

ОБНАРУЖЕНИЕ ГИДРОПЕРОКСИДОВ В РАСТВОРАХ ФОТООКИСЛЕННОГО ПСОРАЛЕНА

**В.В. Скарга[@], Е.В. Невежин, А.А. Матросов, В.В. Негребецкий,
М.В. Малахов**

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, Москва 117997, Россия*

[@]Автор для переписки, e-mail: skargavlad@gmail.com

Растворы фотоокисленного псоралена обладают целым рядом биологических эффектов, механизм реализации которых предполагает участие в них гидропероксидов. В настоящей работе содержание гидропероксидов в растворах фотоокисленного псоралена оценивали фотометрически методом FOX-анализа (от англ. Ferrous Oxidation + Xylenol Orange). В экспериментах использовали модифицированный FOX-реагент, с 10-кратным содержанием ксиленолового оранжевого, позволяющий количественно обнаруживать в водной фазе до 50 мкМ гидропероксидов. В процессе фотоокисления 0.1 мМ раствора псоралена в фосфатном буферном растворе продукция гидропероксидов растет с увеличением дозы УФ-А-облучения (~2.5 мкМ экв. H₂O₂ для дозы 252 кДж/м² и ~11 мкМ экв. H₂O₂ для дозы 1512 кДж/м²) и достигает ~16.5 мкМ экв. H₂O₂ в случае максимальной исследованной дозы облучения (3024 кДж/м²). Сравнение кинетики фотолиза псоралена и формирования гидропероксидов позволяет сделать вывод, что генерация гидропероксидов является результатом вторичных фотохимических процессов с участием фотопродуктов псоралена, предположительно, фотоиндуцированного автоокисления фотопродуктов псоралена альдегидной природы.

Ключевые слова: *псорален, фотоокисление, гидропероксиды, пероксид водорода, ксиленоловый оранжевый, спектрофотометрия.*

DETECTION OF HYDROPEROXIDES IN SOLUTIONS OF PHOTOOXIDIZED PSORALEN

**V.V. Skarga[@], E.V. Nevezhin, A.A. Matrosov, V.V. Negrebetsky,
M.V. Malakhov**

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow 117997, Russia

[@]Corresponding author e-mail: skargavlad@gmail.com

Photooxidized psoralen solutions possess a variety of biological effects, which implementation mechanism may presumably involve hydroperoxides. Here, the hydroperoxide content in photooxidized psoralen solutions was assessed using photometric FOX assay (from Ferrous Oxidation + Xylenol Orange). FOX reagent with 10× content of Xylenol Orange, modified for quantitative analysis of up to 50 μM of hydroperoxides in aqueous phase was used in experiments. During photooxidation of 0.1 mM psoralen in phosphate buffer solution, hydroperoxide production increases with dose of UVA irradiation (~2.5 μM eq. of H₂O₂ for dose of 252 kJ/m² and ~11 μM eq. of H₂O₂ for dose of 1512 kJ/m²) and reaches ~16.5 μM eq. of H₂O₂ at the highest dose investigated (3024 kJ/m²). A comparison of kinetics of psoralen photolysis and hydroperoxide generation allows us to suggest that generation of hydroperoxide results from the secondary photochemical processes involving psoralen photoproducts, presumably from photoinduced autooxidation of aldehydic photoproducts of psoralen.

Keywords: psoralen, photooxidation, hydroperoxides, hydrogen peroxide, xylenol orange, spectrophotometry.

Введение

Фурукумарины (ФК) – вещества растительного или синтетического происхождения, сенсibiliзирующие биологические объекты к действию ближнего ультрафиолетового излучения (УФ-А-излучения, 320–400 нм) и применяющиеся в медицине для лечения целого ряда заболеваний (псориаза, аллопеции, витилиго и др.) [1, 2]. Многочисленные исследования свидетельствуют о биологической эффективности фотоокисленного псоралена (ФОП), представляющего собой сложную смесь фотопродуктов, образующихся в процессе фотолиза аэрированных растворов псоралена *in vitro* [3]. Ряд эффектов предполагает возможное терапевтическое применение ФОП для лечения заболеваний, обусловленных гиперреактивностью Т-клеточного звена иммунитета [4, 5].

