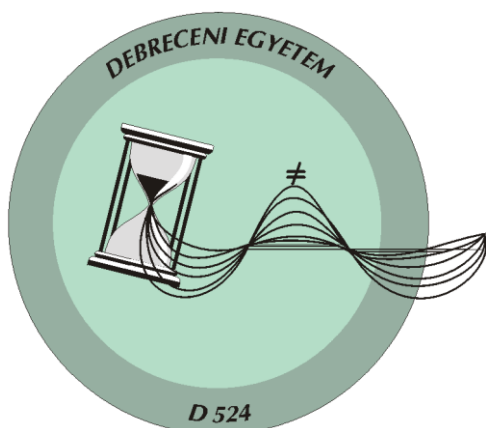




Az izoniazid és a permanganácion közötti reakció

Tudományos Diákköri dolgozat

Bogdándi Virág

III. éves kémia BSc hallgató

Témavezető: Dr. Lente Gábor egyetemi docens

DE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

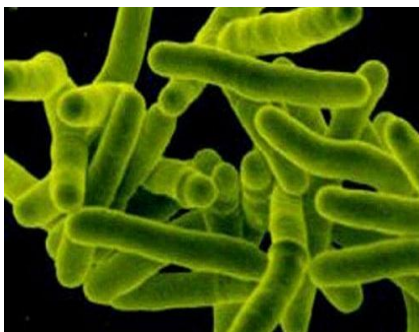
2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Izoniazid oxidációja a <i>M. tuberculosis</i> kataláz-peroxidáz enzimje által	5
2.2. Az izoniazid átalakulása izonikotinil-NAD-dá.....	6
2.3. A peroxidáz-katalizált reakciók elősegítése izoniaziddal.....	7
3. Célkitűzések	9
4. Kísérleti körülmények	10
4.1. Felhasznált vegyszerek	10
4.2. Méréshez használt műszerek és számítógépes programok	10
5. Kísérletek, eredmények és értelmezésük	11
5.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre.....	11
5.2. A reakciótermékek azonosítása	16
5.3. A mérési hullámhossz meghatározása	18
5.4. A reakció kinetikájának tanulmányozása	18
5.4.1. Elsőrendű kinetika vizsgálata	18
5.4.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata	21
5.4.3. Autokatalízis tanulmányozása	22
5.4.4. A reakció lépéseinek tisztázása.....	25
6. Összefoglalás	27
7. Summary	29
8. Köszönetnyilvánítás.....	31
9. Irodalomjegyzék	32

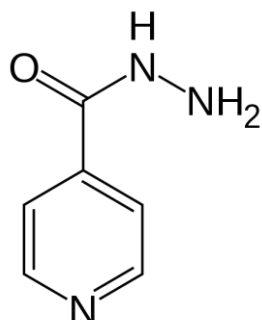
1. Bevezetés

A tuberkulózis (TBC), magyar nevén gümőkór fertőző betegség, melyet a *Mycobacterium tuberculosis* nevű baktérium terjeszt. Főként a tüdőt támadja meg, de a központi idegrendszert, a keringési rendszert, az ivarszerveket, a csontokat, ízületeket és a nyirokrendszert is megfertőzheti.



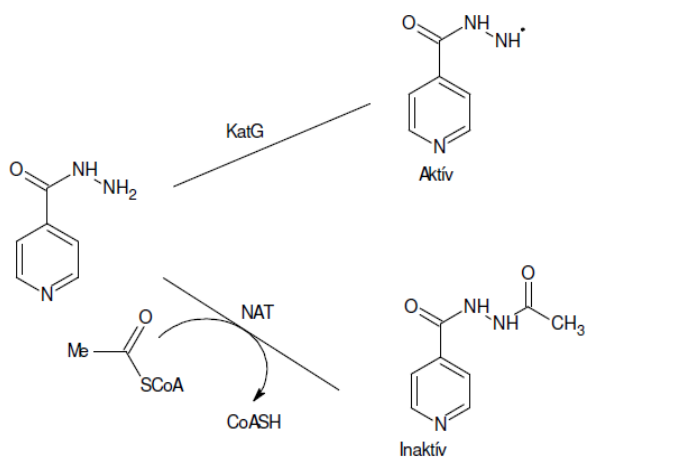
1. ábra A *Mycobacterium tuberculosis*

A betegség a legtöbb halálesetet okozta a történelem során, napjainkban pedig több mint kétmilliárd ember hordozza a kórokozót. Ennek 90%-a jelent látens fertőzöttséget, míg a betegség kifejlődésének valószínűsége 10%. Kezelés hiányában a TBC betegek 50%-ánál okoz halált. A XX. század végén megjelenő, több antibiotikumra is rezisztens tuberkulózis komoly fenyegetést jelent, így rendkívül fontos, hogy a jövőben meghatározó legyen ellene a védekezés, hiszen az Egészségügyi Világszervezet (WHO) előrejelzése szerint 2000 és 2020 között újabb 1 milliárd ember válik fertőzötté. A fertőzöttség észrevételét, valamint a kezelést nagymértékben megnehezíti az, hogy sokszor teljesen tünetmentes, a kockázati tényezőket pedig nem lehet kimutatni, így gyakran csak a boncolás során sikerül megállapítani, hogy az illető halálát a gümőkór okozta. Sok esetben viszont sikerül időben megkezdeni a kezelést, melynek célja a fertőzőképesség leggyorsabb megakadályozása, a másodlagos gyógyszer-rezisztencia megszüntetése, végül pedig a teljes gyógyulás elérése. Kutatásom során az izoniaziddal, tudományos nevén az izonikotinsav-hidraziddal foglalkoztam, mely a tuberkulózis elleni leghatékonyabb antibiotikumok egyike.



2. ábra Az izoniazid szerkezeti képlete

Ez a gyógyszer sok szempontból optimális, így használata széles körben elterjedt. Használatát az 1950-es években vezették be, s ennek megdöbbentő hatása volt a gyógykezelések mindennapjaira: egy évtizeden belül bezártak a TBC-kezelésre szakosodott magashegyi szanatóriumok. Az izoniazid semleges, valamint enyhén lúgos közegben, gyorsan szaporodó baktériumpopulációkkal szemben a leghatékonyabb. Baktericid hatását úgy fejtí ki, hogy meggátolja a mikolsav szintézisét, mely a mikobakteriális sejtfal egyik fontos építőeleme, a nikotinamid-adenin-dinukleotiddal adduktot képezve pedig megzavarja a *Mycobacterium tuberculosis* anyagcsere-folyamatait. Hagyományos formájában tulajdonképpen prekursor, így „prodrug”-ként emlegetik. Biológiaiailag aktív formáját a kataláz-peroxidáz (KatG) enzim által éri el a bakteriális sejtben, míg terápiásan inaktív formáját az N-acetiltranszferáz (NAT) enzim hozza létre a molekula acetilezésével.



3. ábra Az izoniazid oxidatív átalakulásai az élő szervezetben¹

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Izoniazid oxidációja a *Mycobacterium tuberculosis* kataláz-peroxidáz enzimje által²

A hatóanyag-rezisztens TBC törzsek jelenlegi vizsgálataira arra engednek következtetni, hogy az izoniazid biológiailag aktív formáját a kataláz-peroxidáz enzimmel való reakció után éri el.³ Annak érdekében, hogy megértsük az izoniazid hatásmechanizmusát és fejlettebb gyógyszereket hozhassunk létre, részletesen meg kell értenünk az izoniazid *Mycobacterium tuberculosis*-beli, kataláz-peroxidáz enzim segítségével történő átalakítását.

A kétfunkciós enzim peroxidáz-specifitása széles, kataláz aktivitása pedig nagy.^{4,5} Az enzim izoniaziddal való reakcióját K. Johnsson és P. G. Schultz HPLC módszerrel követte, a termékeket pedig hiteles sztenderdekkel való összevetéssel, valamint tömegspektrometria segítségével azonosította. 7,5-ös pH értéken, 50 mM Na₂HPO₄ koncentráció mellett és 37 °C hőmérsékleten a következő termékeket azonosították: izonikotinsav, izonikotinamid, és piridin-4-karbaledhid, amelyek közül a főtermék az izonikotinsav volt. A relatív termékhozamok az izoniazid koncentrációjától függtek, valamint a reakció útvonalától függően változtak: az aldehid végül izonikotinsavvá oxidálódott. Annak érdekében, hogy meghatározzák az oxigénatomok eredetét az izonikotinsavban, az izoniazid enzimmel való reakcióját ¹⁸O₂ atmoszférában is végrehajtották, a keletkező izonikotinsavat izolálás után pedig tömegspektrometria segítségével elemezték. Az egyetlen ¹⁸O atomot tartalmazó izonikotinsav mennyisége körülbelül 35%-nak adódott. A sav H₂¹⁸O-ban történő tárolása során nem következett be az jelzett oxigén beépülése, a kísérlet ugyanolyan körülmények között zajlott mint, amit a ¹⁸O₂-vel végzett. Az enzim reakciója izoniaziddal H₂¹⁸O-ban olyan izonikotinsav képződéséhez vezetett, amelynek körülbelül 33%-a nem tartalmazott ¹⁸O-t, mintegy 50% egyetlen ¹⁸O-atomot, míg nagyjából 17% két ¹⁸O-atomot tartalmazott. Az eredmény két útvonal egyidejű jelenlétére enged következtetni az izonikotinsav képződése során. Egyetértésben ezekkel az adatokkal, egyértékű aminok hozzáadása a reakcióelegyhez a megfelelő amidok képződéséhez vezetett, több mint 50%-os hozammal.⁶

2.2. Az izoniazid átalakulása izonikotinil-NAD-dá⁷

A „prodrug” izoniazid aktiválása tuberkulózis elleni hatóanyaggá magában foglalja annak izonikotinil-NAD-dá alakulását, amely reakció kataláz-peroxidázt igényel. Ben Wisemann és kutatócsoportja megállapította, hogy az előbb említett reakció, bár kisebb arányban, KatG hiányában is továbbhalad abban az elegyben, amely izoniazidot, NAD^+ -t, Mn^{2+} ionokat valamint molekuláris oxigént tartalmaz. KatG jelenlétében az átalakulási arány több mint hétszeresére nő. A reakció alapvető fontosságú közterméke a szuperoxidion, amely az oxigén redukciója során keletkezhet akár a Mn^{2+} , akár a KatG katalitikus hatására. A peroxidációs folyamat elvétele a reakciót 60%-kal lassítja. Tehát ez a részfolyamat fokozza a reakció sebességét, de nem létfontosságú az izonikotinil-NAD képződésében. A reakció köztermékeként azonosított izonikotinil-NAD⁺ gyök, illetve annak szuperoxid általi redukciója valószínű.

