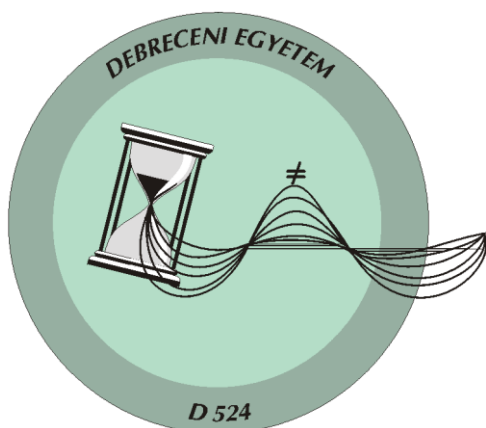




Izoniazid reakciója szervesetlen oxidálószerekkel

Tudományos Diákköri Dolgozat

Bogdándi Virág

II. éves Vegyész MSc hallgató

Témavezető: Dr. Lente Gábor egyetemi docens

DE Szervesetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2014

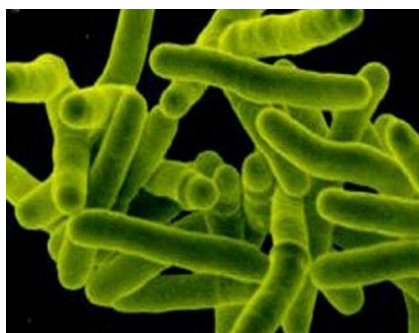
Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Isoniazid oxidációja a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kataláz-peroxidáz enzimje által ²	6
2.2. Az isoniazid átalakulása izonikotinil-NAD-dá ⁷	7
2.3. A peroxidáz-katalizált reakciók elősegítése isoniaziddal ¹⁸	8
2.4. Karbonsav-hidrazidok oxidatív átalakítása karbonsavakká. Az N'-szubsztitúció hatása a reakció sztöchiometriájára ²²	9
2.5. Isoniazid, mint a myeloperoxidáz enzim szubsztrátja és inhibitora: aminadduktumok azonosítása és a szuperoxid-diszmutáz hatása ezek képződésére ²⁷	10
2.6. A NADH oxidációja klóraminokkal és klóramidokkal ³⁶	13
2.7. Az izonikotinsav savas közegben, tallium (III)-mal történő oxidációjának kinetikája és mechanizmusa ⁴²	14
3. Célkitűzések	17
4. Kísérleti körülmények.....	18
4.1. Felhasznált vegyszerek	18
4.2. Méréshez használt műszerek és számítógépes programok	18
5. Kísérletek, eredmények és értelmezésük.....	20
5.1. Az isoniazid és a permanganátion közötti reakció ⁴⁹	20
5.1.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre.....	20
5.1.2. A reakció termékeinek azonosítása.....	23
5.1.3. A mérési hullámhossz meghatározása	24
5.1.4. A reakció kinetikájának tanulmányozása.....	25
5.1.4.1. Elsőrendű kinetika vizsgálata	25
5.1.4.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata	26

5.1.4.3. Autokatalízis tanulmányozása	28
5.1.4.4. A reakciósebesség függése a kénsav koncentrációjától.....	31
5.2. Az izoniazid és a hipoklorit ion közötti reakció	33
5.2.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre.....	33
5.2.3. A reakció kinetikájának tanulmányozása.....	36
5.2.3.1. A mérési hullámhossz meghatározása	36
5.2.3.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata	37
5.2.3.3. A reakciósebesség függése a nátrium-hidroxid koncentrációjától.....	40
6. Összefoglalás	44
7. Summary	45
8. Köszönetnyilvánítás.....	46
9. Irodalomjegyzék	47

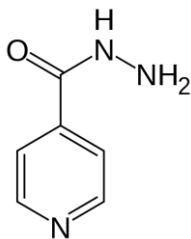
1. Bevezetés

A tuberkulózis (TBC), magyar nevén gümőkór fertőző betegség, melyet a *Mycobacterium tuberculosis* nevű baktérium (1. ábra) terjeszt. Főként a tüdőt támadja meg, de a központi idegrendszert, a keringési rendszert, az ivarszerveket, a csontokat, ízületeket és a nyirokrendszert is megfertőzheti.



