

УДК 577.152.1.01:7+541.516:57.042.2+633.241

М. В. ПОТАПОВИЧ¹, А. Г. БОГАЧЕВСКАЯ², Д. И. МЕТЕЛИЦА², О. И. ШАДЫРО²

ВЛИЯНИЕ ДИМЕТИЛФОРМАМИДА НА ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА И ЕГО ИНГИБИРОВАНИЕ

¹НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета,

²Химический факультет Белорусского государственного университета

(Поступила в редакцию 09.11.2013)

Современная биотехнология и инженерная энзимология выдвигает требования по использованию ферментов в неводных средах, так как проведение ферментативного процесса в них часто предпочтительнее, чем в воде [1, 2]. В иммуноферментном анализе, например, приходится модифицировать ферменты труднорастворимыми в воде соединениями для получения конъюгатов со стероидами, канцерогенами и токсикантами окружающей среды – объектами количественного иммунохимического определения [3]. Наряду с постоянной практической потребностью изучение ферментативных процессов в нетрадиционных неводных средах имеет несомненное фундаментальное значение, так как они часто сопровождаются изменением активности, специфичности и региоселективности биокатализаторов [1, 2, 4].

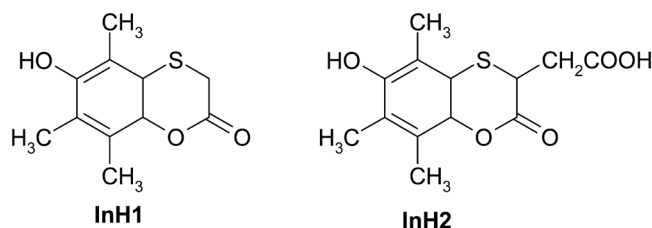
Пероксидаза из корней (КФ 1.11.1.7, ПХ) широко используется в иммуноферментном анализе [3, 5] и органическом синтезе [6]. К сожалению, имеющихся сведений о воздействии водно-органических смесей на ПХ явно недостаточно [7], несмотря на практическую важность превращений ПХ в смесях буферных растворов с органическими соразтворителями. Ингибирование пероксидазных реакций в водно-органических смесях до сих пор не изучено вообще, хотя такие процессы занимают важное место при определении общей антиоксидантной активности (ОАА) многих объектов анализа, труднорастворимых или нерастворимых совсем в водных средах [8].

В водно-органических смесях наиболее детально изучена каталитическая активность дегидрогеназ [9, 10]. В зависимости от природы фермента и лимитирующей стадии ферментативного процесса в водно-органических смесях может кинетически проявляться изменение вязкости среды [9, 10] и ее диэлектрической проницаемости [11, 12]. С увеличением диэлектрической проницаемости среды зарегистрировано систематическое изменение каталитических констант глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [12] и констант Михаэлиса K_M формиатдегидрогеназы из метилотрофных бактерий [11]; на кинетических характеристиках лактатдегидрогеназы сильно сказывается изменение вязкости водно-органических смесей [9,10].

Цель настоящей работы – кинетическое исследование влияния концентрации диметилформамида (ДМФ) в его смесях с фосфатно-цитратным буфером (ФЦБ) на пероксидазное окисление 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и ингибирование этого процесса двумя аналогами α -токоферола, содержащими атомы кислорода и серы в гетероциклическом фрагменте, и получение зависимостей кинетических параметров k_{cat} , K_M и константы ингибирования K_i от растущей концентрации ДМФ.

Методика эксперимента. Использовали изоэнзим С пероксидазы хрена с оптическим показателем чистоты $RZ = 3,25$ производства «Biozyme Ltd», Vlaenavon (Великобритания). Концентрацию ПХ определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon(403 \text{ нм})$, равный $102\,000 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [13]. В качестве окисляющего субстрата ПХ применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически с использова-

нием $\epsilon(230 \text{ нм}) 72,4 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [14]. В качестве восстанавливающего субстрата ПХ использовали ТМБ («Fluka», Швейцария). Для ингибирования пероксидазного окисления применяли два аналога α -токоферола, синтезированные и любезно предоставленные нам доцентом кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий Г. И. Полозовым, InH1 и InH2 с молекулярными массами 224 и 282 соответственно:



