

**АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ЛИГНИНА
ГВАЯЦИЛОВОГО И СИРИНГИЛОВОГО РЯДОВ****М.В. Потапович, В.П. Курченко¹, Д.И. Метелица, О.И. Шадыро***НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск,
Республика Беларусь;**¹Белорусский государственный университет, Биологический факультет, Минск,
Республика Беларусь***Введение**

Системы, содержащие биокатализаторы гемин, метмиоглобин, метгемоглобин или метгемальбумины (MetHa) и H_2O_2 или органический гидропероксид в качестве окислителей, принято называть псевдопероксидазными. Ранее нами проведен цикл исследований по инициированию и ингибированию радикальных процессов в системах «гемин (метгемальбумины)- $H_2O_2(ROOH)$ », результаты которых изложены в работах [1-5] и обзоре [6]. Псевдопероксидазные системы «MetHa- H_2O_2 - $ArNH_2$ », в которых $ArNH_2$ – ароматические амины (орто-фенилендиамин (ФДА) или тетраметилбензидин (ТМБ)), успешно использованы нами для тестирования многочисленных ингибиторов (антиоксидантов) – замещенных фенолов, многоатомных фенолов и их полидисульфидов, аминифенолов, а также флавоноидов растительного происхождения [6,7]. Метод конкурирующих реакций свободных радикалов, образующихся в гембелковых пероксидных системах, с ФДА или ТМБ, с одной стороны, и с антиоксидантами фенольной природы InH, с другой стороны, использован для характеристики и скрининга многочисленных ингибиторов свободнорадикальных процессов.

Использование псевдопероксидазной системы MetHa- H_2O_2 -ФДА (ТМБ) представляет большой практический интерес для тестирования потенциальных антиоксидантов природного происхождения, в частности фенолов, содержащих альдегидные и кислотные заместители, – производных лигнина гваяцилового и сиригилового рядов. Среди многочисленных продуктов превращения лигнина древесины дуба особого внимания заслуживают ароматические соединения гваяцилового ряда с одной метокси-группой в бензольном кольце – конифериловый альдегид, ванилин и ванилиновая кислота – и сиригилового ряда с двумя метокси-группами – синаповый альдегид, сиреневый альдегид и сиреневая кислота (структура этих соединений представлена в табл. 1). Перечисленные соединения образуются на начальных этапах выдержки коньячного спирта в процессе этанолиза и гидролиза лигнинового комплекса [8]: содержание этих веществ при выдержке закономерно возрастает и в существенной степени определяет качество коньяка или любого другого алкогольного продукта.

Антиоксидантные свойства коньяков давно и хорошо известны [9]. Важно оценить антиоксидантную активность производных лигнина гваяцилового и сиригилового рядов, в возрастающей концентрации образующихся при выдержке коньячного спирта.

Цель данной работы – сравнительная количественная характеристика антиоксидантных свойств (ингибирующей активности) 8 соединений фенольной природы – гидроксикумаровой (I) и кофейной (II) кислот, кониферилового альдегида (III), ванилина (IV) и ванилиновой кислоты (V), синапового (VI) и сиреневого (VII) альдегида, сиреневой кислоты (VIII) с использованием псевдопероксидазной системы метгемальбумин (MetHa)- H_2O_2 -ФДА (ТМБ), инициирующей радикалы $HO^\bullet$.

Материалы и методы исследования

Реагенты. Использовали гемин фирмы «Serva» (Германия), раствор которого готовили в ДМСО. Для получения метгемальбумина применяли бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma» (США) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения молярный коэффициент поглощения (280нм) $35000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Состав биокатализатора характеризовался соотношением компонентов 10

мкМ гемина / 5 мкМ БСА. В качестве субстратов-акцепторов радикалов применяли ФДА фирмы «Fluka» (Швейцария) и ТМБ (“Serva”, Германия), а в качестве субстрата-окислителя – разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически с использованием $\epsilon(230\text{ нм}) 72,4\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Органические соразтворители перед употреблением перегоняли. Для приготовления забуференного физиологического раствора (ЗФР), pH 7,4 использовали соли производства «Реахим» (Россия).