Az átalakulásra a kutatócsoport a következő mechanizmust javasolta: a reakcióban először a hidrazincsoport távozik, majd az izonikotinil részt pedig a NAD^+ -ra addicionálódik, így keletkezik az izonikotinil-NAD. Az izonikotinil-NAD a mikolsav szintézisét gátolja, ezáltal pedig a *Mycobacterium tuberculosis* fejlődését, ugyanis megköti a hosszú láncú enoil-acil hordozó reduktáz fehérjét (InhA).⁸ Annak ellenére, hogy IN-NAD szerepe a mikolsav szintézisének meggátolásában teljesen világos, valamint az is biztos, hogy az élő szervezetben szükség van KatG-re az izoniazid aktiválásához, mégis maradt bizonytalanság a képződési mechanizmusról.

Az MtKatG részvétele az izoniazid aktiválásában arra enged következtetni, hogy a peroxidációs folyamatnak szerepe van a reakcióban, így számos tanulmány szól arról, hogy külső oxidálószerket alkalmaztak arra, hogy ezt az útvonalat aktiválják. Emellett EPR tanulmányok igazolták, hogy az izoniazid elektronforrásként is szolgálhat a peroxidációs köztermékek redukciójakor (köztük kimondottan a triptofánból képződő Trp[•] gyök esetében) a MtKatG peroxoecetsavas oxidációját követően.^{9, 10}

Módszerek sokaságát alkalmazták az izoniazid aktiválásának közvetett és közvetlen vizsgálatára, köztük az izoniazid izonikotinsavvá való oxidációjának meghatározását^{11,12}, az izoniazid eltűnésének HPLC-s vizsgálatát,¹³ az InhA inaktiválását InhA-KatG elegyben,^{14,15,16,17} az INH-NAD HPLC-s észlelését¹⁸ valamint az IN-NAD közvetlen mérését annak jellemző elnyelési hullámhosszán, 326 nm-en.^{14,15,18,19} A külső oxidálószer hiányában lezajló aktiválási reakciók eredményei^{11,15,17,18} eleinte azt sugallták, hogy a

peroxidációs folyamat nem szükséges, viszont az izoniazid, NADH és KatG keverékek a molekuláris oxigén szuperoxiddá, valamint a kis koncentrációban jelen lévő hidrogén-peroxid¹⁸ NADH-val való redukcióját biztosították volna, ezáltal aktiválva a peroxidáz reakciót.

Annak ellenére, hogy már korábban erős bizonyítékok szólnak a peroxidációs folyamat részvételére az izoniazid-NAD szintézisében, további kísérleteket végeztek arra, hogy a peroxidációs útvonal segítségével értelmezzék a reakciót. Ezek a kísérletek általában olyan modelleket eredményeztek, amelyek vagy redoxiszemponból befejezetlenek voltak^{12,14} (nem volt világos minden lépésben, mi az oxidáló vagy a redukálószer), vagy olyan feltételezett köztitermékekekt tartalmaztak, amelyeket semmilyen más rendszerben nem jellemeztek. Egy felvetett lehetőség szerint például az izonikotinil-gyök NAD^+ -al reagálva IN-NAD-ot termel, noha egy ilyen reakció tulajdonképpen az $\text{IN-NAD}^{\cdot+}$ gyököt termelne. A gyök oxidáló környezetben való redukciójának szükségessége azt sugallja, hogy az izoniazid aktiválási folyamatának egy egyszerű peroxidációs útvonalnál többet kell tartalmaznia. Ez a gondolatmenet a szuperoxidgyökhöz vezet ($\text{O}_2^{\cdot-}$), amelynek redukálószerként játszott szerepe ismert az izoniazid aktiválásában.^{13,20,21} A peroxidázok, köztük a KatG-k, szuperoxidgyököt generálhatnak a molekuláris oxigénből, s egy elektrondonornak, mint például az izoniazidnak vagy a NADH-nak^{13,18,22-24}, és a molekuláris oxigénnek pedig szerepet kell játszania az izoniazid aktiválásában, habár az még nem teljesen világos.^{13,17,20} Végül, három korábbi munka leírta az IN-NAD szintézisét KatG, INH és NAD^+ keverékekben olyan körülmények között, amelyeknél molekuláris oxigénen kívül semmilyen oxidálószerrel nem használtak.^{18,25} Ekkor szintén a szuperoxidgyök képződés volt tapasztalható. Így tehát az IN-NAD szintézisében a peroxidációs és a szuperoxid vezette útvonalak egymással párhuzamosan vannak jelen, noha relatív jelentőségük még meglehetősen bizonytalan.

2.3. A peroxidáz-katalizált reakciók elősegítése izoniaziddal²⁶

Korábbi munkákból ismert, hogy a klórpromazin (CPZ) stimulálja az izoniazid torna-peroxidáz (HRP) katalizálta oxidációját. D. C. Goodwin és csoportja egy olyan rendszert vizsgált, amely izoniazidot, CPZ-t és HRP-t tartalmazott. A végbement reakcióban a klórpromazin katalizátor szerepet játszott az izoniazid és a HRP közötti elektronátmenetben, ugyanis a HRP és CPZ reakciójakor keletkező $\text{CPZ}^{\cdot+}$ oxidálta az izoniazidot a megfelelő gyökké. A tapasztaltak megegyeznek Pelizetti megállapításával, miszerint a $\text{CPZ}^{\cdot+}$ erős oxidálószer²⁷ ($E^\circ = 0,78 \text{ V}$), illetve Juchau és Horita megfigyelésével, amely szerint a

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

hidrazinok általánosságban jó redukálószerként ismertek.²⁸ A fent említett rendszerben a CPZ redoxiközvetítő szerepe nyilvánvaló, ugyanis a $\text{CPZ}^{\cdot+}$ felhalmozódása izoniazid jelenlétében teljesen gátlódik, emellett az izoniazid oxidációjának sebessége, noha függ a CPZ mennyiségétől, az izoniazid mennyiségétől azonban már független. Az említett kinetikus sajátságok a peroxidáz-katalizált oxidációs reakciók jellemző tulajdonságai.²⁹ Így tehát az izoniazid oxidációjának sebessége CPZ jelenlétében vagy hiányában erősen függ a HRP katalitikus ciklusának aktivitásától.

3. Célkitűzések

Kísérleti munkám során az izoniazid kálium-permanganáttal való oxidációs reakcióját vizsgáltam. Elsőként a cél a folyamat sztöchiometriájának meghatározása volt, majd a reakciósebesség koncentráció- illetve pH-függését kívántam tanulmányozni. A kinetikát tekintve a reakciósebesség tanulmányozása után további célként tűztük ki a reakciósebességi egyenlet meghatározását, majd a reakció mechanizmusának tisztázását valamint a termék(ek) azonosítását, végül pedig összehasonlítani a folyamat kinetikáját olyan reakciókéval, amelyekben az izoniazid más oxidálószerekkel reagál.

4. Kísérleti körülmények

4.1. Felhasznált vegyszerek

Az oldatok készítéséhez kétszer ioncserélt és ultraszűrt (*MILLI-Q RG tisztítórendszer*) vizet használtunk.

Az izoniazid-törzsoldatot szilárd izoniazidból (*Fluka Analytical, Sigma Aldrich*), a kálium-permanganát törzsoldatot szilárd kálium-permanganátból (*Gyógyszeralapanyag készletező V.*) készítettük. A kénsavoldatokat tömény kénsavból (*J.T. Baker*), készítettük hígítással, a mérőoldatok pontos koncentrációját sav-bázis titrálással határoztuk meg.

A pontos koncentrációk meghatározásához a sav-bázis titrálásoknál szilárd kálium-hidrogén-ftalátból (*Reanal*), a permanganometriás titrálásoknál szilárd nátrium-oxalátból (*Merck*) készített oldatokat használtunk.

4.2. Méréshez használt műszerek és számítógépes programok

Az oldatok készítéséhez *RAININ EDP-plus* elektronikus pipettákat használtunk, melyeket rendszeresen kalibráltunk.

A spektrofotometriás méréseket *PERKIN ELMER UV/VIS LAMBDA 25*, illetve *Agilent 8543* diódasoros spektrofotométerrel végeztük 1,000 cm-es valamint 2×0,454 cm-es optikai úthosszú kvarcküvetákban.

A pontos koncentráció meghatározását *Metrohm 785 DMP Titrino* automata titrátorral végeztük.

A gyorskinetikai mérésekhez *Applied Photophysics SX-17MV* szekvenciális stopped-flow készüléket használtunk, amelynek holtidejét kb. 1 ms-nak mértük az irodalomban ismertetett módszerekkel.³⁰⁻³¹

A készülékkel felvett abszorbancia-idő görbék feldolgozásához az *Applied Photophysics SX-17MV* kinetikai programcsomagját használtuk. Az eredmények kiértékelését a *Micromath Scientist 2.01* illetve a *Microsoft Excel* számítógépes programokkal végeztük.

A tömegspektrometriás vizsgálatokat *Bruker MicrOTOF* tömegspektrométeren végeztük, ESI ionforrást valamint pozitív módot használva.

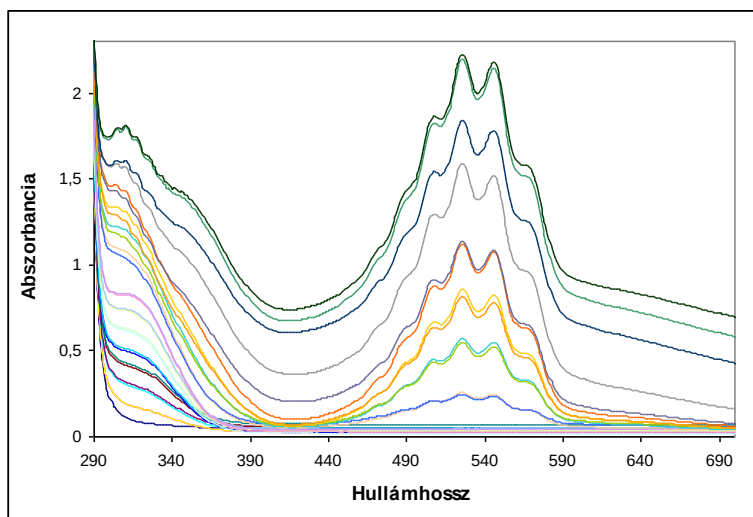
5. Kísérletek, eredmények és értelmezésük

5.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre

Kísérleti munkám első lépése a folyamat sztöchiometriájának meghatározása volt. Ehhez a spektrofotometriás titrálás módszerét alkalmaztam.