Для приготовления 0,015 М ФЦБ с pH 6,0 и 6,4 применяли соли и лимонную кислоту производства «Реахим», Россия. Реакционная среда содержала 0,015 М ФЦБ и ДМФ, концентрацию которого меняли в диапазоне 3–30 об.%, что обеспечивало полную растворимость субстрата ТМБ и ингибиторов. На основании данных монографий [15,16] по уравнению Зильберштейна вычислены диэлектрические постоянные ϵ смесей ФЦБ-ДМФ, представленные ниже:

Содержание ДМФ, %	0	3	6	10	15	20	25	30
Диэлектрическая проницаемость смеси, ϵ	78,5	77,3	76,0	74,3	72,2	70,1	68,0	66,0

Пероксидазное окисление ТМБ проводили при 20⁰С на приборе «Specol-211» («Carl Zeiss», Германия) с термостатируемым кюветным отделением в смесях 15 мМ ФЦБ-ДМФ при pH 6,0 и 6,4. Окисление ТМБ в присутствии ингибиторов и без них проводили при концентрациях ПХ – 0,3 нМ и H₂O₂ – 2,0 мМ и различных концентрациях ТМБ и ингибиторов. Реакции начинали добавлением раствора H₂O₂ и в течение 1–2 мин регистрировали светопоглощение продукта окисления ТМБ в его максимуме (655 нм). При расчете начальных скоростей реакции использовали молярный коэффициент поглощения продукта окисления ТМБ $\epsilon(655 \text{ нм})$, равный 39000 М⁻¹·см⁻¹ [13].

Определение начальных скоростей и кинетических констант окисления ТМБ. Начальные скорости окисления ТМБ ν_0 определяли по строго линейным начальным участкам кинетических кривых «A₆₅₅-время», отражающим в терминах оптической плотности рост концентрации продукта окисления ТМБ. Строили кинетические зависимости Михаэлиса–Ментен (ν_0 -[ТМБ]₀) и их линейные анаморфозы в координатах Лайнуивера–Берка ($1/\nu_0 - 1/[\text{ТМБ}]_0$) и/или Иди–Хофсти ($\nu_0 - \nu_0/[\text{ТМБ}]_0$), из которых графически определяли максимальную скорость V_{max} , k_{cat} (с⁻¹) и K_M (мкМ), а также эффективность фермента k_{cat}/K_M (М⁻¹·с⁻¹) [17]. Величину k_{cat} вычисляли из равенства $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \times [E]_0$, где $[E]_0$ – начальная концентрация ПХ.

Ингибиторный анализ. Тип ингибирования пероксидазного окисления ТМБ определяли из зависимостей Лайнуивера–Берка, Диксона ($1/\nu_0 - [InH]_0$) и Корниш–Боудена ($[\text{ТМБ}]_0/\nu_0 - [InH]_0$) [18]. Количественной характеристикой ингибирования пероксидазного окисления является константа ингибирования K_i в мкМ [8]. Для определения K_i использовали линейные зависимости ингибированного окисления ТМБ в координатах Диксона или Корниш–Боудена, как описано в монографии [18].

Результаты и их обсуждение. Влияние ДМФ на пероксидазное окисление ТМБ. При всех концентрациях ДМФ в реакционной среде в интервале 3–30 % зависимости начальной скорости окисления ТМБ ν_0 от его начальной концентрации подчиняются уравнению Михаэлиса–Ментен, что подтверждается линейными анаморфозами зависимостей в координатах Лайнуивера–Берка (а) и Иди–Хофсти (б) при содержании ДМФ в смеси 10 % (рис. 1, а, б). Из зависимостей определены кинетические параметры пероксидазного окисления ТМБ для разных концентраций ДМФ и представлены в табл. 1, из которой следует, что с ростом содержания ДМФ в реакционной смеси константа Михаэлиса K_M практически не меняется, а максимальная скорость окисления ТМБ V_{max} , k_{cat} и эффективность ПХ k_{cat}/K_M сильно снижаются: V_{max} – в 5,5, k_{cat} – в 5,5 и k_{cat}/K_M – в 5 раз.