В качестве ингибиторов использовали 8 фенольных соединений (см. табл. 1) фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Для расчета начальных скоростей расходования соединения VI использовали молярный коэффициент поглощения (345нм), равный $19600\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ в ЗФР, pH 7,4, содержавшем 6 % ДМФ и 0,25 % ДМСО

Окисление ТМБ и ФДА в псевдопероксидазной системе MetHa- H_2O_2 проводили при 20°C в термостатированных кюветах фотометра КФК-3 (Россия), снабженного цифровой индикацией оптической плотности, в среде забуференного физиологического раствора, pH 7,4, содержавшего органические соразтворители – 6 % ДМФ и 0,25 % ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность систем. Во всех экспериментах использован биокатализатор MetHa состава 10 мкМ гемина / 5 мкМ БСА.

Окисление ФДА в присутствии соединений I-VIII и без них проводили с участием MetHa, 6 мМ H_2O_2 при различных концентрациях субстрата и ингибиторов. Реакцию начинали добавлением раствора H_2O_2 и регистрировали светопоглощение продукта окисления ФДА A_{455} . При расчетах скорости реакции использовали молярный коэффициент поглощения продукта, равный при pH 7,4 $16200\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [10].

Окисление ТМБ в присутствии соединения VI и без него проводили с участием MetHa и 0,5 мМ H_2O_2 при различных концентрациях субстрата и ингибитора. За реакцией следили по светопоглощению продукта окисления ТМБ в его максимуме A_{655} . При расчете скоростей реакции использовали молярный коэффициент продукта окисления ТМБ $39000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [11]. При расчете скоростей окисления ТМБ из-за наличия периода индукции в накоплении продукта реакции использовали строго линейные участки кинетических кривых после окончания лаг-периода.

Спектрофотометрическое исследование системы MetHa- H_2O_2 -ФДА-синаповый альдегид (VI) и MetHa- H_2O_2 -ФДА проведено при 20°C в 1 см кюветах спектрофотометра “Cary-50” (Varian, США) в среде ЗФР, pH 7,4 содержавшей 6 % ДМФ и 0,25 % ДМСО.

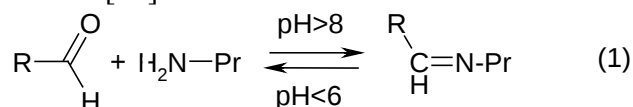
Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ соединениями I-VIII. Для определения типа ингибирования строили зависимости начальной скорости реакции V_0 от концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера-Берка) [12]. В наших работах по сопряженному окислению ароматических аминов и многочисленных фенольных соединений доказано, что адекватной количественной характеристикой ингибирования окисления аминов является константа ингибирования K_i в мкМ [6, 7]. Для определения K_i использовали метод Диксона, строя зависимости $1/V_0$ от начальной концентрации ингибитора $[\text{InH}]$ [12], или метод Корниш-Боудена, строя зависимости $[\text{S}]_0/V_0$ от растущей концентрации $[\text{InH}]_0$, где $[\text{S}]_0$ – начальная концентрация субстрата [13].

Результаты и их обсуждение

Сопряженное окисление ФДА с соединениями III, IV, VI и VII, содержащими альдегидные группы, в псевдопероксидазной системе отличается некоторыми особенностями и методическими осложнениями, связанными с разными маршрутами превращения этих четырех альдегидов. Перечисленные альдегиды активно взаимодействуют с радикалами $\text{HO}^\bullet$, генерируемыми в псевдопероксидазной системе, по основному акцептирующему центру – фенольной HO -группе. Наряду с этой реакцией, возможно также гомолитическое окисление алифатических фрагментов радикалом $\text{HO}^\bullet$, которое приводит к известной последовательности в гваяциловом ряду: кониферилловый

альдегид→ванилин→ванилиновая кислота и в сирингиловом ряду: синаповый альдегид→сиреневый альдегид→сиреневая кислота [8].

К сожалению, нельзя исключить также возможность реакции альдегидов III, IV, VI и VII с аминогруппами белковой глобулы биокатализатора с образованием азометиновых связей [14]:



Хорошо известно, что продукты конденсации amino- и альдегидсодержащих соединений – основания Шиффа – образуются легко и быстро только в щелочных средах и в этих условиях весьма стабильны, а в кислых средах они легко разрушаются с регенерацией исходных веществ реакции [15]. Поскольку все реакции сопряженного окисления аминов и фенолов проводятся нами в **строго стандартных условиях** (20°C, ЗФР, pH 7,4 с содержанием 6 % ДМФ и 0,25 % ДМСО), то при pH 7,4 нельзя полностью исключить возможность реакции (1). Для проверки такой версии проведено спектрофотометрическое изучение окисления синапового альдегида в псевдопероксидазной системе в отсутствие акцептора радикалов ФДА в стандартных условиях. На рис. 1а представлены спектральные изменения исходного соединения VI в ходе его окисления и спектры образующихся продуктов. Из рис. 1а следует, что в псевдопероксидазной системе соединение VI быстро расходуется, что сопровождается резким уменьшением светопоглощения в максимуме (345 нм) по кинетическому закону первого порядка (рис. 1б). По данным рис. 1б определена начальная скорость расщедования соединения VI, равная $2,25 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$ при $[\text{VI}]_0 = 6,0 \text{ мкМ}$.