Először $2,50 \times 10^{-3}$ M koncentrációjú izoniazidoldatot titráltam $4,85 \times 10^{-3}$ M koncentrációjú kálium-permanganát-oldattal, amelyből minden lépésben $0,100 \text{ cm}^3$ -t adtam a rendszerhez, majd felvettem a keverék spektrumát. A kénsav koncentrációja $9,85 \times 10^{-1}$ M volt. A mérést fordítva is elvégeztem, ekkor $5,89 \times 10^{-3}$ M koncentrációjú kálium-permanganát- oldatot titráltam $1,77 \times 10^{-3}$ M koncentrációjú izoniazid oldattal, szintén $0,100 \text{ cm}^3$ -t hozzáadva minden lépésben, majd felvéve a spektrumot. A kénsavkoncentráció megegyezett az előző mérésben alkalmazottal.

A 4. ábra mutatja be egy spektrofotometriás titrálás során felvett spektrumokat. Az elektromágneses színekép látható tartományában az elnyelő részecske a kálium-permanganát, így az ábrán annak jellegzetes, több elnyelési maximumot is mutató spektrumát láthatjuk.



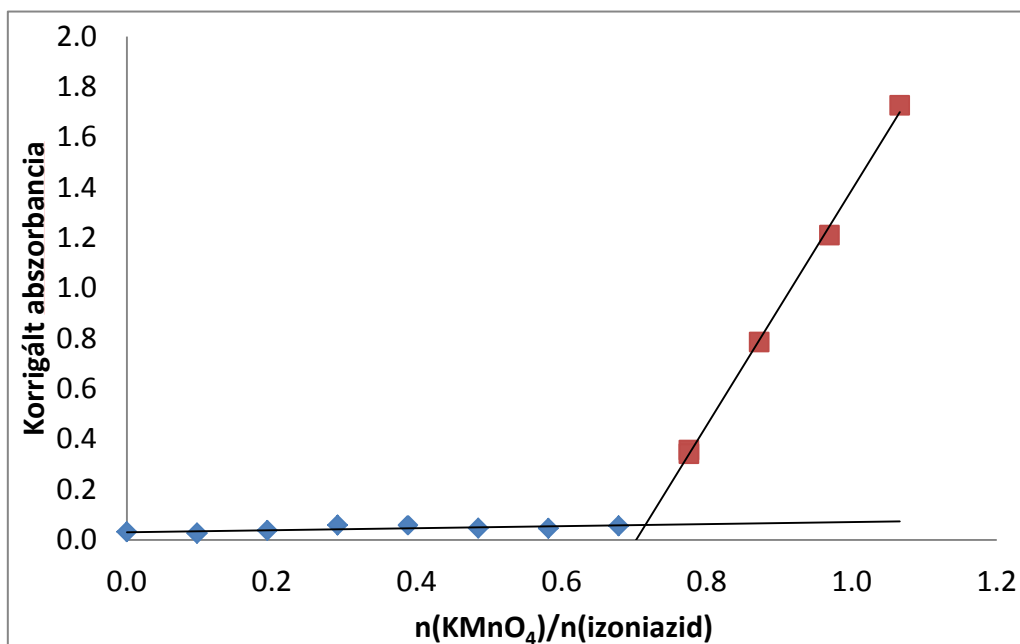
4. ábra A spektrofotometriás titrálás során felvett spektrumok

$[\text{izoniazid}] = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 4,85 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott $\text{KMnO}_4 = 0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

A mérést követően kiválasztottunk két hullámhosszat. Az egyik az UV tartományban található, s itt az izoniazidnak és a permanganátionnak is van elnyelése (308 nm). A másik a látható tartományban van, szelektív kálium-permanganátra nézve (524 nm). Az itt mért

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

abszorbanciaértékeket megszoroztuk a hígulás értékével, ezzel korrigált abszorbanciaértékekhez jutottunk. Erre azért volt szükség, mert az oldatok elnyelése reakció hiányában is változna, hiszen a mérés során a koncentrációk a hígulás miatt nem voltak állandók. A korrigált abszorbanciaértékeket az anyagmennyiség-arányok függvényében ábrázolva olyan görbét kaptunk, melyeken jól definiált töréspont látható: ez jelzi a reaktánsok anyagmennyiségének arányát a reakció ekvivalenciapontjában. A töréspontot minden esetben a mérési pontokra illesztett egyenesek metszéspontjaként határoztuk meg.



5. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség-arányának függvényében

$$\lambda = 524 \text{ nm}$$

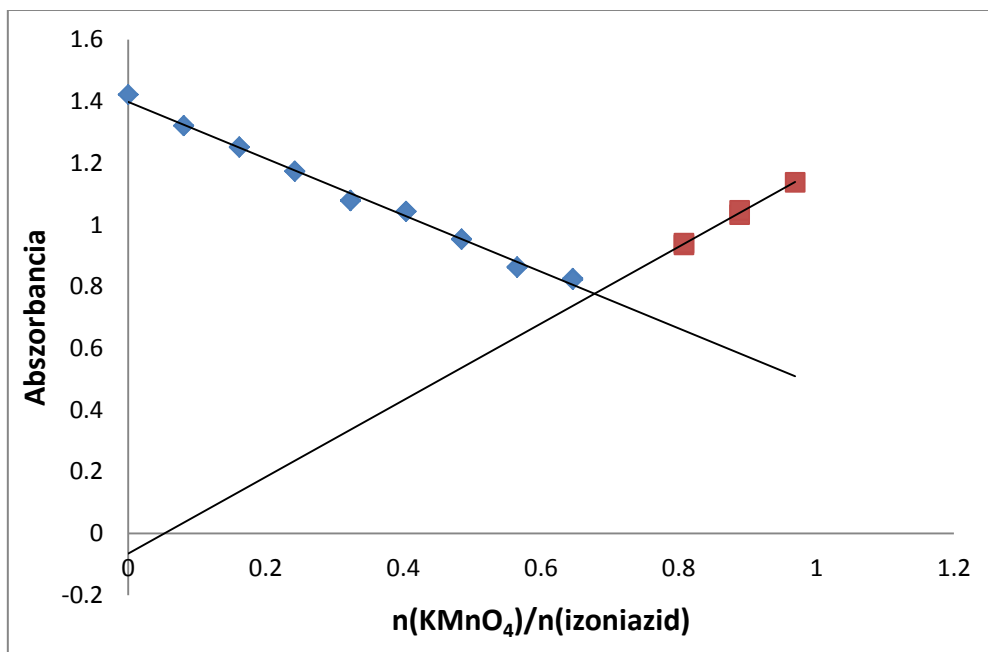
$[\text{izoniazid}] = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 4,85 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott $\text{KMnO}_4 = 0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

Az illesztett egyenesek egyenletéből megkapott metszéspont: $x = 0,714 \pm 0,003$

Ennek alapján a reakcióban egy izoniazid molekulára 0,714 kálium-permanganát molekula jut.

Az izoniazid-permanganácion elegy elnyelésére jellemző hullámhosszon, 308 nm-en vett korrigált abszorbanciaértékek változását kifejező görbe a következő:

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció



6. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség-arányának függvényében

$$\lambda = 308 \text{ nm}$$

$[\text{izoniazid}] = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 4,85 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott $\text{KMnO}_4 = 0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

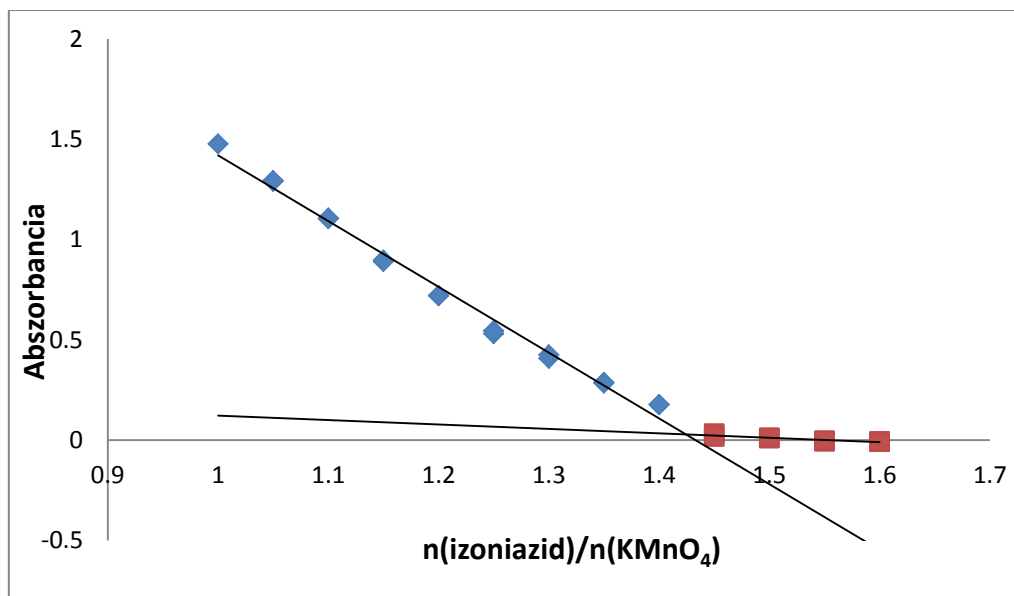
A metszéspontot szintén az illesztett egyenesekből határoztuk meg, melynek értéke:
 $x = 0,68 \pm 0,01$

A kapott x érték szintén az egy izoniazidmolekulára jutó permanganátionok számát jelzi.

Fordítva elvégezve az eljárást, azaz kálium-permanganátot titrálva izoniaziddal, az izoniazid arányát kifejező töréspontot az előbb kapott értékek reciprokanál vártuk.

Először a kálium-permanganátra jellemző elnyelési hullámhosszon vizsgáltuk a korrigált abszorbanciaértékek változását.