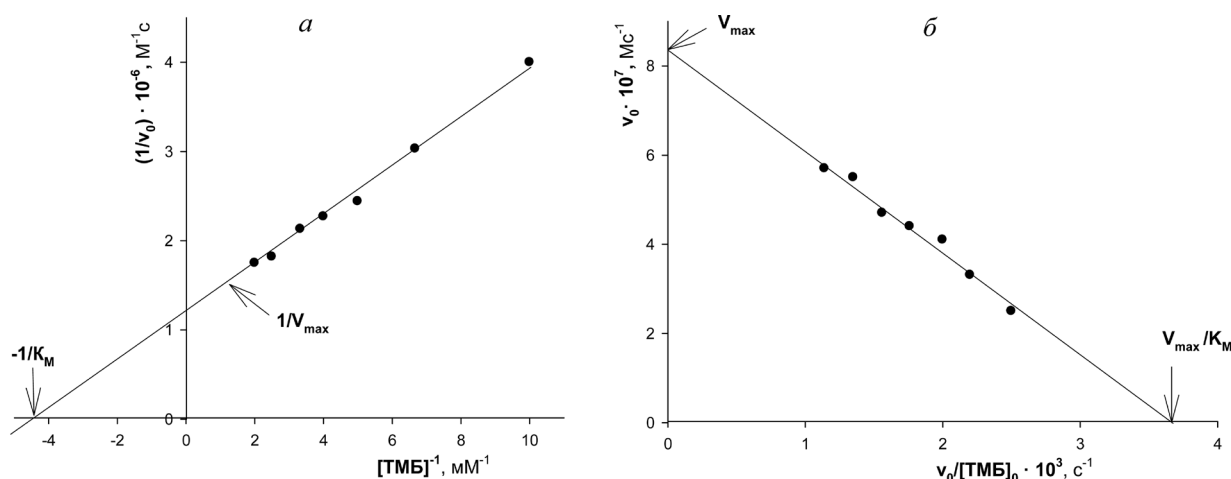


Рис. 1. Линейные анаморфозы зависимости Михаэлиса–Ментен при пероксидазном окислении ТМБ в координатах Лайнуивера–Берка (а) и Иди–Хофсти (б): 15 мМ ФЦБ, рН 6,0, содержащей 10 % ДМФ, 0,3 нМ ПХ, 2,0 мМ H_2O_2

Т а б л и ц а 1. Кинетические параметры пероксидазного окисления ТМБ при различных концентрациях ДМФ: 20 °С, 15 мМ ФЦБ, рН 6,0, [ПХ]=0,3 нМ, 2 мМ H_2O_2

ДМФ, %	$K_M \times 10^4$, М	$V_{\max} \times 10^6$, Мс ⁻¹	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$, с ⁻¹	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^{-6}$, М ⁻¹ с ⁻¹	$(\varepsilon-1)/(2\varepsilon+1)$
3	2,04	1,44	4,81	23,6	0,4904
6	2,3	1,25	4,16	13,8	0,4902
10	2,2	0,77	2,56	11,7	0,4899
15	2,13	0,67	2,22	10,4	0,4896
20	2,08	0,59	1,96	9,4	0,4893
25	2,2	0,38	1,28	5,8	0,4891
30	2,0	0,26	0,87	4,7	0,4887

На рис. 2 в координатах Лайнуивера–Берка приведены зависимости, полученные при разном содержании ДМФ в среде, подтверждающие *неконкурентный тип тингбирования* пероксидазного окисления ТМБ при растущей концентрации органического соразтворителя. На рис. 3, а в полулогарифмических координатах представлена линейная зависимость $\lg k_{\text{cat}}$ от содержания ДМФ в среде: экстраполяция этой зависимости до оси ординат позволила получить $k_{\text{cat}} = 6,0 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$ для среды ФЦБ без добавки ДМФ.