Кроме того, существуют биологические эффекты ФОП, механизм которых остается неясным. Ряд данных указывает на возможную или явную роль гидропероксидов в реализации этих эффектов. Обнаружено, что: а) ионы Fe²⁺ активируют гемолиз эритроцитов, индуцированный ФОП [6], и другой тип фотогемолиза, сенсibiliзированного псораленом (ПУВА-гемолиз) [7]; б) ФОП вызывает превращения гемоглобина, аналогичные таковым при добавлении H₂O₂ [8]; в) производные псоралена, содержащие гидропероксидную группу в составе боковой цепи, индуцируют фотогемолиз эритроцитов [9, 10]. Также известен факт хемилюминесценции, индуцированной добавлением ионов Fe²⁺ к ФОП [11, 12].

В литературе постулируются данные об образовании и накоплении H₂O₂ при фотоокислении псоралена [13, 14], но методологическое описание и количественные результаты анализа H₂O₂ отсутствуют. Лишь косвенно было показано, что при больших дозах облучения псоралена (около 760 кДж/м²) в растворах ФОП может содержаться около 10 мкМ H₂O₂ [8]. Формирование гидропероксидов в процессе фотоокисления псоралена может вовлекать их во

вторичные (постлучевые) химические реакции, что важно для понимания механизмов формирования биологически активных ФОП-продуктов. Так, мы предполагаем возможность формирования, по меньшей мере, еще одного гидропероксида (помимо H₂O₂) в качестве промежуточного продукта фотоокисления псоралена [6].

Прямое обнаружение гидропероксидов в растворах ФОП известными физико-химическими методами затрудняется большим количеством фотопродуктов в составе ФОП. Высокоэффективное обнаружение гидропероксидов методом ЭПР затруднено высоким содержанием этанола в растворе ФОП (1%), а также способностью псоралена и его фотопродуктов перехватывать свободные радикалы [11, 15]. Удобные и высокочувствительные флуоресцентные методы неприменимы по причине наличия собственной флуоресценции как у самого псоралена, так и у его фотопродуктов (например, кумариновой природы). С учетом вышеизложенного, для обнаружения гидропероксидов в растворах ФОП нами был выбран метод с использованием FOX-реагента, представляющего собой кислый (рН 1.6-1.7) водный раствор соли Fe²⁺ и красителя ксиленолового оранжевого (ХО) [16–20]. При добавлении FOX-реагента к раствору, содержащему гидропероксиды, последние окисляют ионы Fe²⁺ до ионов Fe³⁺, которые формируют с ХО окрашенный комплекс Fe[ХО], обнаруживаемый фотометрически при 560 нм. Метод FOX-анализа (от англ. *Ferrous Oxidation + Xylenol Orange*) нашел широкое практическое применение в аналитической химии, поскольку обладает целым рядом преимуществ, таких как: а) нечувствительность к действию света и кислорода воздуха (по сравнению с йодометрическим титрованием); б) специфичность реакции ХО с ионами Fe³⁺ при выбранных значениях рН (по сравнению с другими катионами); в) слабые эффекты или отсутствие эффектов со стороны других химических соединений, присутствующих в анализируемом образце, и пр. (для исчерпывающего

обзора методологических аспектов и применимости FOX-анализа гидропероксидов см. обзор [21]).