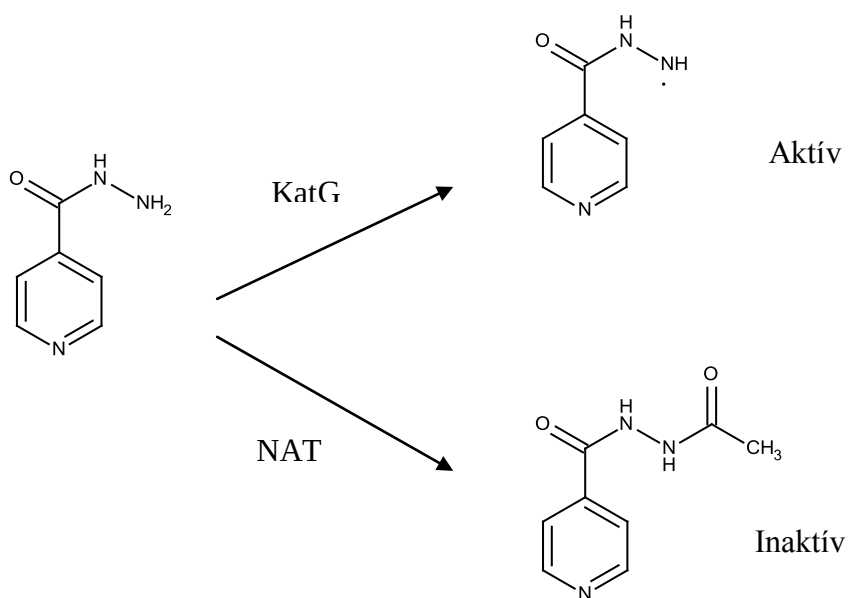
1. ábra A *Mycobacterium tuberculosis*

A betegség nagyon sok halálesetet okozott 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 a 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 a fertőzöttek sokszor teljesen tünetmentesek, a betegség tünetei pedig jellegtelenek, így gyakran csak a boncolás során sikerül megállapítani, hogy az illető halálát a gümőkór okozta. Sok esetben viszont sikerül időben megkezdeni a kezelést, amelynek 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 (INH, 2. ábra) foglalkoztam, amely a tuberkulózis elleni leghatékonyabb antibiotikumok egyike. Magyarországon általában Isonicid kereskedelmi néven használják, de gyógyszer-tári forgalomban nem kapható, mert a rászorulóknak a tüdőgondozó-hálózaton keresztül, ingyen jutnak hozzá.



2. ábra Az isoniazid 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 isoniazid semleges, valamint enyhén lúgos közegben, gyorsan szaporodó baktériumpopulációkkal szemben a leghatékonyabb. Baktericid hatását úgy fejt ki, hogy meggátolja a mikolsavnak, a mikobakteriális sejt fal egyik fontos építőelemének szintézisét emellett a nikotinamid-adenin-dinukleotiddal adduktumot képezve megzavarja a *Mycobacterium tuberculosis* anyagcsere-folyamatait. Hagyományos formájában tulajdonképpen prekursor, így gyakran „prodrug”-ként emlegetik. Biológiai 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) Lebontása az élő szervezetben oxidációval vagy hidrolízissel történhet, ezért munkám során isoniazid szerves oxidálószerekkel való reakcióit vizsgáltam.



3. ábra Az isoniazid oxidatív átalakulásai az élő szervezetben¹

2. Irodalmi áttekintés

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

A hatóanyag-rezisztens TBC törzsek jelenlegi vizsgálataira arra engednek következtetni, hogy az isoniazid biológiailag aktív formáját a kataláz-peroxidáz (KatG) enzimmel való reakció után éri el.^{3,4} Annak érdekében, hogy világosan lássuk az isoniazid hatásmechanizmusát, ezáltal pedig fejlettebb gyógyszereket hozhassunk létre, részletesen meg kell értenünk az isoniazid *Mycobacterium tuberculosis*-ban történő átalakítását, amely folyamat a KatG által megy végbe.

A kétfunkciós enzim széles peroxidáz-specifitással illetve nagy katalázaktivitással rendelkezik. Az enzim isoniaziddal való reakcióját K. Johnsson és P. G. Schultz HPLC módszerrel követte, a termékeket pedig hiteles sztenderdekkel való összevetés, valamint tömegspektrometriás analízis után azonosította. 7,5-ös pH-értéken, 50 mM Na₂HPO₄ koncentráció mellett és 37 °C hőmérsékleten a reakció termékeként azonosították az izonikotinsavat, izonikotinamidot illetve a piridin-4-karbaldehidet, melyek közül a főtermék az izonikotinsav volt. A relatív termékhozam az isoniazid koncentrációjának függvénye, valamint a reakció útvonalától függően változott: az aldehid végül izonikotinsavvá oxidálódott. Annak érdekében, hogy meghatározzák a főtermékben az oxigénatomok eredetét, az isoniazid enzimmel való reakcióját ¹⁸O₂-atmoszférában is végrehajtották, a keletkező izonikotinsavat izolálást követően 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 a jelzett oxigén beépülése. A kísérlet ugyanolyan körülmények között zajlott, mint a ¹⁸O₂-vel végzett. Az enzim reakciója isoniaziddal 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. A kísérlet eredménye két útvonal egyidejű jelenlétére enged következtetni az izonikotinsav képződése során. Egyértékű aminok hozzáadása a reakcióelegyhez – összhangban ezekkel az adatokkal – a megfelelő amidok képződéséhez vezetett, több mint 50 %-os hozammal.^{5,6}

2.2. Az isoniazid átalakulása izonikotinil-NAD-dá⁷

A „prodrug” isoniazid tuberkulózis elleni hatóanyaggá történő aktiválása magában foglalja annak izonikotinil-NAD-dá alakulását, ez a reakció pedig kataláz-peroxidáz igényel. Ben Wisemann és kutatócsoportja megállapította, hogy az előbb említett reakció, bár kisebb mértékben, kataláz-peroxidáz enzim hiányában is továbbhalad abban az elegyben, amely isoniazidot, NAD^+ -t, Mn^{2+} ionokat valamint molekuláris oxigént tartalmaz. Kataláz-peroxidáz enzim jelenlétében az átalakulás sebessége több mint hétszeresére nő. A reakció alapvető fontosságú közterméke a szuperoxidion (O_2^-), amely az oxigén redukciója során keletkezhet akár a Mn^{2+} , akár a kataláz-peroxidáz katalitikus hatására. A reakció köztermékeként azonosított izonikotinil-NAD⁺ gyök szuperoxidion általi redukciója valószínű.

Az átalakulásra a kutatócsoport a következő mechanizmust javasolta: a reakcióban először a hidrazincsoport távozik, majd az izonikotinil rész a NAD^+ -ra addicionálódik, kialakítva az izonikotinil-NAD adduktumot. Az izonikotinil-NAD a mikolsav szintézisét gátolja, ezáltal pedig a *Mycobacterium tuberculosis* fejlődését.

