. Biochem.* 1986; 156(2): 326-33. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90261-7.
14. Cordis G.A., Das D.K., Riedel W. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J. Chromatogr.* 1998; 798(1-2): 117-23. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01161-8.
15. Tsikas D., Rothmann S., Schneider J.Y., Suchy M.T., Trettin A., Modun D., Stuke N., Maassen N., Frölich J.C. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 α and nitric oxide (NO). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016; 019: 95-111. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.10.009.
16. Tsikas D. Pentafluorobenzyl bromide-A versatile derivatization agent in chromatography and mass spectrometry: I. Analysis of inorganic anions and organophosphates. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017; 1043: 187-201. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.08.015.
17. Langille E., Lemieux V., Garant D., Bergeron P. Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals. *PLoS One.* 2018; 13(12): e0209802. DOI: 10.1371/journal.pone.0209802.
18. Study of bioequivalence of reproduced medicines. Guidelines for the examination of medicines. Vol. I. [Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I]. Moscow: Grif i K; 2013]. (in Russian)
19. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM): Biopharmaceutics; 2018.
20. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.
21. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11(1): 81-128. DOI: 10.1016/0891-5849.
22. De Vecchi A.F., Bamonti F., Novembrino C., Ippolito S., Guerra L., Lonati S. et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24(8): 2524-9. DOI: 10.1093/ndt/gfp102.
23. Carbonneau M.A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.* 1991; 37(8): 1423-9.
24. Kong R. LC/MS Application in High-Throughput ADME Screen. *Separation Science and Technology.* 2005; 6: 413-46. DOI: 10.1016/S0149-6395(05)80061-3.
25. Yonny M.E., Rodríguez Torressi A., Nazareno M.A., Cerutti S. Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2017; 2017: 4327954. DOI: 10.1155/2017/4327954.