Поэтому цель настоящей работы заключалась в обнаружении гидропероксидов в растворе фотоокисленного псоралена с использованием FOX-реагента и проведение количественной оценки их формирования при дозозависимом фотоокислении псоралена.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали псорален (Институт химии растительных веществ, Узбекистан, Ташкент), ксиленоловый оранжевый (ХО), H_2O_2 (35% водный раствор), $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, ацетонитрил (для ВЭЖХ) производства «Acros» (Бельгия), серную кислоту концентрированную производства «Реахим» (Россия), фосфатный буфер таблетированный (Biotechnology Grade, Amresco, США). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (18.2 МОм), полученную на установке OMNI Analytic (Xiamen Research Scientific Instruments Co., Китай). Фосфатный буферный раствор (рН 7.4±0.1) получали путем растворения таблетированной формы в воде. Для определения рН раствора использовали ручной рН метр Hanna HI 83141 (Германия).

Маточный раствор H_2O_2 получали путем разбавления водой исходного 35% водного раствора до нужной концентрации. Концентрацию H_2O_2 в маточном растворе определяли фотометрически, исходя из значения $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [17, 22]. Рабочие растворы H_2O_2 получали путем соответствующего разбавления маточного раствора водой.

Для получения модифицированного FOX-реагента (с 10-кратным содержанием ксиленолового оранжевого) приготавливали маточный водный раствор, содержащий 125 мМ H_2SO_4 , 1 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 5 мМ ксиленолового оранжевого. Полученный FOX-реагент хранили во флаконах из темного стекла при 5–6 °С. В данных условиях хранения FOX-реагент стабилен в течение нескольких недель [19–21].

Облучение псоралена проводили с использованием УФ-испускающего светодиода OTLN 0480 UV (максимум 365 нм, полуширина $\Delta\lambda = 14.5$ нм, OptoTechnology Inc., США) при комнатной температуре (25 °С). Облучение проводили на воздухе в 5 мл стеклянной кювете сбоку (толщина облучаемого образца 1 см) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Интенсивность света при 365 нм измеряли с помощью актинометра Waldmann UV meter (Германия).

Схема проведения FOX-анализа

В стеклянной пробирке смешивали 2 мл образца, содержащего гидропероксид, и 0.5 мл маточного раствора FOX-реагента. Полученную смесь хорошо

перемешивали с использованием вортекса (BioSan, Латвия) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (25 °С) в защищенном от света месте. После инкубации образец анализировали на спектрофотометре в диапазоне длин волн 400–700 нм.

Все исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV 1601PC (Япония). Для измерений использовали кварцевые кюветы Hellma 100 QS (оптический путь 10 мм, Hellma Analytics, Германия). Объем исследуемого образца составлял 2.5 мл.

Для мониторинга процесса фотолиза псоралена проводили разделение продуктов фотоокисления методом ВЭЖХ с обращенной фазой на ВЭЖХ-системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Германия Япония). Разделение осуществляли на колонке Agilent Zorbax® Eclipse XDB C18 (5 мкм; 4.6×150 мм) с поддержанием температуры 25 °С на всем протяжении цикла разделения. Опытный образец (10–100 мкл) наносили на колонку при помощи автосемплера и элюировали со скоростью 1 мл/мин линейным градиентом вода/ацетонитрил ($\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$): 0–4 мин – 2% AcN; 4–14 мин – 50% AcN; 14–24 мин – 70% AcN; 24–31 мин – 100% AcN; 31–34 мин – 100% AcN; 34–38 мин – 2% AcN; 38–40 мин – 2% AcN. Детекцию фотопродуктов проводили на диодно-матричном СФ-детекторе одновременно при 246 и 296 нм с частотой сбора данных 80 Гц. Сбор и обработку данных выполняли на программном комплексе ChemStation® (Agilent Technologies, США).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе нами было проведено исследование процесса фотоокисления псоралена на воздухе методами спектрофотометрии и ВЭЖХ (рис. 1).