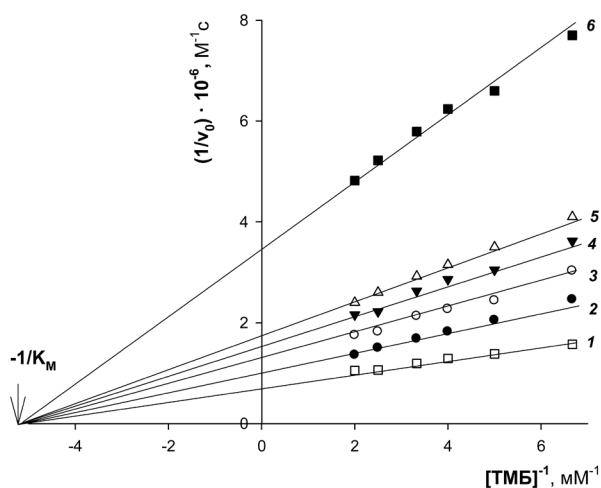


Рис. 2. Зависимости начальной скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации в обратных координатах при разном содержании ДМФ в смеси с 15 мМ ФЦБ, рН 6,0: 1 – 3, 2 – 6, 3 – 10, 4 – 15, 5 – 20 и 6 – 25 % ДМФ; 0,3 нМ ПХ, 2,0 мМ H_2O_2

Из табл. 1 и рис. 2 следует, что константа Михаэлиса K_M с ростом содержания ДМФ в среде с 3 до 30 % практически не меняется; так как K_M отражает сродство субстрата к ферменту, можно считать, что органический соразтворитель не нарушает взаимодействия гидрофобного субстрата ТМБ с аминокислотной последовательностью Phe–His–Asp–Cys–Phe–Val в координирующей дистальной области гема, которая, как принято считать, участвует в связывании субстратов с ПХ [19]. Важно отметить, что с ростом концентрации ДМФ в среде не меняется величина K_M при пероксидазном окислении гидрофильного субстрата ПХ *орто*-фенилендиамин [7], т. е. и в этом случае на координирующую аминокислотную последовательность ДМФ не оказывает деформирующего действия.

В отличие от K_M величины k_{cat} и k_{cat}/K_M существенно снижаются с ростом содержания ДМФ

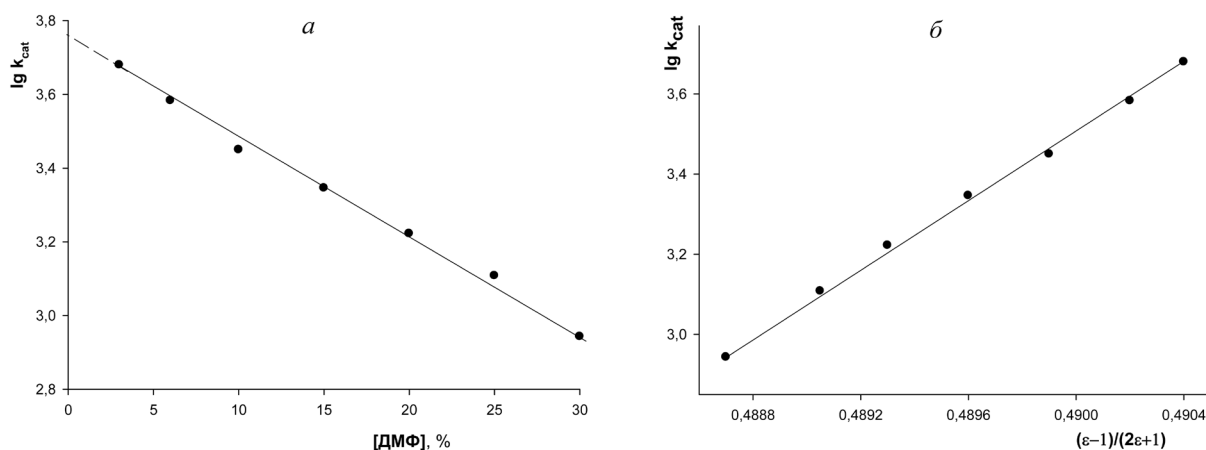


Рис. 3. Зависимости каталитической константы окисления ТМБ от содержания ДМФ в водно-органической среде (а) и от функции Онзагера–Кирквуда $(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ (б): 15 мМ ФЦБ, рН 6,0, 0,3 нМ ПХ, 2,0 мМ H_2O_2