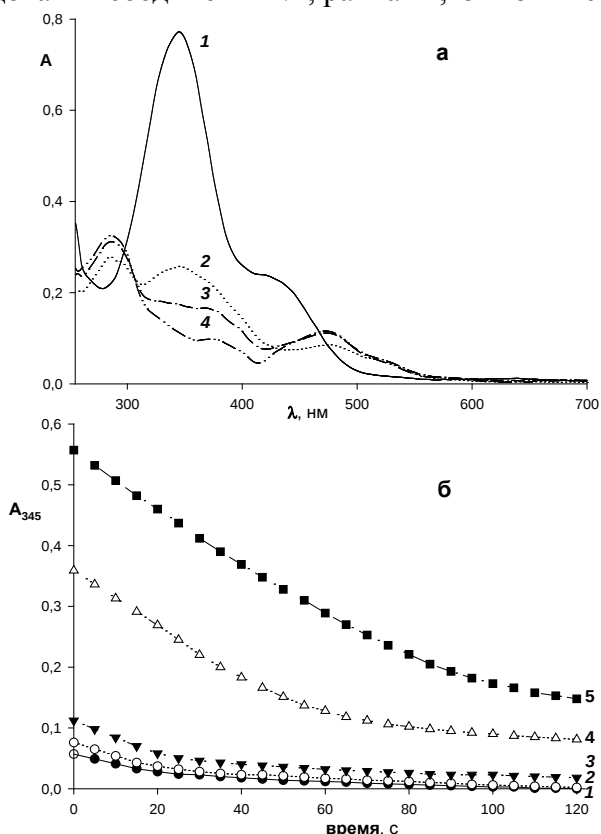
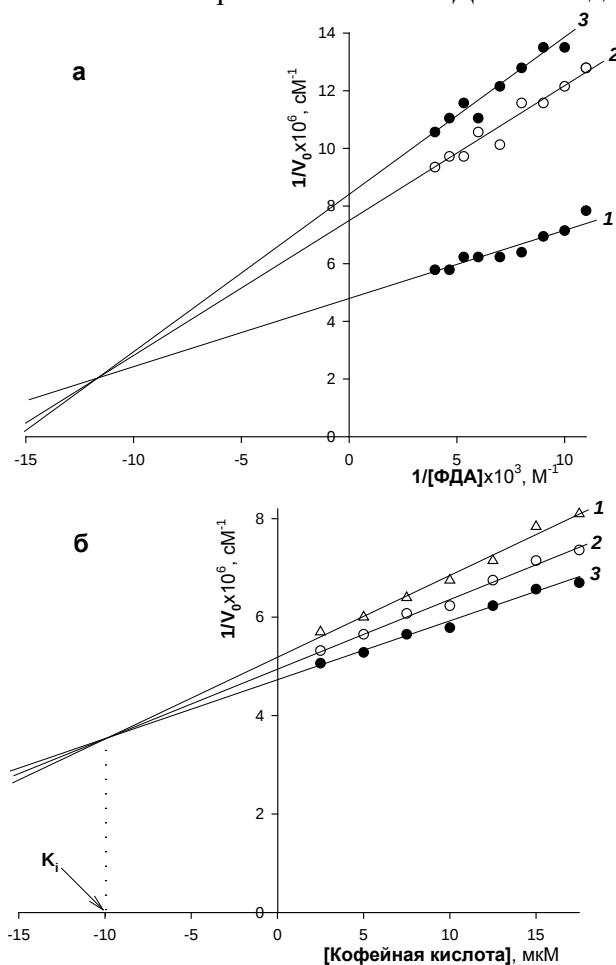


Рисунок 1 – а – Спектры поглощения синапового альдегида (50 мкМ) и продуктов его окисления в системе MetNa-H₂O₂ при 20°C: ЗФР, pH 7,4, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО, 6,0 мМ H₂O₂, 1 см кювета: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 с

б – Кинетика расхождения синапового альдегида (1 – 2, 2 – 6, 3 – 10, 4 – 30, 5 – 50 мкМ) в терминах его оптической плотности A_{345} в системе MetNa-H₂O₂ при 20°C: 3ФР, pH 7,4, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО, 6,0 мМ H₂O₂, 0,5 см кювета.