Раствор псоралена в фосфатном буферном растворе (0.1 мМ, 1% этанола) подвергали воздействию УФ-А-излучения (365 нм) в дозах, приведенных на рисунке и соответствующих 0–1 часу облучения. Наблюдается зависимое от дозы облучения изменение спектральных свойств растворов фотоокисленного псоралена (ФОП): постепенное исчезновение характерных для псоралена максимумов поглощения около 246 и 296 нм, а также появление длинноволнового плеча поглощения в видимой области спектра. При этом значимого поглощения при длинах волн выше 500 нм практически не наблюдается даже при больших дозах облучения. Это благоприятно для выбранного способа обнаружения гидропероксидов методом FOX-анализа, предполагающего детекцию хромофора при 560 нм.

На вставке к рис. 1 видно, что псорален подвергается быстрому фотолизу в растворах. При малых дозах облучения его убыль, анализируемая методом ВЭЖХ, практически линейна: при дозе облучения

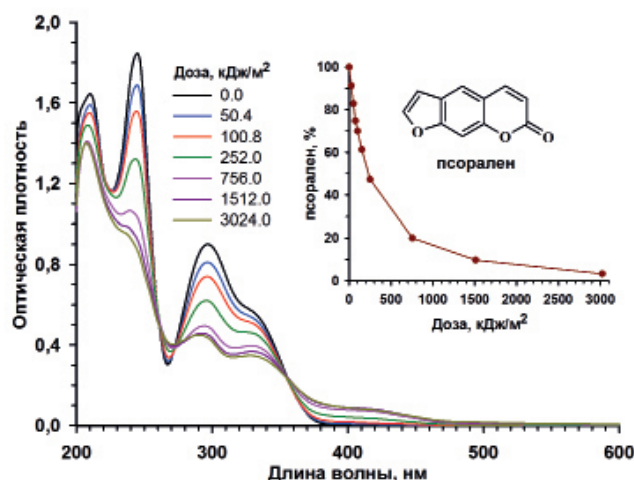


Рис. 1. Мониторинг изменений спектральных свойств растворов ФОП и фотолиза псоралена (на вставке). Условия фотоокисления и анализа – см. раздел «Экспериментальная часть».

75.6 кДж/м², соответствующей полутора минутам облучения, в растворе фотолизирует около 25% псоралена, а после 5 минут (доза 252 кДж/м²) – более половины псоралена. Далее скорость фотолиза замедляется, что может быть обусловлено накоплением в растворах фотопродуктов, поглощающих УФ-А-излучение и экранирующих поглощение света псораленом. Так, после 15 минут облучения (доза 756 кДж/м²) в растворе остается еще 20% псоралена, но после 1 часа облучения наблюдается почти полный фотолиз (остается ~3% псоралена).

Полученные спектры важны для понимания кинетики процесса фотоокисления. Если при малых дозах (до 252 кДж/м²) преобладающими являются первичные фотохимические процессы с участием псоралена, приводящие к формированию его фотопродуктов, то с дальнейшим увеличением дозы все большую роль играют вторичные фотохимические процессы с участием фотопродуктов псоралена.

Классический метод FOX-анализа гидропероксидов в водной фазе позволяет количественно оценивать гидропероксиды, содержащиеся в образцах в концентрациях не более 10 мкМ [17, 18, 20]. Мы усовершенствовали данный метод, увеличив концентрацию ХО в исследуемом образце в 10 раз (до 1 мМ), что позволило существенно расширить диапазон обнаруживаемых концентраций гидропероксидов (рис. 2).

В экспериментах нами были исследованы изменения спектров поглощения модифицированного FOX-реагента (с 10-кратным содержанием ХО) при добавлении к нему ионов Fe³⁺ в концентрациях 0–195 мкМ и H₂O₂ в концентрациях 0–100 мкМ (рис. 2). На разностных спектрах поглощения наблюдается зависимость от концентрации увеличение

поглощения в образцах. На основе полученных спектров нами были построены калибровочные концентрационные кривые, отражающие значения оптической плотности растворов при 560 нм.