в среде (табл. 1, рис. 3, а), т. е. органический соразтворитель дезактивирует ПХ вследствие неспецифической сольватации белковой глобулы при взаимодействии с ферментом. Это подтверждается ингибирующим действием ДМФ на пероксидазное окисление ТМБ по неконкурентному типу, что означает взаимодействие ДМФ с ПХ вне активного центра фермента (рис. 2): если бы ДМФ попадал в гидрофобную полость активного центра, то ингибирование было бы конкурентным. Неспецифическая сольватация белковой глобулы ПХ при возрастающей концентрации ДМФ приводит к замене молекул воды, структурирующих белок, молекулами ДМФ, что нарушает конформацию белка и, как следствие, снижает его каталитическую активность, приводя к частичной инактивации и полной потере активности при содержании ДМФ > 50 % [7].

Неспецифическая сольватация может быть неполярной (дисперсионной) и электростатической (кулоновской), т. е. обусловленной силами, действующими благодаря электростатическому взаимодействию реагирующих частиц со средой [20]. Учет электростатической составляющей неспецифической сольватации впервые дан Кирквудом и Мартином, которые показали зависимость свободной энергии от диэлектрической постоянной [21]:

$$\Delta F = -\frac{\mu}{r^3} \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} \right), \quad (1)$$

где μ – дипольный момент, а r – эффективный радиус диполя. В дальнейшем Лейдлер и Эйринг связали константу скорости реакций полярных молекул в растворе с полярностью среды:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{1}{kT} \frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} \left(\frac{\mu_A^2}{r_A^3} + \frac{\mu_B^2}{r_B^3} - \frac{\mu_{A-B}^2}{r_{A-B}^3} \right). \quad (2)$$

Уравнение (2) Кирквуда–Лейдлера–Эйринга широко используется для описания зависимости скорости различных реакций от диэлектрической постоянной среды [20 и ссылки в этой монографии]. Из анализа уравнения (2) видно, что для определенной реакции в различных растворителях зависимость скорости от ϵ в координатах $\lg k - (\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ (функция Онзагера–Кирквуда) должна быть линейной [20,21].

На рис. 3, б представлена полученная нами зависимость $\lg k_{cat}$ от $(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ при пероксидазном окислении ТМБ в смеси ФЦБ-ДМФ, которая является строго линейной. Это означает, что в нашем случае кулоновское взаимодействие реагирующих частиц со средой является важным фактором, обуславливающим влияние среды на константу скорости реакции. Считается, что при пероксидазном окислении ароматических аминов лимитирующей стадией является взаимодействие амина с активным комплексом II пероксидазы по радикальному механизму [19,22]. Если это реализуется в нашем случае, то зависимость может отражать влияние ϵ среды на дипольную молекулу ТМБ в условиях эксперимента.