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció



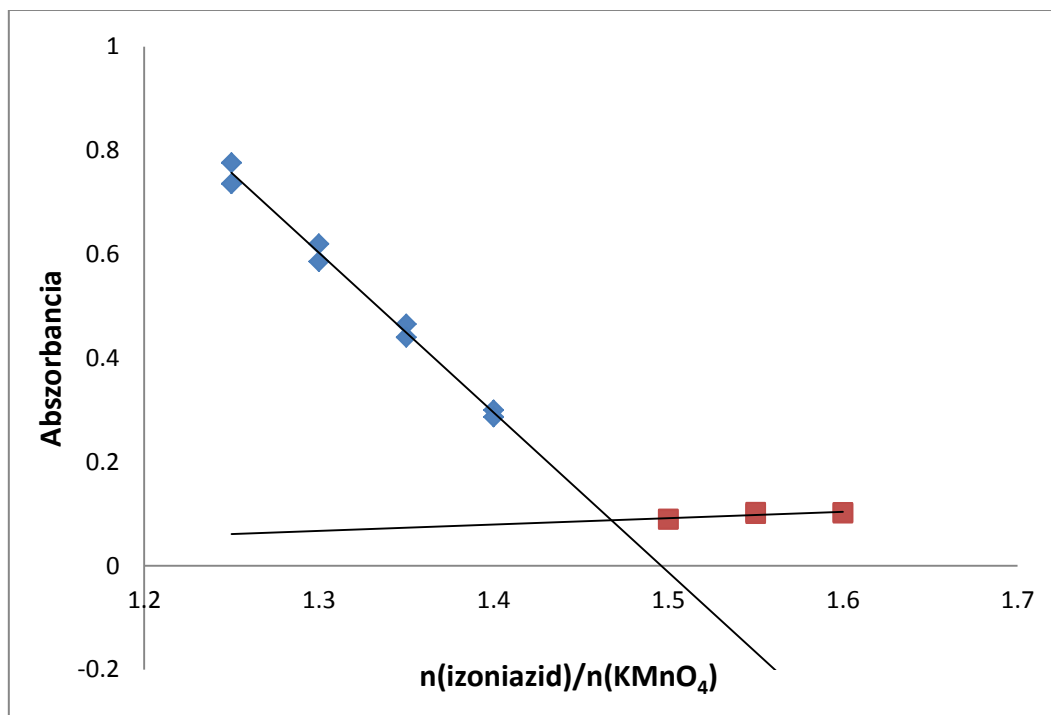
7. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség-arányának függvényében

$$\lambda = 524 \text{ nm}$$

$[\text{izoniazid}] = 1,77 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 5,89 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott izoniazid = $0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

Ebben az esetben a kapott metszéspont: $x = 1,42 \pm 0,01$

A kapott érték, mely ebben az esetben az egy permanganátra jutó izoniazidot jelzi, nagyjából megfelel a várt eredménynek. Ezt követően megfigyeltük az értékek változását az izoniazid-permanganátion elnyelésre jellemző hullámhosszon is, és meghatároztuk a töréspontot:



8. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség-arányának függvényében

$$\lambda = 308 \text{ nm}$$

$[\text{izoniazid}] = 1,77 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 5,89 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott izoniazid = $0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

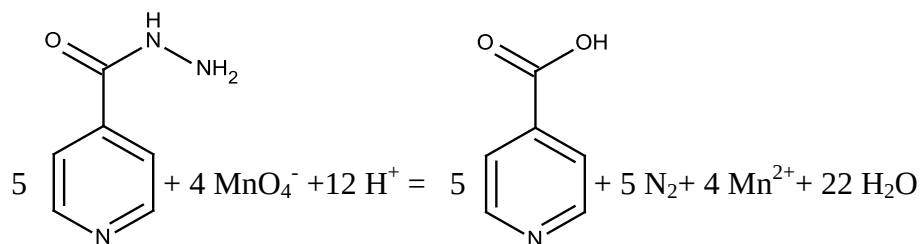
A metszéspont: $x = 1,47 \pm 0,006$

Miután meghatároztuk a sztöchiometriát kifejező anyagmennyiség arányokat, feltérképeztük a lehetséges folyamatok körét:

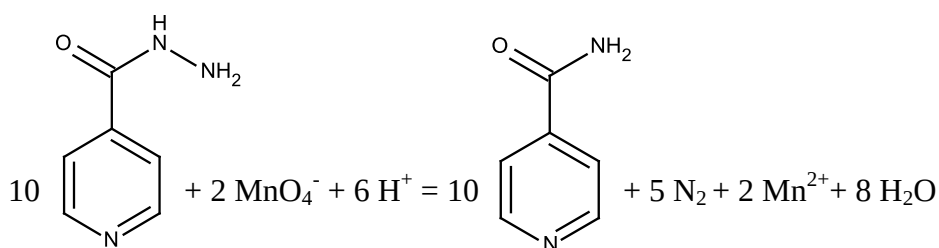
Az izoniazidmolekula szerkezetét, valamint a permanganácion oxidálóképességét tekintve a hidrazincsoport oxidációja valószínű. Ez azonban kétféle módon is végbemehet:

Első esetben az izoniazidból keletkező oxidációs termék a megfelelő karbonsav, az izonikotinsav, míg a permanganácion redukciójával Mn^{2+} -ionok keletkeznek, emellett nitrogén-gáz és víz is képződik a reakció során:

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció



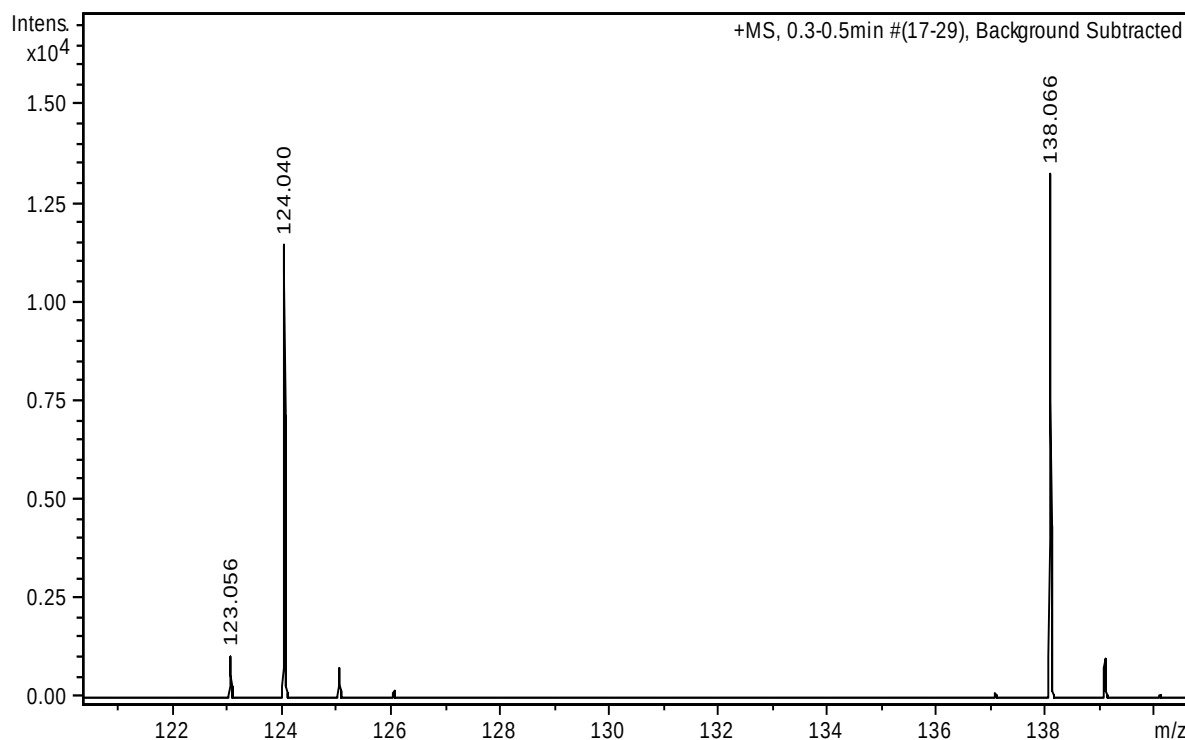
A másik lehetséges reakcióban az oxidációs termék az izonikotinamid, amely mellett szintén Mn^{2+} -ionok, nitrogéngáz és víz keletkezik:



A két ismertett reakció sztöchiometriáját figyelembe véve látható, hogy az első esetben egy izoniazidmolekulára 0,8 permanganátió fogy, míg a második reakció esetén az egy izoniazidra jutó permanganátiók száma 0,2. Ezt összevetve a sztöchiometria meghatározásánál kapott mérési eredményekkel látható, hogy a két lehetséges folyamat közül az első reakció dominál.

5.2. A reakciótermékek azonosítása

A sztöchiometria meghatározása során feltételezett termékek jelenlétéről tömegspektrometriás méréssel győződtem meg. A reakcióelegyben összekeverés előtt az izoniazid és a kénsav koncentrációja 1×10^{-3} M, a permanganátió koncentrációja 5×10^{-4} M volt.