Обнаружено, что при достижении определенных концентраций (157 мкМ для ионов Fe³⁺ и 50 мкМ для H₂O₂) в спектрах поглощения начинает проявляться плечо поглощения около 580–600 нм, а калибровочные кривые утрачивают свой линейный характер. Этот факт может объясняться появлением в растворах комплекса Fe[XO]₂, т. е. комплекса со стехиометрическим соотношением ионов Fe³⁺ и молекул ХО, равным 1:2. Такой комплекс характеризуется максимумом поглощения при 587 нм (при pH 2) [23], а не широким максимумом около 530–550 нм, присущим комплексу Fe[XO] при близких значениях pH [19]. Таким образом, нами определено, что модифицированный FOX-реагент с 10-кратным содержанием ХО позволяет количественно обнаруживать до 50 мкМ H₂O₂ в водных растворах.

Молярный коэффициент экстинкции при 560 нм для комплекса Fe[XO], измеряемый в системе H₂O₂–FOX и рассчитанный для линейного участка калибровочной кривой, составил

$$\varepsilon_{560}(\text{Fe}[\text{XO}]) = 26000 \pm 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1},$$

а соответствующий коэффициент, измеряемый в системе Fe³⁺–FOX, составил

$$\varepsilon_{560}(\text{Fe}[\text{XO}]) = 12300 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

Рассчитанные значения указывают на то, что один акт взаимодействия H₂O₂ с FOX-реагентом приводит к формированию, по меньшей мере, двух комплексов Fe[XO], что может объясняться следующим комплексом реакций [20, 21]:

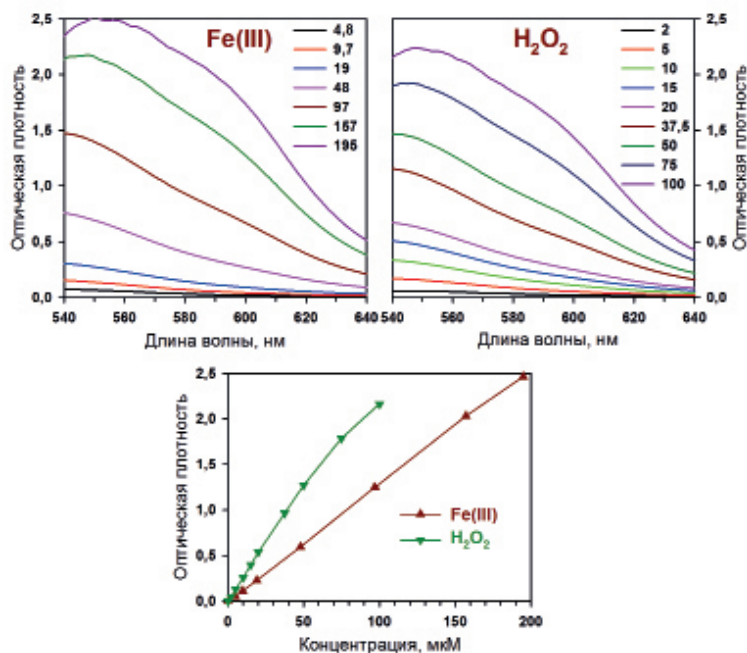
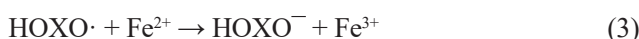
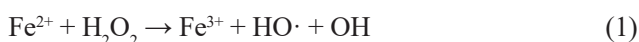


Рис. 2. Разностные спектры поглощения модифицированного FOX-реагента (с 10-кратным содержанием ХО) при добавлении к нему в различных концентрациях ионов Fe³⁺ (левая верхняя панель) и H₂O₂ (правая верхняя панель) и построенные на их основе калибровочные концентрационные кривые (нижняя панель).

Представлены данные типичного эксперимента (из 3-5 повторов).
Условия проведения – см. раздел «Экспериментальная часть».



Полученные результаты соответствуют данным, известным из литературы [20, 21], и свидетельствуют о том, что десятикратное увеличение концентрации ХО в составе модифицированного FOX-реагента не повлияло на протекание комплекса реакций, лежащего в основе метода FOX-анализа гидропероксидов.