На рис 1а видно, что один из продуктов окисления VI имеет полосу поглощения с максимумом 470 нм и значением $A \sim 0,1$. Полоса поглощения может принадлежать основанию Шиффа, образованному по реакции альдегида VI с аминогруппой биокатализатора MetNa. Подобный продукт образовывался при взаимодействии биокатализатора с соединением III и быстро достигал предельной концентрации, которая не меняется во времени. Альдегиды IV и VII не вступали в реакцию (1) с биокатализатором в условиях эксперимента.

Далее последовательно представлены кинетические данные по совместному окислению ФДА и соединений I-V, VII и VIII в псевдопероксидазной системе в строго идентичных условиях. На рис. 2а показаны зависимости начальной скорости окисления ФДА от его концентрации в двойных обратных координатах в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии кофейной кислоты (2, 3). Как видно, кофейная кислота (II) сильно замедляет окисление ФДА: прямые 1-3 пересекаются в одной точке в верхнем левом квадранте, что свидетельствует о **смешанном типе ингибирования**. На рис. 2б представлены зависимости в координатах Диксона [12, 13]: линейные зависимости, полученные при разных концентрациях ФДА, пересекаются в одной точке; по данным рисунка определена константа ингибирования $K_i = 10$ мкМ, т.е. кофейная кислота является сильным ингибитором окисления ФДА в псевдопероксидазной системе.



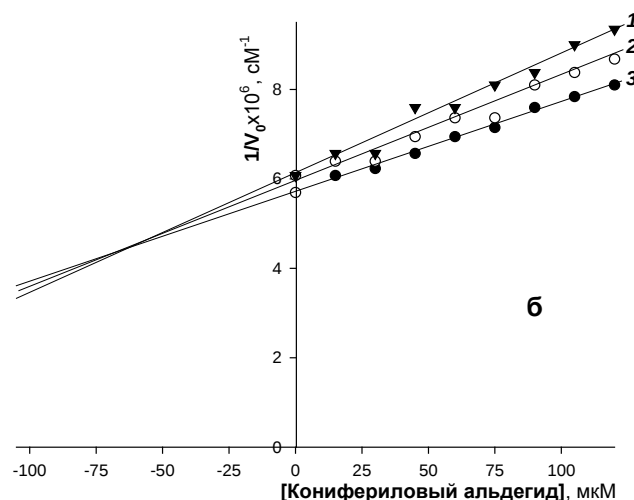
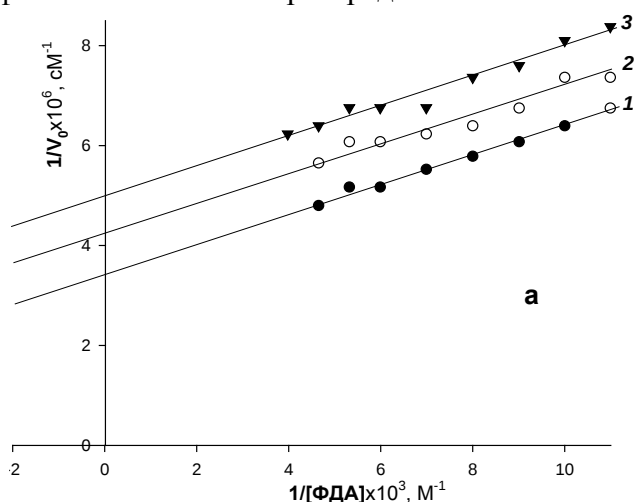
а – 1 – 0, 2 – 70 и 3 – 150 мкМ кофейной кислоты;

б – 1 – 0,12, 2 – 0,17 и 3 – 0,25 мМ ФДА

Рисунок 2 – Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от его обратной начальной концентрации (а) и от концентрации кофейной кислоты (б) в системе MetNa-H₂O₂ в 3ФР, pH 7,4 при 20°C: 6,0 мМ H₂O₂, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО

Аналогичные зависимости в координатах Лайнуивера-Берка и координатах Диксона получены в стандартных условиях для пары ФДА-гидроксикумаровая кислота (I): в этом случае также проявляется смешанный характер ингибирования, а величина $K_i=75$ мкМ, т.е. существенно выше, чем для кофейной кислоты.