A *Mycobacterium tuberculosis*-beli kataláz-peroxidáz részvétele az isoniazid aktiválásában arra enged következtetni, hogy a peroxidációs folyamatnak szerepe van a reakcióban, így számos tanulmány szól arról, hogy külső oxidálószer alkalmazásával ezt az útvonalat aktiválták. Emellett ESR tanulmányok igazolták, hogy az isoniazid elektronforrásként is szolgálhat a peroxidációs köztermékek redukciójakor.

Módszerek sokaságát alkalmazták az isoniazid aktiválásának közvetett és közvetlen vizsgálatára.⁸⁻¹⁵ A külső oxidálószer hiányában lezajló aktiválási reakciók eredményei^{12,14,16,17} eleinte azt sugallták, hogy a peroxidációs folyamat nem szükséges, viszont az isoniazid, NADH és kataláz-peroxidáz keverékek a molekuláris oxigén szuperoxidionná történő átalakítását, valamint a kis koncentrációban jelen lévő hidrogén-peroxid⁸ NADH-val való redukcióját biztosították volna, ezáltal aktiválva a peroxidációs útvonalat.

Annak ellenére, hogy már erős bizonyítékok szólnak a peroxidációs folyamat részvételére az izonikotinil-NAD adduktum szintézisében, további kísérleteket végeztek a célból, hogy a peroxidációs útvonal segítségével értelmezzék a reakciót. Ezen kísérletek általában olyan modelleket eredményeztek, amelyek redoxiszemponból befejezetlenek voltak^{9,10} (nem volt világos minden lépésben, hogy mi az oxidáló- vagy a redukálószer), vagy olyan feltételezett köztermékeket tartalmaztak, amelyeket semmilyen más rendszerben nem jellemeztek. Egy felvetett lehetőség szerint például az izonikotinil-gyök NAD^+ -al reagálva

izonikotinil-NAD-ot eredményez, noha egy ilyen reakció tulajdonképpen izonikotinil-NAD⁺ gyököt termelne. A gyök oxidáló környezetben történő redukciójának szükségessége arra enged következtetni, hogy az izoniazid aktiválási folyamatának többet kell tartalmaznia egy egyszerű peroxidációs útvonalnál. Ez a gondolatmenet a szuperoxidionhoz vezet, amelynek redukálószerként játszott szerepe ismert az izoniazid aktiválásában.¹¹⁻¹³ A kataláz-peroxidázok szuperoxidiont generálhatnak a molekuláris oxigénből, az izoniazidnak vagy a NADH-nak^{8,11,14} pedig elektrondonorként van szerepe az aktiválásban.^{11,12,15} Három korábbi munka leírta az izonikotinil-NAD szintézisét kataláz-peroxidáz, izoniazid és NAD⁺ keverékekben olyan körülmények között, amelyeknél molekuláris oxigénen kívül semmilyen oxidálószer nem használtak.^{16,17}

Ekkor szintén szuperoxidion képződését tapasztalták. Tehát az izonikotinil-NAD szintézisében a peroxidációs és a szuperoxidion által vezetett útvonalak egymással párhuzamosan vannak jelen, noha relatív jelentőségük még meglehetősen bizonytalan.

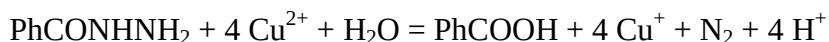
2.3. A peroxidáz-katalizált reakciók elősegítése izoniaziddal¹⁸

Korábbi munkákból ismert, hogy a klórpromazin (CPZ) stimulálja az izoniazid torna-peroxidáz (HRP) által katalizált oxidációját. D. C. Goodwin és csoportja egy olyan rendszert vizsgált, amely izoniazidot, CPZ-t és HRP-t tartalmazott. A végbement reakcióban a klórpromazin katalizátorszerepet töltött be az izoniazid és a HRP közötti elektronátmenetben, ugyanis a HRP és CPZ reakciójakor keletkező CPZ^{•+} gyökkation oxidálta az izoniazidot a megfelelő gyökké. A tapasztalatok megegyeznek Pelizetti megállapításával, miszerint a CPZ^{•+} erős oxidálószer¹⁹ ($E^{\circ} = 0,78 \text{ V}$), illetve Juchau és Horita megfigyelésével, amely szerint a hidrazinok általánosságban jó redukálószerként ismertek.²⁰ A fent említett rendszerben a CPZ redoxmediátor szerepe nyilvánvaló, ugyanis a CPZ^{•+} felhalmozódása izoniazid jelenlétében teljesen gátolt. Emellett az izoniazid oxidációjának sebessége, noha függ a CPZ mennyiségének függvénye, független a jelenlévő izoniazid mennyiségétől. Az említett kinetikus sajátságok a peroxidáz-katalizált oxidációs reakciók jellemző tulajdonságai.²¹ Azaz az izoniazid oxidációjának sebessége CPZ jelenlétében vagy hiányában is erősen függ a HRP katalitikus ciklusának aktivitásától.