Сделав вывод о пригодности модифицированного FOX-реагента для количественного обнаружения до 50 мкМ H₂O₂ в водной фазе, мы перешли к эксперименту по обнаружению гидропероксидов в растворах ФОП. Добавление модифицированного FOX-реагента к образцам ФОП позволило обнаружить накопление гидропероксидов в растворах ФОП, зависящее от дозы УФ-А-облучения: во всем диапазоне исследованных доз оптическая плотность раствора возрастала (рис. 3).

Учитывая тот факт, что растворы ФОП могут содержать как H₂O₂, так и другие гидропероксиды [6, 8], количественную оценку гидропероксидов проводили в условных единицах, называемых «эквивалентами H₂O₂» («экв. H₂O₂») [21]. Подобная оценка проводится в тех случаях, когда исследуемый образец может содер-

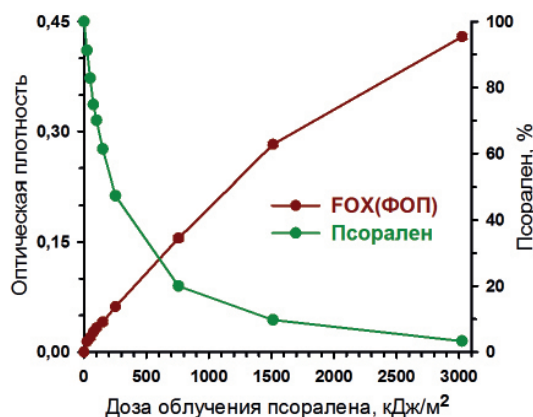


Рис. 3. Обнаружение гидропероксидов в растворах фотоокисленного псоралена. Для сравнения также представлена кривая фотолиза псоралена (см. рис. 1).

Представлены данные типичного эксперимента (из 3-5 повторов). Условия облучения и последующего анализа – см. раздел «Экспериментальная часть».

жать несколько различных по структуре гидропероксидов, а имеющиеся аналитические возможности не позволяют оценить их количественное соотношение. При проведении FOX-анализа для определения концентрации гидропероксидов, выраженной в экв. H₂O₂, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера значе-

ние оптической плотности делят на значение молярного коэффициента экстинкции при 560 нм для комплекса Fe[XO], рассчитанного при построении калибровочной кривой в системе H_2O_2 -FOX. Например, в нашем эксперименте УФ-А-облучение в дозе 252 кДж/м² приводило к продукции ~2.5 мкМ экв. H_2O_2 , а после УФ-А-облучения в дозе 1512 кДж/м² в растворе ФОП обнаруживали ~11 мкМ экв. H_2O_2 . Полученная в данной работе количественная оценка удовлетворительно согласуется с оценочными данными, ранее представленными нами в литературе [8]. В работе [8] предполагается, что УФ-А-облучение 0.14 мМ раствора псоралена в дозе 760 кДж/м² приводит к формированию ~10 мкМ экв. H_2O_2 , тогда как в данной работе FOX-анализ 0.1 мМ раствора псоралена, облученного в дозе 756 кДж/м², свидетельствует о формировании ~6 мкМ экв. H_2O_2 . В случае максимальной исследованной в данной работе дозы облучения (3024 кДж/м²) в растворе ФОП содержится ~16.5 мкМ экв. H_2O_2 .