На рис. 3а представлены зависимости начальной скорости окисления ФДА от его начальной концентрации в двойных обратных координатах в присутствии кониферилового альдегида (2, 3) и его отсутствие (1), подтверждающие **бесконкурентный тип ингибирования**. Из зависимостей в координатах Диксона (рис. 3б) определена величина $K_i=63$ мкМ, т.е. конифериловый альдегид (III) является довольно эффективным ингибитором радикального окисления ФДА в системе MetNa-H₂O₂.



а – 1 – 0, 2 – 45 и 3 – 90 мкМ кониферилового альдегида;
б – 1 – 0,12, 2 – 0,17 и 3 – 0,25 мМ ФДА

Рисунок 3 – Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от его обратной начальной концентрации (а) и от концентрации кониферилового альдегида (б) в системе MetNa-H₂O₂ в ЗФР, рН 7,4 при 20⁰С: 6,0 мМ Н₂O₂, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО

Аналогичные зависимости получены для пары ФДА-ванилин (IV): линеаризация данных по Лайнуиверу-Берку подтверждает **бесконкурентный тип ингибирования**; из зависимости в координатах Диксона определена $K_i=300$ мкМ, что представляется неожиданно высокой величиной, свидетельствующей о низкой ингибирующей активности соединения IV. Еще более слабым ингибитором оказалась ванилиновая кислота (V): при ее концентрации 300 мкМ глубина ингибирования окисления ФДА составила всего 12 %.

Учитывая, что продукт окисления ФДА и Шиффово основание, образованное в результате реакции MetNa с синаповым альдегидом, имеют спектры поглощения с

перекрывающимися полосами, использовали в качестве акцептора радикалов ТМБ с максимумом поглощения продукта окисления на длине волны 655 нм. Кинетика ингибированного окисления ТМБ показана на рис. 4а: накопление продукта окисления ТМБ в присутствии синапового альдегида (2 – 5, 3 – 10, 4 – 12,5 мкМ) характеризуются наличием периода индукции. Период индукции $\Delta\tau$ связан линейной зависимостью с возрастающей концентрацией VI (рис. 4б) в полном соответствии с теорией метода ингибиторов свободно-радикальных процессов академика Н.М. Эмануэля и сотр. [16]: при стационарном режиме ингибированного процесса между $\Delta\tau$ и начальной концентрацией ингибитора InH справедливо соотношение (2):

$$\Delta\tau = f \times [\text{InH}]_0 / V_i \quad (2),$$

где V_i – скорость инициирования радикалов и f – стехиометрический коэффициент ингибирования, означающий число радикалов, гибнущих на одной молекуле ингибитора. В нашем случае V_i приблизительно равна удвоенной начальной скорости окисления ТМБ V_0 , так как на образование спектрально регистрируемого продукта реакции расходуется два катион-радикала ТМБ $^{+\cdot}$. Можно считать, что