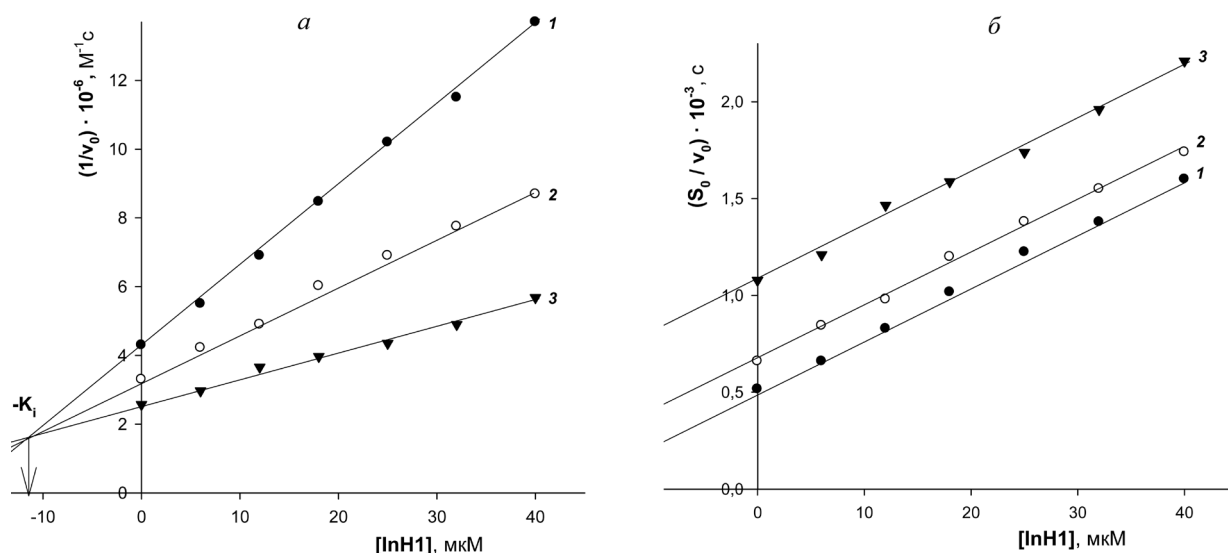


Рис. 4. Зависимости обратной скорости окисления ТМБ от начальной концентрации ингибитора InH1 (координаты Диксона) (а) и зависимости ингибированного окисления ТМБ в координатах Корниш–Боудена (б) при разных концентрациях ТМБ: 1 – 0,12, 2 – 0,2 и 3 – 0,4 мМ ТМБ; 15 мМ ФЦБ, рН 6,4, 10 % ДМФ, 0,3 нМ ПХ и 2,0 мМ H₂O₂

Влияние ДМФ на ингибирование пероксидазного окисления ТМБ. Ингибирование пероксидазного окисления ТМБ аналогами α-токоферола InH1 и InH2 в зависимости от содержания ДМФ (6–25 %) изучено в стандартных условиях: 20 °С, 15 мМ ФЦБ, рН 6,4, 0,3 нМ ПХ, 2 мМ H₂O₂, различные концентрации ингибиторов при разном содержании ДМФ в среде. Во всех случаях начальная скорость ингибированного окисления ТМБ в зависимости от его концентрации описывалась уравнением Михаэлиса–Ментен. На рис. 4 представлены зависимости обратной скорости окисления ТМБ от возрастающей концентрации InH1 при разных концентрациях ТМБ в координатах Диксона (а) и в координатах Корниш–Боудена (б), которые однозначно доказывают **конкурентный тип ингибирования**. По данным рис. 4, а определена константа ингибирования для InH1 при содержании в среде 10 % ДМФ, равная 11,7 мкМ, что свидетельствует о высокой ингибирующей способности замещенного фенола InH1 в пероксидажном окислении ТМБ.

Аналогичные зависимости получены в тех же условиях для ингибитора InH2, доказывающие конкурентный тип: величина K_i при содержании в среде 10 % ДМФ равна 6,3 мкМ, т. е. в сопоставимых условиях InH2 почти в 2 раза более эффективен как ингибитор, чем InH1. Описанный выше алгоритм исследования был использован для характеристики обоих ингибиторов при раз-