Следует отметить, что формирование гидропероксидов в растворах ФОП продолжается и в диапазоне больших доз облучения (более 1512 кДж/м²), при которых содержание псоралена так мало (менее 10%), что

Список литературы / References:

1. Racz E., Prens E.P. Phototherapy and photochemotherapy for psoriasis. *Dermatol. Clin.* 2015; 33: 79-89.
2. Trautinger F., Just U., Knobler R. Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy). *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013; 12: 22-28.
3. Caffieri S. Furocoumarin photolysis: Chemical and biological aspects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1: 149-157.
4. Potapenko A.Ya., Kyagova A.A., Bezdetnaya L.N., Lysenko E.P., Chernyakhovskaya I.Yu., Bekhalo V.A., Nagurskaya E.V., Nesterenko V.A., Korotky N.G., Akhtyamov S.N., Lanshchikova T.M. Products of psoralen photooxidation possess immunomodulative and antileukemic effects. *Photochem. Photobiol.* 1994; 60: 171-174.
5. Kyagova A.A., Malakhov M.V., Potapenko A.Ya. Immunosuppression caused by photochemo and photodynamic therapy: Focus on photosensitizer photoproducts. In: Taylor C.B., ed. *Immunosuppression: New research.* Nova Science Publishers, 2009: 167-183.
6. Nevezhin E.V., Vlasova N.V., Pyatnitskiy I.A., Lysenko E.P., Malakhov M.V. On the mechanism of erythrocyte hemolysis induced by photooxidized psoralen. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80(6): 763-768.
7. Potapenko A.Y., Saporov S.M., Agamalieva M.A., Lysenko E.P., Bezdetnaya L.N., Sukhorukov V.L. Fe^{2+} ions and reduced glutathione – chemical activators of psoralen-sensitized photohaemolysis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1993; 17: 69-75.

образование гидропероксидов может объясняться лишь вторичными фотохимическими процессами с участием фотопродуктов псоралена. Таким процессом, например, может являться например: фотоиндуцированное автоокисление фотопродуктов альдегидной природы [14], некоторые из которых были идентифицированы в растворах фотоокисленного псоралена [3, 13].

Заключение

Применение модифицированного FOX-реагента, с 10-кратным содержанием ксиленолового оранжевого, позволяет расширить диапазон концентраций гидропероксидов, количественно обнаруживаемых в водной фазе, с 10 до 50 мкМ. Количественно оценено содержание гидропероксидов в растворах фотоокисленного псоралена: продукция гидропероксидов растет с увеличением дозы УФ-А-облучения и достигает ~16.5 мкМ экв. H_2O_2 в случае максимальной исследованной дозы облучения (3024 кДж/м²). Сравнение кинетики фотолиза псоралена и формирования гидропероксидов позволяет сделать вывод об участии фотопродуктов псоралена в генерации гидропероксидов.

8. Lysenko E.P., Melnikova V.O., Andina E.S., Wunderlich S., Pliquet F., Potapenko A.Y. Effects of glutathione peroxidase and catalase on hemolysis and methemoglobin modifications induced by photooxidized psoralen. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2000; 56: 187-195.
9. Potapenko A.Ya., Kyagova A.A., Andina E.S., Zhuravel N.N., Lysenko E.P., Möller M., Stopper H., Adam W., Saha-Möller C.R. Photohemolysis sensitized by the furocoumarin imperatorin and its oxyfunctionalized derivatives. *Photochem. Photobiol.* 1999; 69: 410-420.
10. Kyagova A., Potapenko A., Möller M., Stopper H., Adam W. Photohemolysis sensitized by the furocoumarin derivative alloimperatorin and its hydroperoxide photooxidation product. *Photochem. Photobiol.* 2014; 90: 162-170.
11. Rodenko I.N., Osipov A.N., Lysenko E.P., Potapenko A.Y. Degradation of psoralen photooxidation products induced by ferrous ions. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1993; 19: 39-48.
12. Potapenko A.Ya., Malakhov M.V., Kyagova A.A. Photobiophysics of furocoumarins. *Biophysics.* 2004; 49(2): 307-324.
13. Marley K.A., Larson R.A. A new photoproduct from furocoumarin photolysis in dilute aqueous solution: 5-formyl-6-hydroxybenzofuran. *Photochem. Photobiol.* 1994; 59: 503-505.
14. Marley K.A., Larson R.A., Davenport R. Alternative mechanisms of psoralen phototoxicity. *ACS Symposium Series.* 1995; 616 (Ch. 15): 179-188
15. Aboul-Enein H.Y., Kladna A., Kruk I., Lichtszeld K., Michalska T. Effect of psoralens on

Fenton-like reaction generating reactive oxygen species. *Biopolymers*. 2003; 72(1): 59-68.