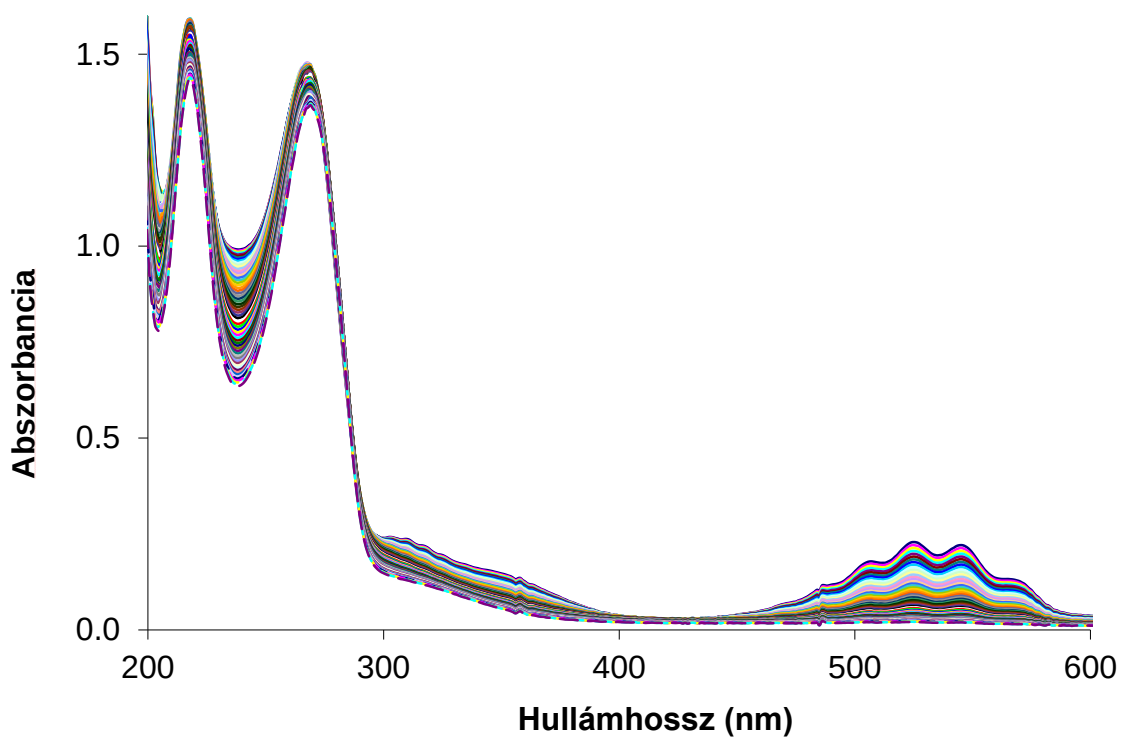


9. ábra A reakcióelegy tömegspektruma

A felvett tömegspektrumban nagy intenzitással megjelenik a feleslegben maradt izoniazid protonált csúcsa 138 m/z értéknél, valamint a két protonált termék csúcsa: a protonált izonikotinsav 124 m/z, míg a protonált izonikotinamid 123 m/z-nél ad jelet. A termékek jelintenzitásai emellett összhangban vannak az előző fejezetben meghatározott ténnyel, miszerint a két termék közül az izonikotinsav keletkezik számottevő mértékben, hiszen a protonált izonikotinsav jele sokkal intenzívebb, mint a protonált izonikotinamidé.

5.3. A mérési hullámhossz meghatározása

A sztöchiometria meghatározása után további spektrofotometriás kísérletekben diódasoros készülékkel követtem egy reakcióelegyben a spektrális változásokat az idő függvényében. Mivel látható hullámhossztartományban a kálium-permanganáton kívül egyik reaktánsnak sincs elnyelése (az eredmények elemzése szerint a termékeknek sem), így a keverék abszorbanciáját is nagymértékben annak az elnyelésnek határozza meg. A kinetikai mérések elvégzéséhez ez az elnyelési hullámhossz ideális. Ezért részletes kinetikai kísérleteket 537 nm-es hullámhosszon végeztünk.



10. ábra A spektrum változása az időben az izoniazid és kálium-permanganát reakciója során
[izoniazid] = $2,5 \times 10^{-3}$ M, $[\text{KMnO}_4] = 1,25 \times 10^{-4}$ M, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,15$ M

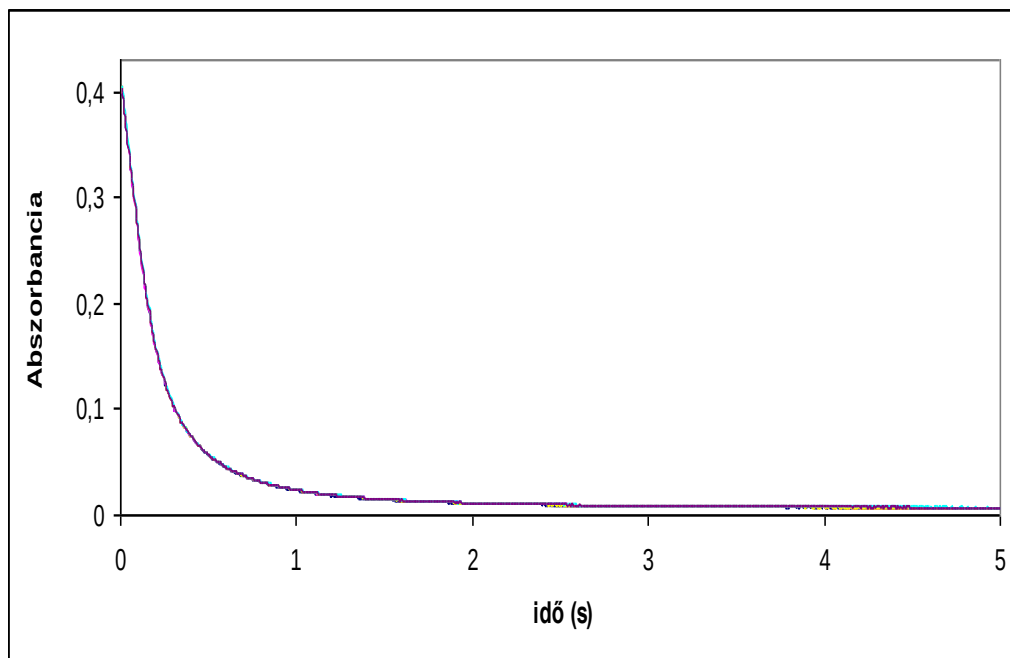
5.4. A reakció kinetikájának tanulmányozása

5.4.1. Elsőrendű kinetika vizsgálata

A reakció kinetikai görbáját stopped-flow készüléken való mérés segítségével vettem fel, ugyanis az izoniazid kálium-permanganáttal való reakciójának időbeli lefutása rendkívül gyors, gyakorlatilag 2 másodperc elteltével már nem változott az abszorbancia, tehát a

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

folyamat befejezettnek tekinthető. A mérést az előzőekben meghatározott hullámhosszon, 537 nm-en végeztük. A reprodukálhatóságot jelzi, hogy az ábrán öt egymás utáni kísérlet görbéje látható.

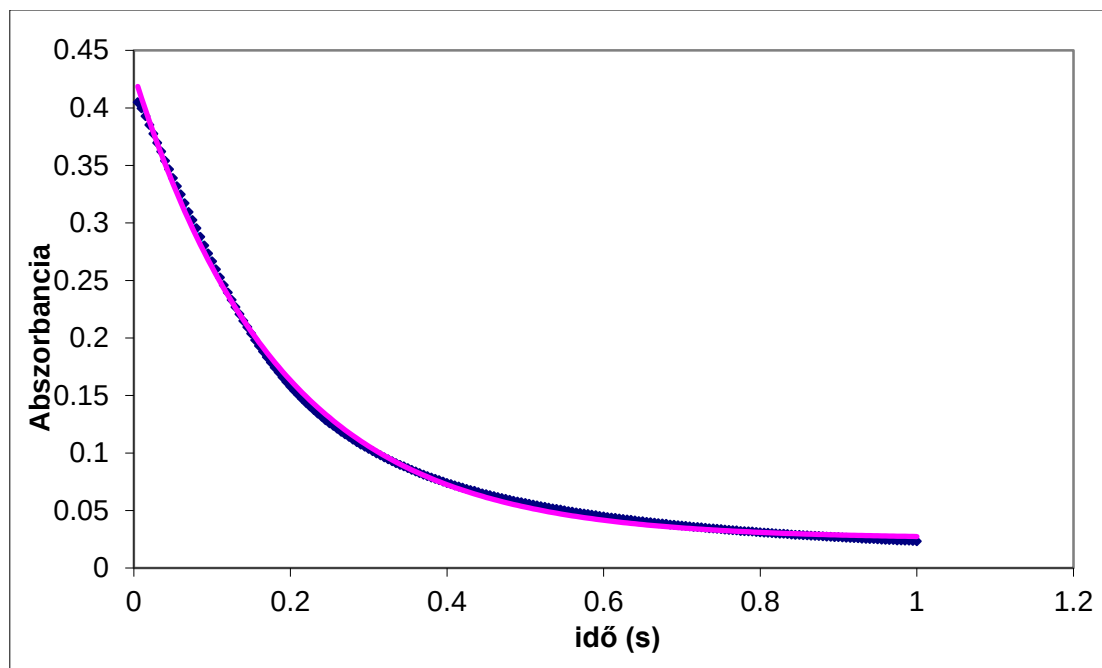


10. ábra Az abszorbancia időfüggése az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció során

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$

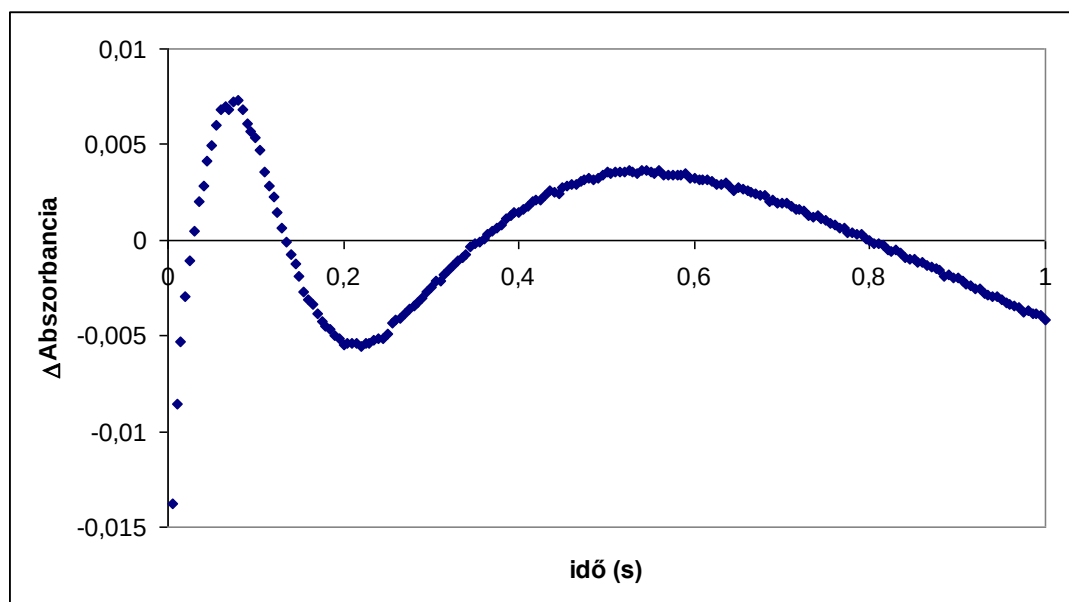
A reakció meghatározó időintervalluma a 10. ábrán bemutatott körülmények között lényegében az első másodperc, így a következőkben azzal foglalkoztunk. A feltüntetett koncentrációértékek tükrözik, hogy permanganácionra nézve pszeudo-elsőrendű körülmények között dolgoztunk, hiszen az izoniazidot nagy feleslegben alkalmaztuk. Ennek megfelelően a 10. ábrán látható görbe 0 és 1 másodperc közötti szakaszát tekintettük, majd erre kíséreltük meg az exponenciális függvény illesztését. A kapott eredmény bizonyos mértékben megfelelt várakozásainknak, az exponenciális görbe jó közelítéssel ráilleszthető a kísérleti adatokra, amely azt bizonyíthatná, hogy a reakciósebesség elsőrendű a meghatározó reaktánsra, azaz a KMnO_4 -ra nézve. Az illeszkedés azonban nem tökéletes (lásd a reziduumokat a 12. ábrán). Erre a jelenségre később még visszatérünk.