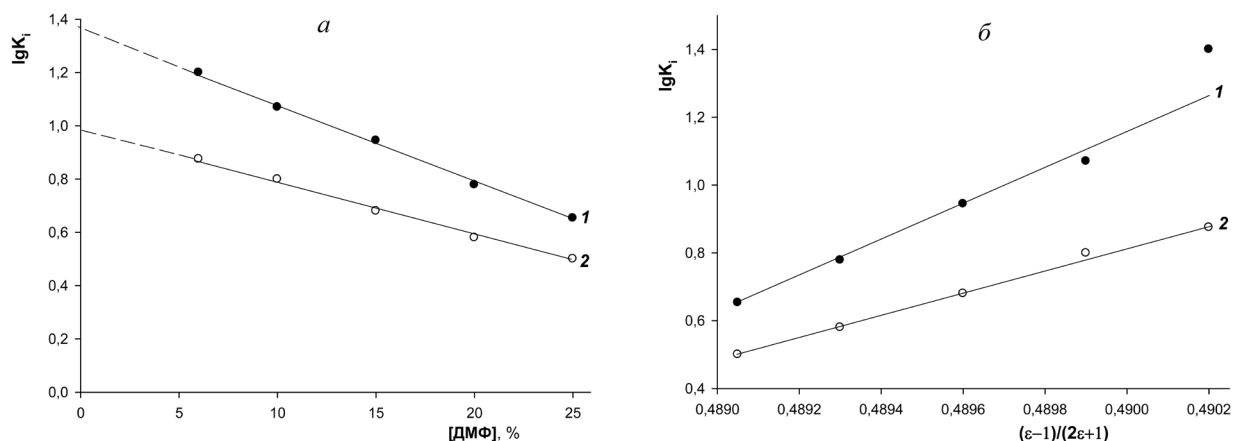


Рис. 5. Зависимости константы ингибирования K_i при пероксидажном окислении ТМБ с участием InH1 (1) и InH2 (2) в полулогарифмических координатах от содержания ДМФ в водно-органической среде (а) и от функции Онзагера–Кирквуда (б): 15 мМ ФЦБ, рН 6,4, 0,3 нМ ПХ и 2,0 мМ H₂O₂

личных концентрациях ДМФ в среде. Полученные значения констант ингибирования K_i сопоставлены в табл. 2, из которой следует, что с ростом содержания ДМФ в реакционной смеси константы ингибирования для обоих соединений существенно снижаются: в 5,4 раза для InH1 и в 3,1 раза для InH2, т. е. эффективность ингибирования значительно возрастает при увеличении концентрации ДМФ в среде. При разных концентрациях ДМФ величины K_i для InH2 приблизительно в 2 раза ниже, чем для InH1, т. е. при всех концентрациях ДМФ InH2 более эффективен.

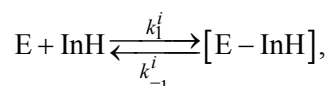
Таблица 2. Характеристики ингибирования пероксидазного окисления ТМБ соединениями InH1 и InH2 при различных концентрациях ДМФ: 15 мМ ЦФБ, pH 6,4, 0,3 мМ ПХ, 2 мМ H_2O_2

ДМФ, %	K_i , мкМ	
	InH1	InH2
0	24,5*	10,0*
6	15,8	7,5
10	11,7	6,3
15	8,8	4,8
20	6,0	3,8
25	4,5	3,2

Примечание. *Величины K_i определены экстраполяцией зависимостей на ось ординат (рис. 5, а).

На рис. 5, а в полулогарифмических координатах сопоставлены зависимости $\lg K_i$ от содержания ДМФ в среде, которые линейны для обоих ингибиторов. Экстраполяцией зависимостей до оси ординат определены величины K_i для InH1 и InH2 в среде ФЦБ, pH 6,4 в отсутствие ДМФ (табл. 2).

На рис. 5, б показаны зависимости $\lg K_i$ от диэлектрической постоянной (функция Онзагера–Кирквуда), которые линейны для обоих ингибиторов, что отражает возможную роль электростатических взаимодействий при связывании ингибиторов с ферментом. Обратимое конкурентное ингибирование предполагает реализацию равновесия:

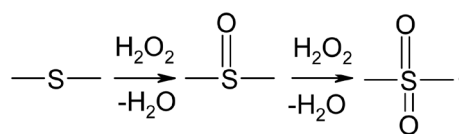


которое характеризуется константой ингибирования $K_i = \frac{[E][InH]}{[E - InH]} = \frac{k_{-1}^i}{k_1^i}$.

Из определения K_i следует, что ДМФ может влиять на фермент (E), ингибитор (InH) и процесс их взаимодействия (константы скорости k_1^i и k_{-1}^i). Полученные нами данные могут быть объяснены с учетом реализации всех трех возможностей: влияние растущих концентраций ДМФ на ПХ (вытеснение структурирующих молекул H_2O соразтворителем), на InH (неспецифическая сольватация молекул ингибиторов) и на взаимодействие ПХ-InH, в котором важную роль играют электростатические силы, что подтверждается линейными зависимостями $\lg K_i - (\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ (рис. 5, б). К существенному снижению K_i приводит действие трех перечисленных факторов, способствующих повышению ингибирующей активности InH.

Главным условием высокого ингибирующего действия обоих соединений InH1 и InH2 является наличие у них фенольной HO-группы, которая представляет собой основной радикал-акцептирующий центр. Второй по важности фактор – наличие и число метильных заместителей в бензольном кольце, так как их электронодонорный характер способствует снижению энергии HO-связи и повышению реакционной способности этих аналогов α -токоферолов. Как известно, алкильные группы влияют на спиновую плотность в образующихся радикалах, что вносит вклад в повышение их стабильности [23]. Полной потери ингибирующей активности не наблюдается

ни у одного из ингибиторов, что может быть связано с участием атомов серы гетероциклического фрагмента их молекул в гетеролитическом разложении окисляющего субстрата H_2O_2 по известной последовательности реакций [24]:



Авторы выражают благодарность кандидату химических наук Г. И. Полозову, синтезировавшему и предоставившему нам ингибиторы – аналоги α -токоферола.