16. Gupta B.L. Microdetermination techniques for H_2O_2 in irradiated solutions. *Microchem. J.* 1973; 18: 363-374.

17. Jiang Z.Y., Woollard A.C., Wolff S.P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 1990; 268: 69-71.

18. Wolff S. Ferrous Ion oxidation in presence of ferric ion indicator Xylenol Orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*. 1994; 233: 182-189.

19. Gay C., Collins J., Gebicki J. Determination of iron in solutions with the ferric-Xylenol Orange complex. *Anal. Biochem.* 1999; 273: 143-148.

20. Gay C., Collins J., Gebicki J. Hydroperoxide

assay with the ferric-Xylenol Orange complex. *Anal. Biochem.* 1999; 273: 149-155.

21. Bou R., Codony R., Tres A., Decker E., Guardiola F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-Xylenol Orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* 2008; 377: 1-15.

22. Winterbourne C.C., Parsons-Mair H.N., Gebicki S.M., Gebicki J.M., Davies M.J. Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *Biochem. J.* 2004; 381: 241-248.

23. Mizuguchi H., Takao Y. Visual threshold detection of trace metal ions using a bi-functional metallochromic reagent. *Analytical Sci.* 2001; 17 (Suppl.): 1687-1689.

Об авторах:

Скарга Владислав Викторович, лаборант-исследователь отдела медицинской химии и токсикологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Невежин Евгений Викторович, аспирант кафедры физики и математики, лаборант-исследователь отдела медицинской химии и токсикологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Матросов Антон Александрович, лаборант-исследователь отдела медицинской химии и токсикологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Негребецкий Вадим Витальевич, доктор химических наук, профессор РАН, заведующий отделом медицинской химии и токсикологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Малахов Михаил Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела медицинской химии и токсикологии, доцент кафедры физики и математики ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

About the authors:

Vladislav V. Skarga, Research Analyst, Medical Chemistry and Toxicology Unit, Pirogov Russian National Research Medical University (1, Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia).

Evgeny V. Nevezhin, Postgraduate Student of the Chair of Physics and Mathematics; Research Analyst, Medical Chemistry and Toxicology Unit, Pirogov Russian National Research Medical University (1, Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia).

Anton A. Matrosov, Research Analyst, Medical Chemistry and Toxicology Unit, Pirogov Russian National Research Medical University (1, Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia).

Vadim V. Negrebetsky, D.Sc. (Chemistry), Professor of RAS, Head of the Medical Chemistry and Toxicology Unit, Pirogov Russian National Research Medical University (1, Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia).

Mikhail V. Malakhov, Ph.D. (Biology), Leading Researcher of the Medical Chemistry and Toxicology Unit; Associate Professor of the Chair of Physics and Mathematics, Pirogov Russian National Research Medical University (1, Ostrovityanova Str., Moscow 117997, Russia).

Для цитирования: Скарга В.В., Невежин Е.В., Матросов А.А., Негребецкий В.В., Малахов М.В. Обнаружение гидропероксидов в растворах фотоокисленного псоралена // Тонкие химические технологии / Fine Chemical Technologies. 2019. Т. 14. № 1. С. 32–38. DOI: 10.32362/2410-6593-2019-14-1-32-38

For citation: Skarga V.V., Nevezhin E.V., Matrosov A.A., Negrebetsky V.V., Malakhov M.V. Detection of hydroperoxides in photooxidized psoralen solutions. *Tonkie khimicheskie tekhnologii / Fine Chemical Technologies*. 2019; 14(1): 32-38. (in Russ.). DOI: 10.32362/2410-6593-2019-14-1-32-38