11. ábra Exponenciális függvény illesztése az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció során mért kinetikai görbére

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$



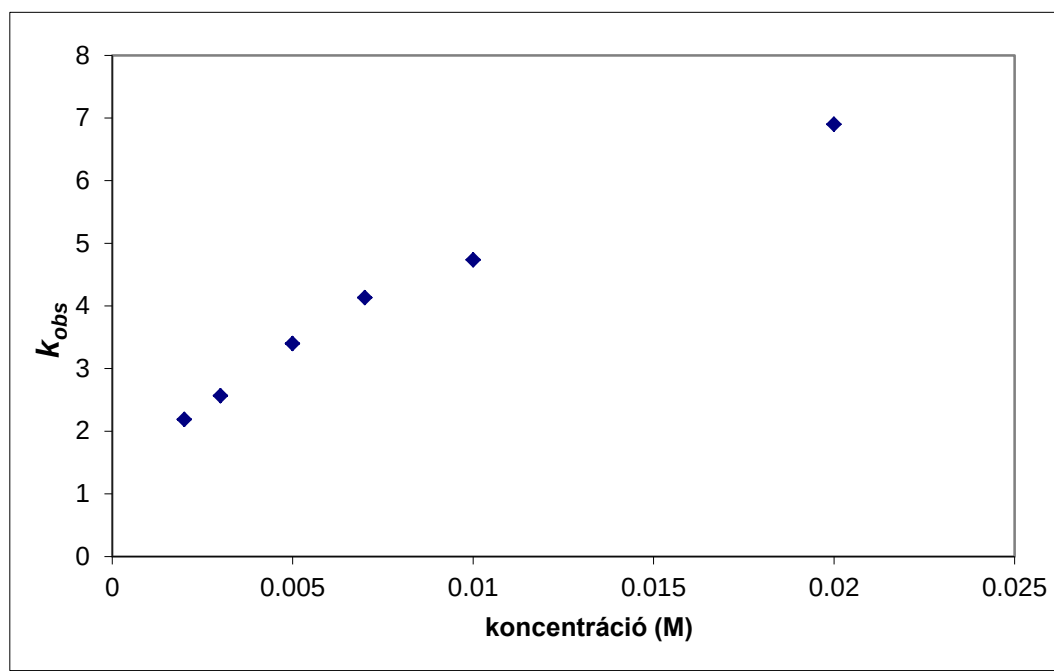
12. ábra A mért és illesztett abszorbanciaértékek különbsége exponenciális illesztés esetén (reziduumok)

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$

5.4.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata

A reakciósebesség koncentrációfüggését oly módon is vizsgáltuk, hogy egyik reaktáns állandó kiindulási koncentrációja mellett a másikat folyamatosan változtattuk, az elsőrendű illesztéssel meghatározott k_{obs} értékeket pedig a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Állandó permanganát- és változó izoniazidkoncentráció mellett azt tapasztaltuk, hogy a koncentrációfüggés nem lineáris.

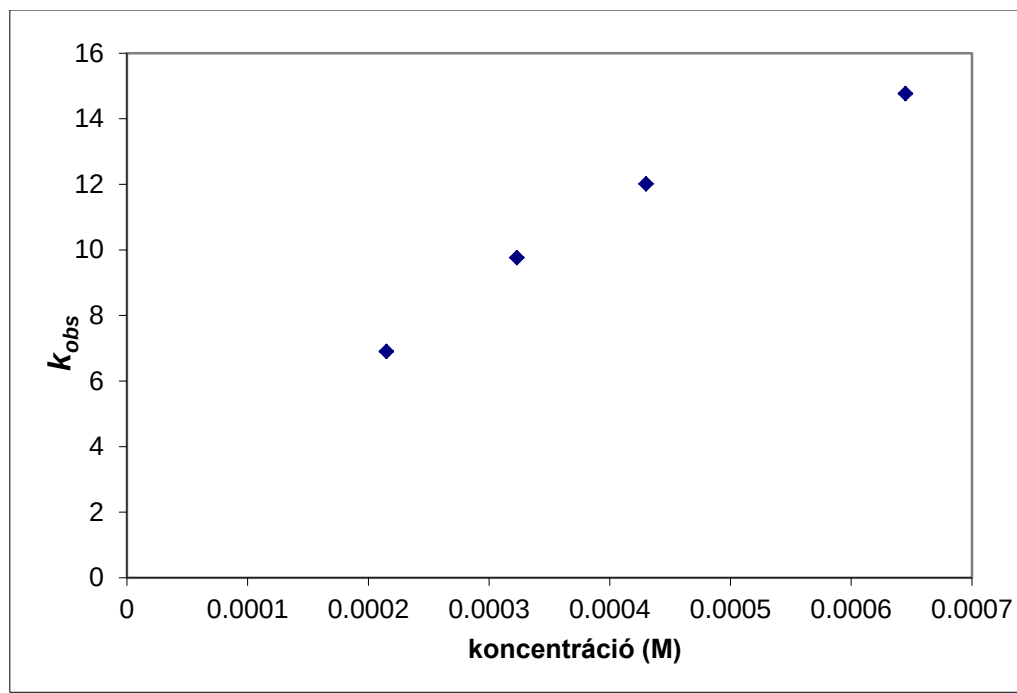


13. ábra Az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció pszeudo-elsőrendű sebességi állandójának függése az izoniazid koncentrációjától

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}$$

A kísérletsorozatot elvégeztük állandó izoniazid és változó permanganátion-koncentráció mellett is, hasonló módon az illesztett görbékből meghatározott k_{obs} értékeket ábrázoltuk a permanganátion-koncentráció függvényében. Az előzőekhez hasonlóan, itt is azt tapasztaltuk, hogy a reakciósebesség nemlineárisan függ a permanganátion koncentrációjától.



14. ábra Az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció pszeudo-elsőrendű sebességi állandójának függése az kálium-permanganát koncentrációjától

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 2,00 \times 10^{-2} \text{ M}$$

A permanganátióra kapott koncentrációfüggés élesen ellentmond az exponenciális illesztéseknél feltételezett elsőrendű kinetikának, hiszen abban az esetben a reakciósebességre jellemző k_{obs} értékek nem függnének a koncentrációtól, tehát konstansfüggvényt kellene kapnunk. A már említett nem túlságosan jó illeszkedés és az ilyen illesztésekből nyert k_{obs} -értékek jelentős függése a permanganátió koncentrációjától együttesen már bizonyossá teszi, hogy nem egyszerű pszeudo-elsőrendű folyamatról van szó. Tehát bonyolultabb kinetikai görbét kell keresnünk a jelenség értelmezésére, de közben arra is gondolnunk kell, hogy ennek fényében az exponenciális görbe illeszkedése meglepően jó. Ezt a jelenséget feltétlenül értelmezni kell majd a kinetikai megfontolások során.

5.4.3. Autokatalízis tanulmányozása

Az alkalmazott savas közeg alapján nyilvánvaló, de már a sztöchiometria meghatározásánál is ismertettük, hogy a lejátszódó reakciók során Mn^{2+} -ionok keletkeznek, melyek autokatalitikus hatása permanganometriás titrálások esetében már régóta ismert. Ennek alapján feltételezhető, hogy a reakcióban keletkező Mn^{2+} -ionok a folyamatban az autokatalizátor szerepét tölthetik be, s így a teljes kinetikai görbe valóban nem pszeudo-

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

elsőrendű lesz. A bemutatott görbéken viszont nem látszik az autokatalitikus folyamatokra jellemző indukciós periódus: ennek oka lehet az, hogy a közvetlen és az autokatalitikus reakcióutak sebessége nem különbözik nagymértékben.

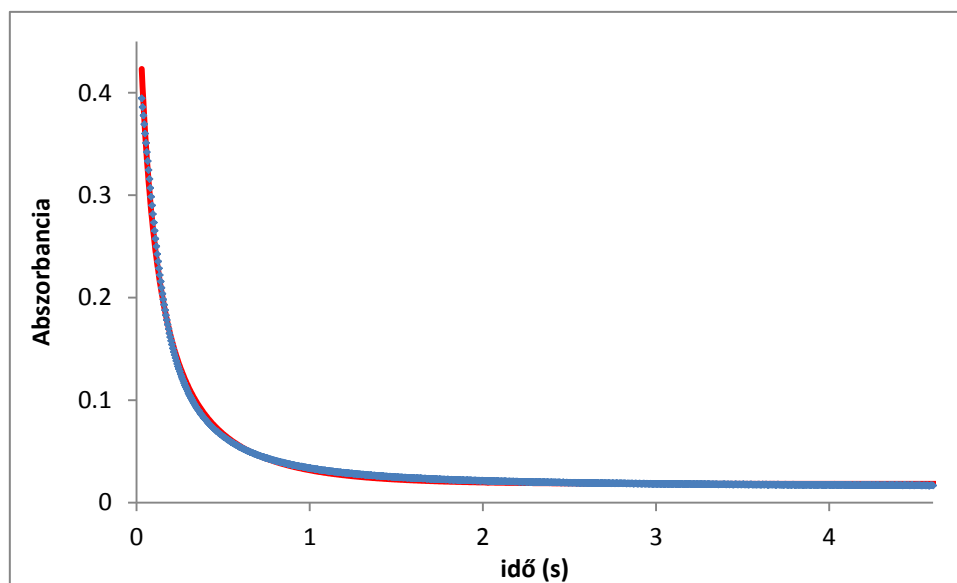
Az autokatalízist legegyszerűbb formában figyelembe vevő sebességi egyenlet, melynek első tagja az autokatalizátortól független, míg második tagja az autokatalizátorra elsőrendű, a következő:

$$\frac{d[\text{KMnO}_4]}{dt} = -k_1[\text{KMnO}_4] - k_2[\text{KMnO}_4]([\text{KMnO}_4]_0 - [\text{KMnO}_4])$$