$$2V_0 \approx V_i = f \times (V_i/f) \quad (3).$$

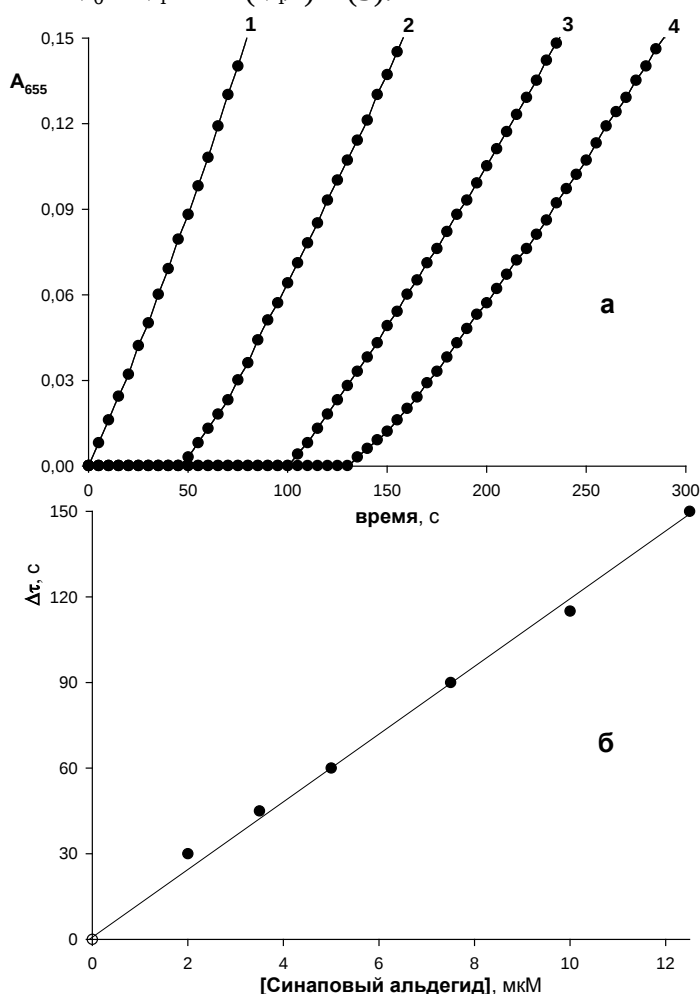


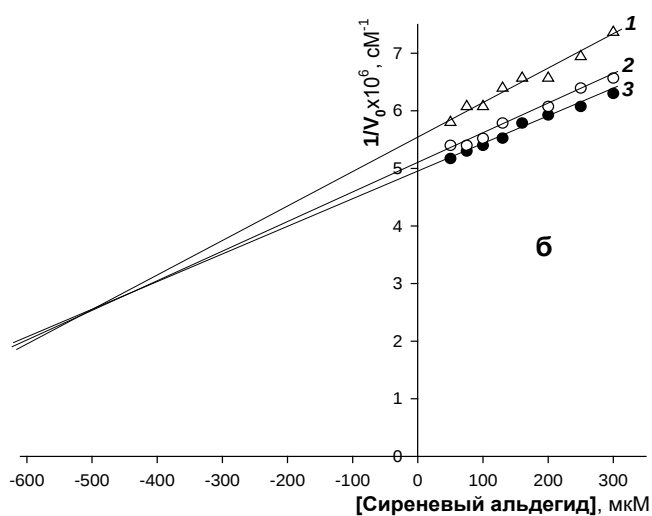
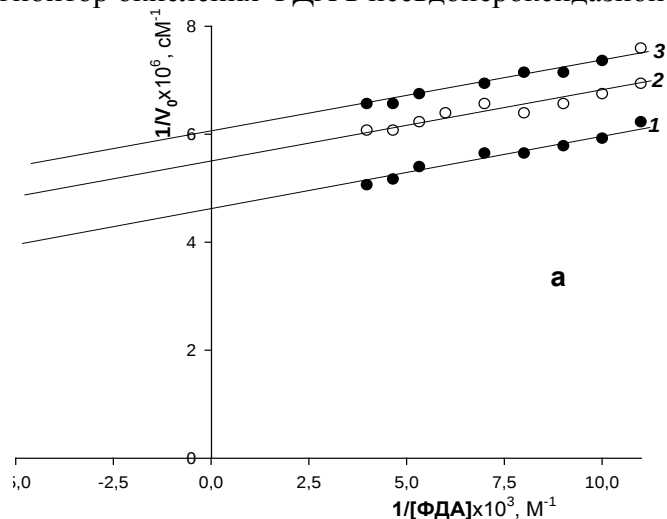
Рисунок 4 – а – Кинетические кривые роста оптической плотности продукта окисления ТМБ (0,5 мМ) в системе MetNa-H₂O₂ без ингибитора (1) и в присутствии синапового альдегида в концентрациях 2 – 5, 3 – 10, 4 – 12,5 мкМ: 20⁰С, 3ФР, рН 7,4 0,5 мМ Н₂О₂, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО

б – Зависимость продолжительности периода индукции в накоплении продукта окисления ТМБ от концентрации синапового альдегида в системе MetNa-H₂O₂

Используя соотношения (2) и (3), легко определить величину f , которая при окислении пары ТМБ-VI изменяется от 1,5 до 3 в зависимости от концентрации ингибитора, т.е. одна молекула VI может губить до 3 радикальных частиц. Зависимости в координатах Лайнуивера-Берка (не приводятся) подтвердили **бесконкурентный характер ингибирования** при окислении пары ТМБ-VI, а из зависимостей в координатах Корниш-Боудена получена величина $K_i=15,5$ мкМ, т.е. синаповый альдегид – сильный ингибитор окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

Напомним, что начальная скорость расщепления соединения VI (6 мкМ) без ТМБ равна $2,28 \cdot 10^{-7}$ Мс⁻¹ при 20°C. При концентрации VI, равной 6 мкМ, скорость расщепления ТМБ (0,25 мМ) равна $1,084 \cdot 10^{-7}$ Мс⁻¹: таким образом, расщепление соединения VI превосходит скорость окисления ТМБ в 2,7 раза в абсолютно аналогичных условиях. С ростом концентрации VI > 6 мкМ скорость расщепления альдегида, естественно, будет возрастать, а скорость окисления ТМБ – снижаться.