2.4. Karbonsav-hidrazidok oxidatív átalakítása karbonsavakká. Az N'-szubsztitúció hatása a reakció sztöchiometriájára²²

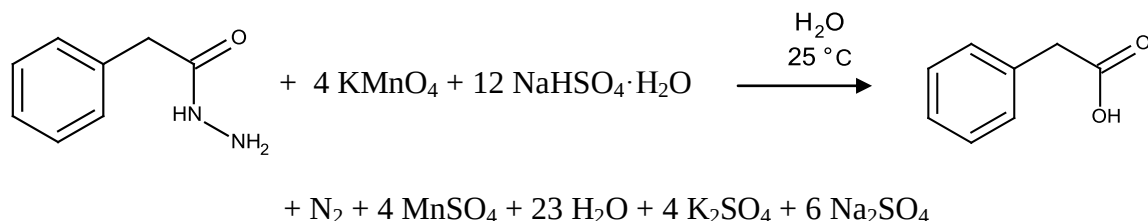
A szerves kémiai szintézisek során gyakran szükséges a karboxilcsoport védelme, melyre leggyakrabban észter, amid vagy hidrazid típusú védőcsoportokat használnak. A hidrazidok savakkal és bázisokkal szemben nem reaktívak, azonban megfelelő oxidálószerekkel ($\text{Cu}^{2+}/\text{O}_2$, NBS, NaIO_4 , $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, CrO_3/AcOH , enzimek)^{23–25} karbonsavakká alakíthatók.²⁶ Kovács Lajos kutatócsoportjával szubsztituálatlan és szubsztituált karbonsav-hidrazidokat oxidált karbonsavakká, többek között $\text{KMnO}_4/\text{KHSO}_4$ reagensleggyel. A permanganátion erős oxidálószerként a szubsztrát más részeivel is reakcióba léphet. Azonban, ha a hidrazidcsoport a legkönnyebben oxidálható funkciócsoporthoz tartozik, megfelelő körülmények között valamint a reakció sztöchiometriájának ismeretében, a permanganátion is tartalmazó reagens alkalmas lehet a védőcsoport eltávolítására.

A benzhidrazid réz(II)-szulfáttal benzoesavvá oxidálható az alábbi reakcióegyenlet szerint:



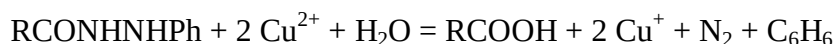
A fentivel analóg reakciót elvégezve több szubsztituált savhidraziddal, a hozam minden esetben több mint 60 % volt, azonban UV sugárzás és/vagy katalitikus reagens jelenlétében az átalakulás nem ment végbe.

A fenilecetsav-hidrazid és kálium-permanganát reakciója az alábbi sztöchiometriával megy végbe:



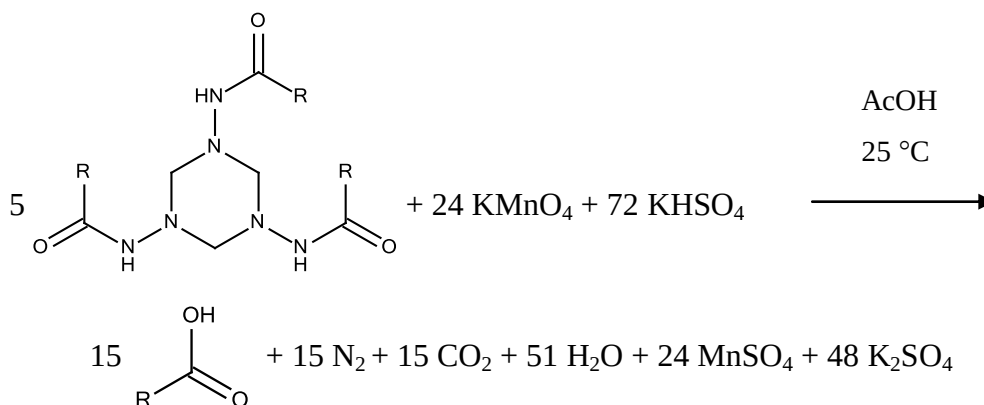
A fent ismertetett sztöchiometria alapján számolt mennyiségekkel elvégezve a reakciót az néhány másodperc alatt hevesen végbement, intenzív hő- és gázfejlődés valamint a permanganátion színének eltűnése közben.

Az N'-fenilbenzhydrazid réz(II)-vel való oxidációja a következőképpen írható le:



Ezt összehasonlítva a benzhydrazid oxidációját leíró egyenlettel, látható, hogy a sztöchiometriát tekintve csak feleannyi réz(II)-ion szükséges.

Az aromás karbonsavak formaldehidszármazékainak permanganátiós oxidációja a várt sztöchiometria szerint, intenzív gáz- és hőfejlődés közben, jó hozammal adta a megfelelő termékeket:



Az izonikotinsav-származék esetében jelentős mennyiségű melléktermék keletkezett.

Az N,N-dimetilbenzhydrazid oxidációjának részletes vizsgálata során 0 °C-on 0,992, míg 50 °C-on 1,30 ekvivalens permanganátió-fogyást tapasztaltak potenciometriás titrálással, GC-MS vizsgálatok során pedig azonosították a nitrogénnek valamint a szén-dioxidnak megfelelő csúcsot 28 illetve 44 m/z értéknél. A kapott eredményeket összevetve a korábbi oxidációs reakciók egyenleteivel, a pontos sztöchiometriát még nem sikerült egyértelműen tisztázni.

2.5. Izoniazid, mint a myeloperoxidáz enzim szubsztrátja és inhibitora: aminadduktumok azonosítása és a szuperoxid-diszmutáz hatása ezek képződésére²⁷

Újabb tanulmányok szerint a neutrofil fehérvérsejtek meghatározó szerepet játszanak a TBC-betegek tüdejében jelenlévő *Mycobacterium tuberculosis* fagocitózisa során²⁸. Ennek fontos következménye lehet a kezelés során alkalmazott izoniazid hatásával kapcsolatban. A neutrofilek ugyanis feleslegben tartalmazzák a myeloperoxidáz enzimet, amely a kataláz-