A differenciálegyenlet megoldásával az alábbi képlethez jutunk:

$$[\text{KMnO}_4] = \frac{[\text{KMnO}_4]_0(k_1 + k_2[\text{KMnO}_4]_0)e^{-(k_1 + k_2[\text{KMnO}_4]_0)t}}{k_1 + 2k_2[\text{KMnO}_4]_0 - k_2[\text{KMnO}_4]_0e^{-(k_1 + k_2[\text{KMnO}_4]_0)t}}$$

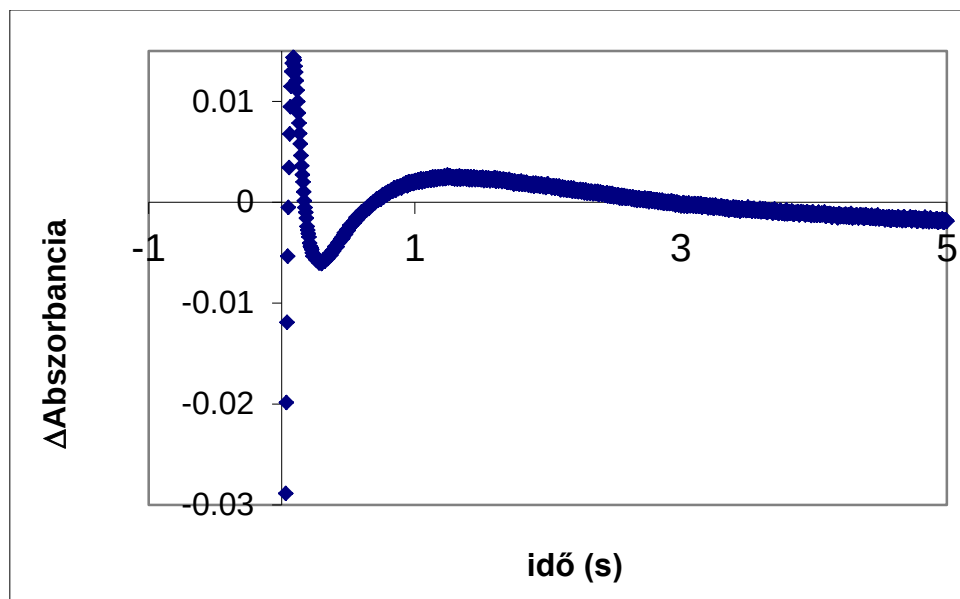
Az így kapott abszorbancia-idő függvényt kitűnően lehetett illeszteni a kísérleti adatokra (15-16. ábra). Ez arra utal, hogy a folyamatban valóban szerepet játszhat az autokatalízis.



15. ábra Autokatalitikus sebességi egyenlet illesztése a mérési adatokra

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$

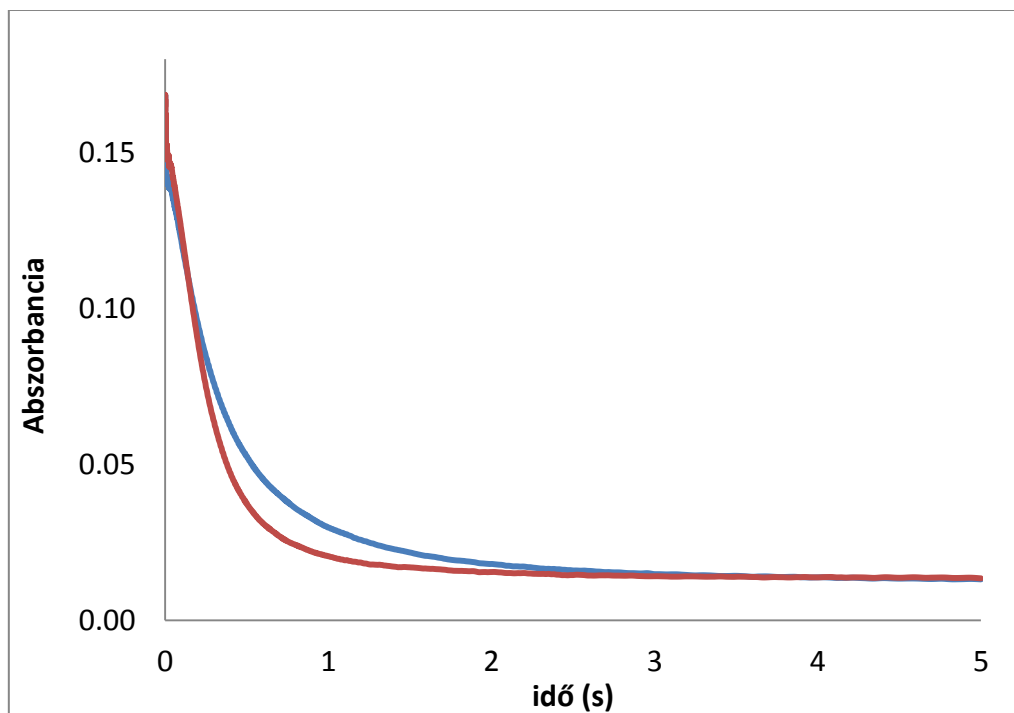


16. ábra A mért és illesztett abszorbanciaértékek különbsége exponenciális illesztés esetén (reziduumok)

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Az előbbieken már említettük, hogy a reakció feltételezett autokatalizátora a keletkező Mn^{2+} -ion. Arról, hogy ez valóban így van-e, az egyik legegyszerűbb módon győződünk meg: két kísérletet végeztünk, amelyekben megegyezett az izonazid, a permanganátion illetve a kénsav koncentrációja is, s az egyetlen különbség az volt, hogy egyikhez mangán(II)-szulfátot is adtunk. A kísérletpár kinetikai görbéi a 17. ábrán láthatók.



17. ábra A Mn^{2+} -ionok autokatalitikus hatásának vizsgálata

$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

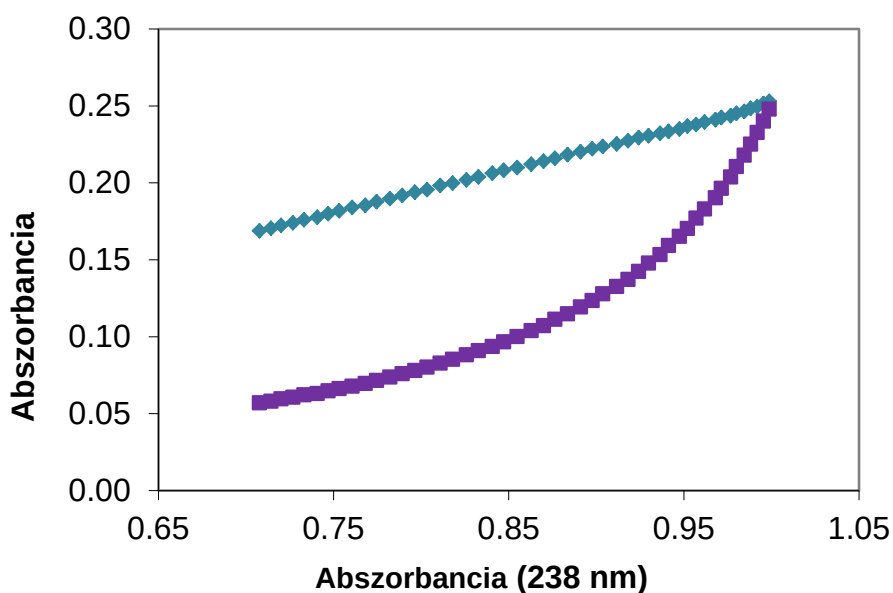
$[\text{izoniazid}] = 4,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 8,00 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,00 \text{ M}$, $[\text{MnSO}_4] = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$

Az ábrán szemmel látható, hogy a Mn^{2+} -ionoknak valóban van hatása a folyamatra, hiszen a két görbe nem egyezik meg. Habár a hozzáadott MnSO_4 hatására valóban nő a reakciósebesség, tehát meredekebb kinetikai görbét kapunk, a hatás mégsem olyan intenzív, ahogy az autokatalitikus görbe illesztési adatai alapján várható lett volna. A háttérben valószínűleg így valamilyen összetettebb kinetika állhat.

5.4.4. A reakció lépéseinek tisztázása

Már a sztöchiometria meghatározásához végzett kísérleteknél is észrevettük, hogy jellegzetes elhajlás figyelhető meg a korrigált abszorbancia-anyagmennyiség arány függvények esetében, főként az izoniazid és a permanganácion együttes elnyelésére jellemző hullámhosszon. Ebből arra következtettünk, hogy az oxidációs folyamat nem egyetlen lépésben zajlik, azonban erről más módon is meggyőződhattünk. A diódasoros spektrofotométeren felvett spektrumból három hullámhosszat választottunk ki, ahol jól követhető a reakció, tehát számottevő abszorbanciacsökkenés vagy növekedés észlelhető. A választásunk a 238, 305 valamint az 525 nm-re esett, ugyanis ezek a hullámhosszak amellet, hogy a reakció előrehaladásáról jó információt szolgáltatnak, elég távol vannak egymástól

ahhoz, hogy ne feltételül ugyanazt az információt szolgáltatassák a folyamatról. A három hullámhosszon mért abszorbanciaértékeket egymás függvényében ábrázolva érdekes következtetéseket vonhattunk le. A 305 nm-en vett értékek a 238 nm-en kapott értékek függvényében egyenest adnak, tehát a reakcióról nagyon hasonló információt nyerhetünk mindkét hullámhosszon. Azonban az 525 nm-en mért abszorbanciaértékek függése már nem lineáris, jelentős elhajlás észlehető a görbén, így megállapítható, hogy a két hullámhosszon történő méréseknél részben különböző folyamatokat tanulmányozunk, valamint az is, hogy a folyamat biztosan nem egy kinetikai lépésben zajlik le (ebben az esetben minden ilyen abszorbancia-abszorbancia ábrának egyenesnek kellene lennie). Tudomásunk szerint az általunk vizsgált rendszerben 525 nm-en a permanganátionon kívül egyik reaktánsnak és terméknek sincs elnyelése, így kijelenthetjük, hogy az extra kinetikai lépésre vonatkozó információt nem ezen a hullámhosszon, hanem a másik kettőn célszerű keresni.