Литература

1. Klibanov A. M. // Chemtech. 1986. Vol. 16. P. 354–358.
2. Khmelnsky Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K. // Enzyme Microb. Tekhnol. 1988. Vol. 10. P. 710–724.
3. Иммуноферментный анализ / Ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988.
4. Артёмчик В. Д., Метелица Д. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1989. Т. 25, № 5. С. 644–650.
5. Новые направления в развитии иммунологических методов анализа / Ред. А. М. Егоров. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 24. М.: ВИНТИ, 1990.
6. Bryan J. J. // Tetrahedron. 1986. Vol. 42, N 3. P. 3351–3403.
7. Пучкаев А. В., Метелица Д. И. // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. 1992. № 1. С. 78–83.
8. Метелица Д. И., Карасёва Е. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2007. Т. 43, № 5. С. 537–564.
9. Сабурова Е. А., Каменчук О. И., Демченко А. П. // Молек. биология. 1988. Т. 22, № 3. С. 718–725.
10. Demchenko A. P., Rusyn O. T., Saburova E. A. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. Vol. 988. P. 196–203.
11. Demchenko A. P., Rusyn O. T., Egorov A. M., Tishkov V. I. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1039. P. 290–296.
12. Пучкаев А. В., Метелица Д. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1992. Т. 28, № 1. С. 27–32.
13. Метелица Д. И., Савенкова М. И., Курченко В. П. // Прикл. биохимия и микробиол. 1987. Т. 23, № 1. С. 116–124.
14. Справочник химика / Ред. Б. П. Никольский. Л.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
15. Эме Ф. Диэлектрические измерения. М.: Химия, 1967. С. 123.
16. Райхардт К. Растворители в органической химии. Л.: Химия, 1973. С. 137–138.
17. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2.
18. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–200.
19. Газарян И. Г. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. М.: ВИНТИ, 1992. С. 4–54.
20. Эмануэль Н. М., Заиков Г. Е., Майзус З. К. Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений. М.: Наука, 1973. С. 65–70.
21. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир, 1991. С. 272–322.
22. Метелица Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. С. 25–36.
23. Бурлакова Е. Б., Бушелев С. И., Шимовский И. Л. // Химическая физика. 1989. Т. 8, № 11. С. 1471–1474.
24. Harris R. Z., Newmyer S. L., Ortiz de Montellano P. R. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 263, N 3. P. 1637–1645.

M. V. POTAPOVICH, A. G. BOGACHEVSKAYA, D. I. METELITZA, O. I. SHADYRO

DIMETHYLFORMAMIDE EFFECT ON THE PEROXIDASE-CATALYZED OXIDATION OF TETRAMETHYLBENZIDINE AND ITS INHIBITION

Summary

The kinetics of the peroxidase-catalyzed tetramethylbenzidine (TMB) oxidation has been studied in phosphate-citrate buffer (pH 6.0 and 6.4), containing 3–25 % of dimethylformamide (DMF), at 20 °C. The relationship between DMF concentration and kinetic parameters k_{cat} , K_M and k_{cat}/K_M has been determined. It has been shown that $\lg k_{\text{cat}}$ linearly decreased with increasing DMF concentration, whereas K_M value did not change. Kinetics of peroxidase-dependent TMB oxidation inhibition by two synthetic sulphur-containing α -tocopherol analogs at various DMF concentrations (3–25%) has been studied, and the inhibition constants K_i have been determined. It has been shown that with increasing DMF concentration, K_i values decreased from 15.8 to 3.2 μM . This fact is accounted for by DMF effect on the structures of peroxidase and inhibitors, as well as on their interaction, where the electrostatic interactions play a great part, since $\lg K_i$ is linearly dependent on $(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$, where ϵ is the dielectric constant of the reaction medium.