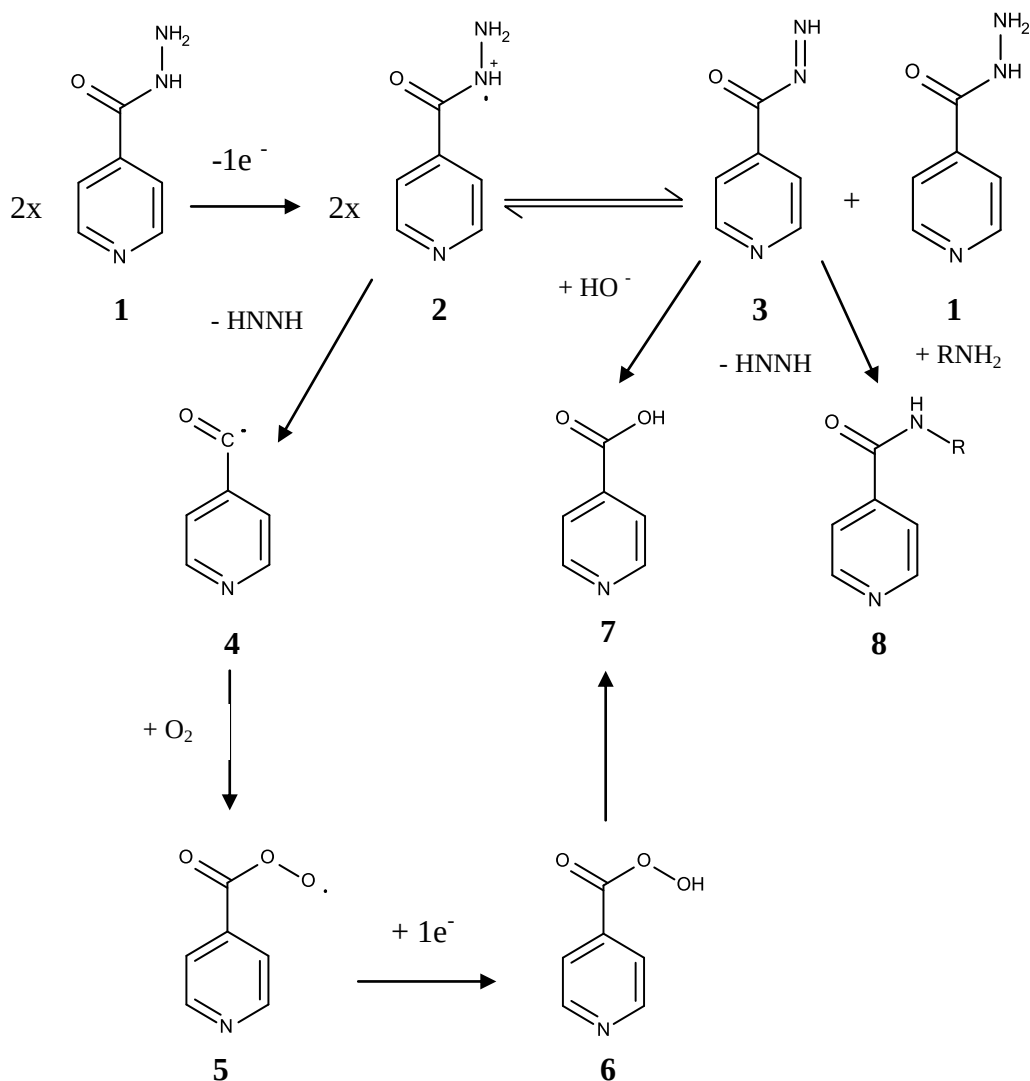
peroxidáz enzimhez hasonló módon képes oxidálni az izoniazidot^{29,30}. Az enzim funkciója a neutrofilek által bekebelezett baktériumok elpusztítása. Ehhez H_2O_2 illetve szuperoxidion segítségével hipoklórossavat állít elő a kloridionok oxidációjával.³¹ A myeloperoxidáz enzim kölcsönhatása a jelen lévő izoniaziddal igen fontos folyamat, hiszen egyrészt határt szabhat a gyógyszer hatáserősségének, emellett a neutrofilek tevékenységét is akadályozhatja. A mechanizmus tisztázásával újabb betekintést nyerhetünk az izoniazid kataláz-peroxidáz általi oxidációs folyamatába.

A myeloperoxidáz enzimátikus körfolyamaton megy keresztül a Cmpd I és Cmpd II redoxmediátorokon keresztül.³⁹ Annak megállapítása végett, hogy az INH mennyire hatásos szubsztátja a Cmpd I-nek illetve Cmpd II-nek, a folyamatokra jellemző sebességi állandók értékeit stopped-flow kísérletek segítségével határozták meg. A kapott adatok arra engednek következtetni, hogy az izoniazid hatékony szubsztátja a Cmpd I-nek, azonban a Cmpd II-vel már kevésbé hatékony a folyamat.

A mechanizmus tisztázása érdekében szükség volt a termékek azonosítására. A fő oxidációs termék az izonikotinsav volt, emellett pedig izonikotinamid valamint egy adduktum jelenlétét mutatták ki. Utóbbi az izonikotinil-csoport metioninra történő addíciós reakciója során alakult ki. Az addíciót egyéb vegyületekkel tanulmányozva megállapították, hogy a termékkepződéshez a megfelelő aminosavak primer aminocsoportja szükséges. A keletkezett adduktumok haptenként funkcionálhatnak, amely magyarázatot ad a TBC-betegek elnyúló kezelése során fellépő autoimmun típusú szövődményekre.