На рис. 5а представлены зависимости начальной скорости окисления ФДА от его начальной концентрации в двойных обратных координатах при двух высоких концентрациях сиреневого альдегида (VII), которые подтверждают **бесконкурентный тип ингибирования**. На рис. 5б представлены зависимости в координатах Диксона: на основе данных рисунка определена величина $K_i=500$ мкМ, т.е. альдегид VII – слабый ингибитор окисления ФДА в псевдопероксидазной системе.



а – 1 – 0, 2 – 150 и 3 – 250 мкМ сиреневого альдегида;

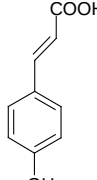
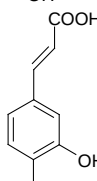
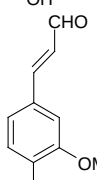
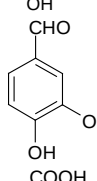
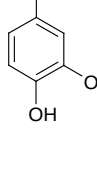
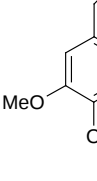
б – 1 – 0,12, 2 – 0,17 и 3 – 0,25 мМ ФДА

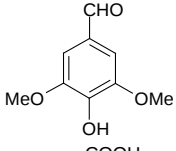
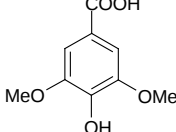
Рисунок 5 – Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от его обратной начальной концентрации (а) и от концентрации сиреневого альдегида (б) в системе MetNa-H₂O₂ в ЗФР, pH 7,4 при 20⁰С: 6,0 мМ Н₂O₂, 6 % ДМФ, 0,25 % ДМСО

Зависимости в координатах Лайнуивера-Берка для пары «ФДА-сиреневая кислота (VIII)» показали **смешанный тип ингибирования**; из зависимостей в координатах Диксона для этой пары определена величина K_i=50 мкМ, т.е. сиреневая кислота – довольно эффективный ингибитор окисления ФДА в системе MetNa-H₂O₂.

В табл. 1 сопоставлены структуры восьми изученных ингибиторов, типы и константы ингибирования K_i при окислении ФДА и пары ТМБ-альдегид VI. Из данных таблицы следует, что все изученные кислоты (I, II, V, VIII) ингибируют окисление ФДА в системе MetNa-H₂O₂ по смешанному типу, в то время как все альдегиды (III, VI, IV, VII) действуют в псевдопероксидазной системе по бесконкурентному типу.

Таблица 1. – Характеристики ингибирования окисления ФДА (соединения I-V, VII, VIII) и ТМБ (соединение VI) в псевдопероксидазной системе производными лигнина гваяцилового и сирингилового рядов: 20⁰С, ЗФР с pH 7,4, содержащий MetNa (10 мкМ), 6,0 мМ (0,5 мМ при окислении ТМБ) Н₂O₂, 6 % ДМФ и 0,25 % ДМСО.

Шифр	Соединение	Структурная формула	Тип ингибирования	K _i , мкМ	[InH] _{макс} , мкМ
I	Гидроксикумаровая кислота		Смешанный	75	300
II	Кофейная кислота		Смешанный	10	17,5
III	Кониферилловый альдегид		Бесконкурентный	63	120
IV	Ванилин		Бесконкурентный	300	200
V	Ванилиновая кислота		-	2 % ингибирования	300
VI	Синаповый альдегид		Бесконкурентный	15,5	12,5

VII	Сиреневый альдегид		Бесконкурентный	500	300
VIII	Сиреневая кислота		Смешанный	50	150

Такое различие характера ингибирования объясняется разными способами связывания кислот и альдегидов с белковой глобулой биокатализатора MetHa: кислоты частично конкурируют с ФДА за связывание в области активного центра MetHa и за активные радикалы $\text{HO}^\bullet$, в то время как альдегиды связываются по другим сайтам и конкурируют только с фермент-субстратными комплексами и за активные радикалы $\text{HO}^\bullet$. По этой причине в случае кислот наблюдается смешанный тип ингибирования, а в случае альдегидов – бесконкурентный.