18. ábra Az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció 238, 305 és 525 nm-en mért abszorbanciaértékei egymás függvényében
 $[\text{izoniazid}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,15 \text{ M}$

6. Összefoglalás

Jelen tudományos diákköri dolgozatom tárgya az izoniazid és a permanganácion közötti reakció. Az izoniazid a tuberkulózis kezelésében használt első számú antibiotikum. Lebontása az élő szervezetben oxidáció valamint hidrolízis által történhet. Kísérleteim során az izoniazidot kálium-permanganáttal oxidáltam kénsavas közegben.

Első lépésben a reakció sztöchiometriáját határoztam meg. Az izoniazid kálium-permanganáttal való oxidációja két reakcióúton játszódhat le. Egyik esetben a hidrazin csoport oxidációjával izonikotinsav, míg a másik esetben izonikotinamid keletkezik. A termékeket tömegspektrometriás méréssel is azonosítottuk. A kutatási eredmények, valamint az MS-vizsgálatok mind arra engednek következtetni, hogy a két reakció közül az izonikotinsavat eredményező dominál.

A kinetikai mérésekhez szükség volt az optimális hullámhossz meghatározására. A reakcióelegy teljes spektrumát felvéve ez a hullámhossz 537 nm-nek adódott, amely összhangban van azzal, hogy a reakció során a permanganácion jellegzetes színének eltűnését tapasztaltam. A további kinetikai méréseket ezen a meghatározott hullámhosszon folytattam.

Kísérleteimben az izoniazidot nagy feleslegben alkalmaztam, így azt vártam, hogy permanganácionra nézve a reakciósebesség elsőrendű lesz. Ezt az elméletet azonban el kellett vetnem két okból is. Egyrészt az exponenciális görbe illeszkedése a kinetikai görbére nem volt tökéletes, azonban a nagyobb ellentmondást az elsőrendű illesztésből kapott k_{obs} értékek koncentrációfüggése esetén tapasztaltam, ugyanis az nemcsak az izoniazid, hanem a kálium-permanganácion koncentrációjától is függ.

Figyelembe véve azt, hogy az általam alkalmazott közegben a permanganácionok redukciójakor autokatalitikus hatású Mn^{2+} -ionok keletkeznek, feltételeztem az autokatalízist. Ezt alátámasztja az autokatalitikus sebességi egyenlet meglepően jó illeszkedése a kinetikai görbére. Mindezek mellett azt is megállapítottam, hogy a Mn^{2+} -ionok hatása nem nagy

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

mértékű, tehát gyengén autokatalizált reakcióról van szó. Továbbá azt is meghatároztam, hogy a folyamat nem egyetlen kinetikai lépésben játszódik le, azonban az erre vonatkozó információt nem a kinetikai mérésekhez meghatározott hullámhosszon kell keresni, ugyanis ott a rendszerben részt vevő részecskék közül csak a permanganátióknak van elnyelése.

Összességében kimutattam tehát, hogy az izoniazid és a permanganátion közötti reakció több lépéses, benne autokatalitikus hatások is szerepet játszanak.

7. Summary

The topic of the present thesis is the reaction between isoniazid and potassium-permanganate. Isoniazid is the first antibiotic used in the treatment of tuberculosis, its in vivo breakdown can occur via oxidation and hydrolisis. During my experiments isoniazid was oxidized with potassium- permanganate in a sulfuric acid medium.

At first, the stoichiometry of the reaction was determined. Oxidation of isoniazid with potassium- permanganate gives two products: isonicotinic acid and isonicotinamide is formed. Spectrophotometric titration results and electrospray mass spectrometric experiments suggest that the reaction resulting isonicotinic acid dominates.

For my kinetic measurements, it was necessary to determine the optimal wavelength. Taking the full spectrum of the mixture, this wavelength was found to be 537 nm, which is related to the disappearance of the characteristic color of the permanganate ion. Detailed kinetic measurements were carried out at this wavelength.

During my experiments, a large excess of isoniazid was used so I expected first order reaction rate with respect to permanganate ion. However, this theory had to be rejected for two reasons. First, the fit of the exponential curve onto the measured kinetic curve was not perfect. More importantly, the concentration dependence study showed that the value of the pseudo-first order rate constant depended on the concentration of permanganate ion in addition to that of isoniazid.

Considering that in the medium I used Mn^{2+} ions often have an autocatalytic effect, the possibility of autocatalysis was considered. This is supported by the surprisingly good fit of the autocatalytic rate equation to the kinetic curve as well. In addition, I found that the kinetic curves are influenced by the initial addition of the Mn^{2+} ions. Therefore, this is probably an example of a weak autocatalysis.

Furthermore, I determined that the process does not take place in a single kinetic step. However, However, information on additional kinetic steps is unlikely to be available at the wavelength used for the kinetic measurements as only permanganate ion has absorption there.

In summary, it was shown that the reaction of isoniazid and permanganate ion is a multistep process, in which autocatalytic phenomena also play a role.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Lente Gábor gondos témavezetését, szakmai segítségét, valamint értékes tanácsait, amellyel munkámat támogatta.

Köszönöm Dr. Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy biztosította a kutatáshoz szükséges eszközöket, így lehetővé tette dolgozatom elkészítését.

Végül köszönöm a D427 és D524 labor tagjainak a barátságos légkört, és a segítséget.

A tudományos munkához a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 és TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 pályázatok nyújtottak anyagi segítséget.

9. Irodalomjegyzék

- 1) Szabados Hajnalka: Isoniazid antituberkulotikumot tartalmazó konjugátorok tervezése, szintézise és in vitro biológiai aktivitásuk vizsgálata. TDK-dolgozat. Eötvös Loránd Tudományegyetem (2007).
- 2) Johnsson, K., Schultz, P., J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 7425.
- 3) (a) Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., Cole, S., Nature, 1992, 13, 591.
(b) Hedgecock, L. W., Faucher, I. O., Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 1957, 75, 670.
- 4) A kataláz aktivitást 7-es pH-n, 50 mM Na₂HPO₄ koncentráció mellett, 20 °C-on mérték, 240 nm-en követve az abszorbancia változását.
- 5) Az enzim szubsztrátjai o-fenilén-diamint, 3,3'-diaminobenzolt valamint N-(1-naftil)-etiléndiamint tartalmaztak.
- 6) (a) Curtius, T., J. Prakt. Chem., 1984, 50, 281.
(b) Wolman, Y., Gallop, P. M., Patchornik, A., Berger, A., J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 1890.
(c) Nelson, S. D., Mitchell, J. R., Timbrell, J. A., Snodgrass, W. R., Corcoran, G. B., Science, 1976, 193, 901.
- 7) Wisemann, B., Carpena, X., Feliz, M., Donald, J. L., Pons, M., Fita, I., Loewen, C. P., The Journal of Biological Chemistry, 2010, Vol. 285, 34, 26662.
- 8) Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Bartom, D. H., Jacobs, W. R. Jr., Sacchettini, J. C., Science, 1998, 279, 98.
- 9) Chouchane, S., Lippai, I., Magliozzo, R. S., Biochemistry, 2000, 39, 9975.
- 10) Singh, R., Switala, J., Loewen, P. C., Ivancich, A., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 15974.
- 11) Wengenack, N. I., Uhl, J. R., St. Amand, A. L., Tomlinson, A. J., Benson, L. M., Naylor, S., Kline, B. C., Cockerill III, F. R., Rusnak, F., J. Infect. Dis., 1997, 176, 722.
- 12) Picrattelli, R., Banci, L., Eady, N. A., Bodiquel, J., Jones, J. N., Moody, P. C., Raven, E. L., Jamart-Grégoire, B., Brown, K. A., J. Biol. Chem., 2004, 279, 39000.

- 13) Wengenack, N. I., Hoard, H. M., Rusnak, F., J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 9748.
- 14) Zhao, X., Yu, H., Yu, S., Wang, F., Sacchettini, J. C., Magliozzo, R.S., Biochemistry, 2006, 45, 4131.
- 15) Lei, B., Wei, C. J., Tu, S. C., J. Biol. Chem., 2000, 275, 2520.
- 16) Vilchéze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R. Jr., J. Bacteriol., 2000, 182, 4059.
- 17) Zabinski, R. F., Blanchard, J. S., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 2331.
- 18) Singh, R., Wisemann, B., Deemagarn, T., Donald, I. J., Duckworth, H. W., Carpena, X., Fita, I., Loewen, P. C., J. Biol. Chem, 2004, 279, 43098.
- 19) Singh, R., Wisemann, B., Deemagarn, T., Iha, V., Switala, J., Loewen, P. C., Arch. Biochem. Biophys., 2008, 471, 207.
- 20) Magliozzo, R. S., Marcinkeviciene, J. A., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11303.
- 21) Wang, J. Y., Burger, R. M., Drlica, K., Antimicrob. Agents Chemother., 1998, 42, 709.
- 22) Shoch, H. A., Bowman, B. U. Jr., Ottolenghi, A. C., Merola, A. J., Antimicrob. Agents Chemother. 1985, 27, 404.
- 23) Shoch, H. A., Bowman, B. U. Jr., Ottolenghi, A. C., Merola, A. J., Antimicrob. Agents Chemother. 1985, 27, 399.
- 24) Shoch, H. A., Bowman, B. U. Jr., Ottolenghi, A. C., Merola, A. J., Antimicrob. Agents Chemother. 1985, 27, 408.
- 25) Deemagarn, T., Carpena, X., Singh, R., Wisemann, B., Fita, I., Loewen, P. C., J. Mol. Biol., 2005, 345, 21.
- 26) Goodwin, D. C., Grover, T. A., Aust, S. D., Biochemistry, 1997, 36, 139.
- 27) Pelizetti, E., Meisel, D., Mulac, W. A., Neta, P., J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 6954.
- 28) Juchau, M. R., Horita, A., Drug Metab. Rev., 1972, 1, 71.

Az izoniazid és a permanganát közötti reakció

29) Goodwin, D. C., Aust S. D., Groever, T. A., Biochemistry, 1995a, 34, 5060.

30) Tonomura, B., Nakatani, H. , Ohnishi, M. , Yamaguchi-Ito, J. , Hiromi, K., Anal. Biochem., 1978, 84, 370.

31) Peintler, G. , Nagy, A. , Horváth, A. K., Körtvélyesi, T. , Nagypál, I., Phys. Chem. Chem. Phys., 2000, 2, 2575.