Korábban már kimutatták, hogy az izoniazid egy szerkezeti analógja, a 4-aminobenzoészavhidrazid irreverzibilisen inaktíválja a MPO-t az enzim hem prosztetikus csoportjának blokkolásával.^{32,33} A hatást izoniaziddal tanulmányozva arra a következtetésre jutottak, hogy maga az izoniazid csekély hatással van az enzim specifikus aktivitására, jelentős aktivitáscsökkenést csak H_2O_2 jelenlétében figyeltek meg. Az oxidáció mechanizmusára a kutatócsoport a következő mechanizmust javasolta: a kapott sebességi állandók alapján első lépésben az izoniazid hidrazilgyökké történő oxidációja valószínű a klasszikus peroxidációs körfolyamat részeként. A hidrazilgyökök további sorsát a helyi aszkorbát-, illetve SOD-koncentráció határozza meg. A redoxpotenciál értékeknek megfelelően³⁴ az aszkorbinsav általi redukció valószínű, azonban a redukálószer kicsiny koncentrációja esetén a gyök szabadon reagál. Ekkor acilgyökké történő lebomlás illetve molekuláris oxigén jelenlétében egy diszproporciós reakcióval acildiimid-képződés is lehetséges.^{11,35} A keletkezett acilgyök oxigénnel diffúziókontrollált folyamatban peroxilgyököt képez, amely egy láncreakciót elősegítve egy újabb izoniazidmolekula

oxidációjával acilhidroperoxidot termel. A diszproporcióval képződő acil-diimid aminokkal, mint nukleofilekkel reagálva a megfelelő adduktumok keletkezéséhez vezet.



4. ábra Az izoniazid MPO általi oxidációjának lehetséges útvonalai. A különböző szerkezetek a következők: izoniazid (**1**), hidrazilgyök (**2**), acil-diimid (**3**), acilgyök (**4**), acilperoxilgyök (**5**), acil-hidroperoxid (**6**), izonikotinsav (**7**) illetve egy aminosavval képzett adduktum (**8**)

A felvázolt mechanizmus tükrözi, hogy az izoniazid–MPO kölcsönhatás mind a gyógyszer hatékonyságáért, mind a lehetséges mellékhatásokért is felelhet. A területen folytatott további tanulmányok alternatívát biztosíthatnak arra, hogy aszkorbinsav alkalmazásával elbontva a hidrazilgyököket lecsökkentsük az izoniazid mellékhatásait.

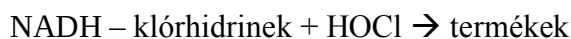
2.6. A NADH oxidációja klóraminokkal és klóramidokkal ³⁶

A redukált nikotinamid-nukleotidok hipohalogénssavakkal történő irreverzibilis lebontását a mai napig széles körben tanulmányozzák.^{37,38} Figyelembe véve a NADH, mint elektrondonor szerepét az élettani folyamatokban, illetve a NADPH enzim kofaktor funkcióját, ezen nukleotidok lebontása valószínűleg befolyásolja a sejtek metabolizmusát valamint az említett halogénközpontú oxidálószerek mikrobaellenes és citotoxikus hatását. A HOX részecskéket az élő szervezetben az aktivált neutrofilek illetve a monociták termelik a halogenidek peroxidáz-katalizált oxidációja során. A vegyületek fontos szereppel bírnak az immunvédelem valamint a gyulladásos szövetelhalás során.^{39,40}

A redukált nikotinamid nukleotidok HOCl általi első, gyors oxidációja különféle izomer klórhidrinek képződéséhez vezet ⁴¹:



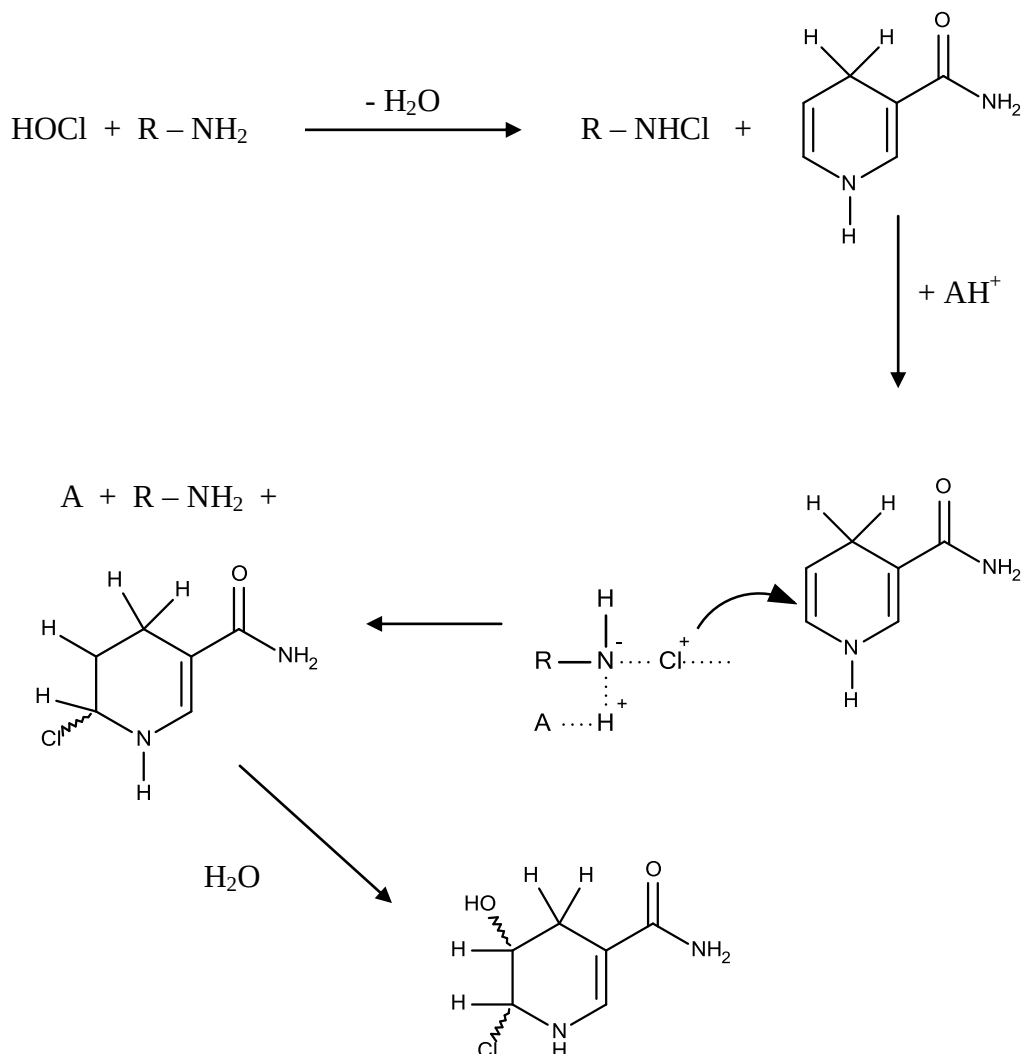
HOCl-felesleg esetén a NADH-klórhidrinek reakcióba lépnek egy újabb HOCl molekulával:



Tekintettel az amin- illetve amidkomponensek sejtekben való jelenlétére, valamint a hipoklórossavval való relatíve nagy reaktivitásukra, az N-halogén vegyületek in vivo képződése igencsak lényeges.

A NADH taurin-klóraminnal illetve HOCl-val végzett oxidációja során az abszorbancia közel ugyanúgy változott mindkét esetben⁴¹, emellett egyéb klóraminokkal is hasonló változást figyeltek meg. Ennek alapján látható, hogy klóraminokkal és klóramidokkal ugyanaz az elsődleges termék keletkezik, mint HOCl esetén³⁷. A HOCl NAD⁺-dal lassú folyamatban reagál, amely valószínűleg a nikotinamid alegység amidcsoportjának illetve az adenzin C6-aminocsoportjának klórozását foglalja magában.

A NADH – klóramin reakcióra a csoport az következő mechanizmust javasolta: első lépésben a Cl⁺ savkatalizált átvitele valósul meg a piridingyűrű C5 és C6 közötti kettőskötésére, ezt pedig az intermedier hidroxilezése követi, amely folyamat NADH-klórhidrineket eredményez.

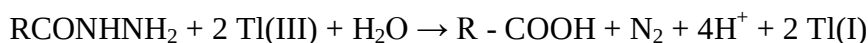


5. ábra A kutatócsoport javaslata a NADH klóraminokkal végzett általános savkatalizált oxidációjának mechanizmusára

2.7. Az izonikotinsav savas közegben, tallium (III)-mal történő oxidációjának kinetikája és mechanizmusa⁴²

A karbonsavhidrazidok tallium(III)-mal történő oxidációját kevesen tanulmányozták részletesen. A savhidrazidok reakciója a legtöbb oxidálószerrel a megfelelő karbonsavakhoz⁴³, bizonyos esetekben pedig észterekhez illetve amidokhoz vezet⁴⁴. A tallium(III)-sók a szerves szintézisek során gyakran használt oxidálószerek, előnyük, hogy mind erősen (perklórsavas illetve kénsavas közegben), mind gyengébben (híg sósavas közegben) oxidálószerként használhatók. A szakirodalomban már ismertették, hogy a savhidrazidok esetében a tallium(III)-mal történő reakció a C-N kötés felhasadását eredményezi⁵⁰, azonban a mechanizmust még nem vizsgálták.

A reakciókat pszeudo-elsőrendű körülmények között hajtották végre, azaz nagy feleslegben tartva az izoniazid koncentrációját az oxidálószerrel szemben. A reakció sztöchiometriáját Tl(III) ismert feleslegét használva, a megmaradó oxidálószer jodometriás meghatározásával tanulmányozták. A kapott eredményt az alábbi egyenlet ismerteti:



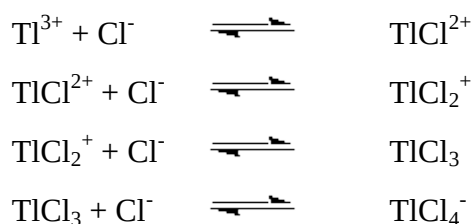
A reakciót HCl és HClO₄ keverékében hajtották végre, ugyanis a reakció perklórsavas közegben gyorsan végbemegy, sósav jelenlétében viszont lassabb, így az alkalmazott titrálási technikával is mérhető a sebesség. A reagensek hatásának tanulmányozásakor a következő eredményekre jutottak: a k_{obs} sebességi együttható értéke a hidrazid kezdeti koncentrációjától függ, valamint a hidrazidkoncentráció növekedésével értéke nő. A reakciórend az oxidálószerre nézve egységnyi, míg a sebességi állandó a hidrogénion koncentrációjának növekedésével csökken. A kapott adatok alapján a kloridion koncentrációjának csökkenésével a sebességi együttható értéke is csökken. Emellett az adatok egyértelműen azt mutatják, hogy a sebességi együtthatók mintegy kétszeresére nőnek, ha a hőmérséklet 10 °C-kal emelkedik.

A reakció kinetikája és mechanizmusa

A hidrogénion és kloridion hatása a hidrazidok protonálódásából következik⁴⁸, emellett az oldatban a tallium(III) különböző klorokomplexei találhatók. A hidrazidok savas közegben az alábbi egyenlet szerint protonálódnak:

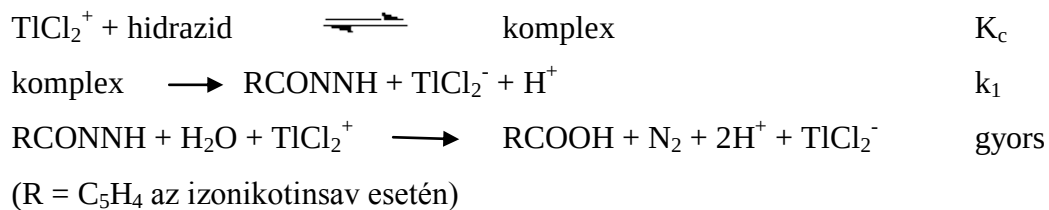


A Tl(III) stabil komplexeket képez kloridionnal az alábbi formula szerint: TlCl_n^{3-n} , ahol n a komplexben lévő kloridionok számát adja meg, melyet a következő egyenletek szemléltetnek.