Наиболее эффективными ингибиторами оказались кофейная кислота > синаповый альдегид > сиреневая кислота > кониферилловый альдегид > гидроксикумаровая кислота, т.е. среди сильных ингибиторов имеются и кислоты (II, VIII) и альдегиды (III, VI), что означает отсутствие сильного воздействия альдегидной или кислотной группы на эффективность ингибирования. Определяющими факторами является наличие одной или двух (в случае II) фенольных HO -групп и метокси-заместителей в бензольном кольце. Стехиометрический коэффициент ингибирования f , изменяющийся в диапазоне 1,5-3, определенный для пары ТМБ-альдегид VI, может свидетельствовать об участии алкильного заместителя в реакции с $\text{HO}^\bullet$ -радикалами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проекту В-1746.

Список литературы

1. Метелица, Д.И. Гемсодержащие гидропероксидные тест-системы ингибиторов свободно-радикальных реакций / Д.И. Метелица, О.Б. Русь, А.В. Пучкаев // Ж. прикл. химии. – 1977. – Т. 70, № 10. – С. 1713-1720.
2. Русь, О.Б. Метгемальбумин – биокатализатор окисления ароматических аминов перекисью водорода / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, Д.И. Метелица // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 10. – С. 1813-1824.
3. Метелица, Д.И. Ингибирование окисления ароматических аминов в гемсодержащих гидроперекисных системах замещенными 4,6-ди-третбутил-пирокатехинами / Д.И. Метелица, О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, О.И. Шадыро // Ж. прикл. химии. – 1977. – Т. 70, № 10. – С. 1713-1720.
4. Русь, О.Б. Полидисульфид галловой кислоты – высокоэффективный ингибитор радикальных процессов в гемсодержащих гидропероксидных системах / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, Ю.П. Лосев, Д.И. Метелица // Ж. прикл. химии. – 1998. – Т. 71, № 5. – С. 842-848.
5. Метелица, Д.И. Иницирование и ингибирование радикальных процессов в системах H_2O_2 -метмиоглобин/метгемоглобин/-2,2'-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота) / Д.И. Метелица, А.Н. Еремин, Д.О. Свиридов, В.С. Камышников // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 628-639.
6. Метелица, Д.И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах / Д.И. Метелица, Е.И. Карасева // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537-564.
7. Метелица, Д.И. Высокоэффективные тест-системы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей человека / Д.И. Метелица, Н.В. Пивень, О.И.

- Шадыро, Ю.А. Григоренко, Л.Н. Лухверчик, Н.П. Денисевич // Труды Белорусского государственного университета. 2008. – Т. 3, Часть 1. – С. 7-21.
8. Урсул, О.Н. Статистические данные по фенольным и фурановым компонентам коньячной продукции, импортируемой в Республику Беларусь / О.Н. Урсул, В.П. Курченко, Т.М. Власова, Н.В. Гавриленко, М.В. Матюшина // Труды Белорусского государственного университета. 2008. – Т. 3, Часть 1. – С. 210-220.
9. Скурихин, И.М. Химия коньяка и бренди / И.М. Скурихин – Дели, 2005.
10. Карасева, Е.И. Ингибирование пероксидазного окисления тетраметилбензидина и орто-фенилендиамина 1-амино-2-нафтол-4-сульфоокислотой и её полидисульфидом / Е.И. Карасева, Ю.П. Лосев, Д.И. Метелица // Прикл. биохимия и микробиология. – 20017. – Т. 37, № 6. – С. 713-721.
11. Метелица, Д.И. Оптимизация использования пероксидазы хрена и ее антител в иммуноферментном анализе / Д.И. Метелица, М.И. Савенкова, В.П. Курченко // Прикл. биохимия и микробиология. – 1987. – Т. 23, № 1. – С. 116-124.
12. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики // Т. Келети – М.: Мир, 1990. – С. 183-203.
13. Диксон, М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – С. 507.
14. Несмеянов, А.Н. Начала органической химии / А.Н. Несмеянов, Н.А. Несмеянов – М.: Химия, 1970, Книга вторая. – С. 145.
15. Березин И.В. Имобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов, К. Мартинек, В.В. Можаяев, Ю.Л. Хмельницкий – М.: Высшая школа, 1987. - С. 92-93.
16. Эмануэль, Н.М. Химическая физика старения и стабилизации полимеров / Н.М. Эмануэль, А.Л. Бучаченко – М.: Наука, 1982. – С. 239-308.