A kísérleti körülmények között gyakorlatilag az összes Tl(III) TlCl_2^+ formájában van jelen, a sebességi állandók függése a kloridion-koncentrációtól pedig azt mutatja, hogy a

redoxireakcióban az aktív részecske a $[\text{TlCl}_2^+]$ -komplex. Így a reakció röviden az alábbi kinetikai sémával írható le:



A reakció pedig az alábbi sebességi egyenlettel jellemezhető:

$$\text{Reakciósebesség} = \frac{k_1 K_c [\text{hidrazid}]_{\text{teljes}} [\text{TlCl}_2^+]_{\text{teljes}}}{(1 + K_c [\text{hidrazid}]) (1 + K_H [\text{H}^+]) (1 + \beta_1 [\text{Cl}^-] + \beta_2 [\text{Cl}^-]^2)}$$

3. Célkitűzések

Kísérleti munkám során az izoniazid két szervesen oxidálószerrel történő reakcióját vizsgáltam permanganátió esetén savas, míg hipokloritió esetén lúgos közegben. Elsőként a folyamatok sztöchiometriájának meghatározását, majd a reakciósebesség koncentráció- illetve pH-függésének vizsgálatát terveztem. A kinetikai kísérleteket tekintve a reakciósebesség koncentrációfüggésének tanulmányozása után további célként tűztük ki a reakciósebességi egyenlet meghatározását valamint a termék(ek) azonosítását. Végül pedig a kinetikai modellek felállítását követően a reakciók mechanizmusára kívántunk javaslatot tenni.

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.*), a Mn^{2+} -törzsoldatot szilárd mangán(II)-szulfátból (*Reanal*) készítettük. A kénsavoldatokat tömény kénsavból (*J.T. Baker*), készítettük hígítással, a mérőoldatok pontos koncentrációját sav-bázis titrálással határoztuk meg.

Az izoniazid–hipokloriton reakció tanulmányozásakor kloridmentes NaOCl oldatot használtunk, amelynek előállítása az irodalomban található módszer alapján történt.⁴⁵ Az állandó ionerősség fenntartása érdekében az oldatok hígítása minden esetben 1,0 M-os nátrium-perklorát oldattal történt, amelyet szintén az irodalomban található módszer alapján állítottunk elő.⁴⁶ A nátrium-hidroxid oldatokat szilárd nátrium-hidroxidból (*Normapur*) készítettük.

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*, *Shimadzu UV-1800*, illetve *Agilent 8543* diódasoros spektrofotométerrel végeztük 1,000 cm-es valamint 2×0,454 cm-es optikai úthosszú kvarcküvetákban.

A pontos kénsav-, és nátrium-hidroxid-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.^{47,48}

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

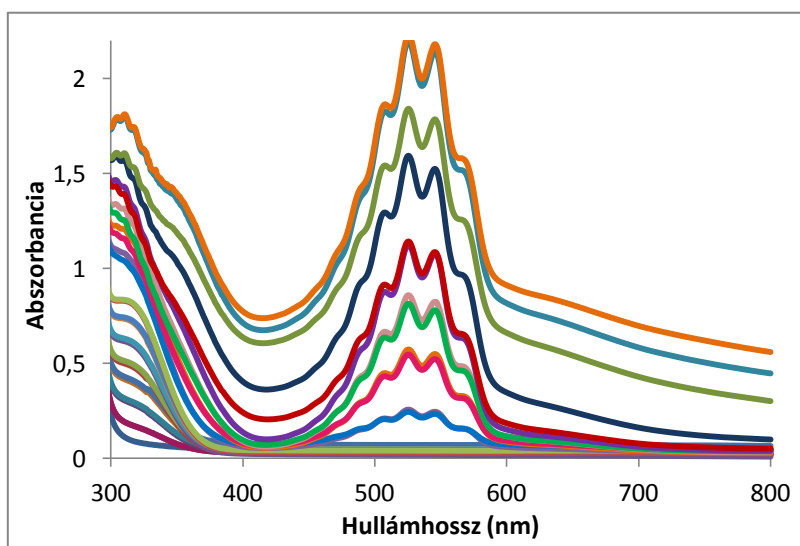
5.1. Az izoniazid és a permanganátion közötti reakció⁴⁹

5.1.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre

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

Először $1,000\text{ cm}^3$ kezdeti térfogatú, $2,50 \times 10^{-3}\text{ M}$ koncentrációjú izoniazidoldatot titráltam $4,85 \times 10^{-3}\text{ M}$ koncentrációjú kálium-permanganát-oldattal, amelyből minden lépésben $0,100\text{ cm}^3$ -t adtam a rendszerhez, majd felvettem a keverék spektrumát. A kénsav koncentrációja $9,85 \times 10^{-1}\text{ M}$ volt. A mérést fordítva is elvégeztem, ekkor $1,000\text{ cm}^3$ kezdeti térfogatú, $5,89 \times 10^{-3}\text{ M}$ koncentrációjú kálium-permanganát-oldatot titráltam $1,77 \times 10^{-3}\text{ M}$ koncentrációjú izoniazidoldattal, szintén $0,100\text{ cm}^3$ -t hozzáadva minden lépésben, majd felvéve a spektrumot. A kénsav-koncentráció megegyezett az előző mérésben alkalmazottal.

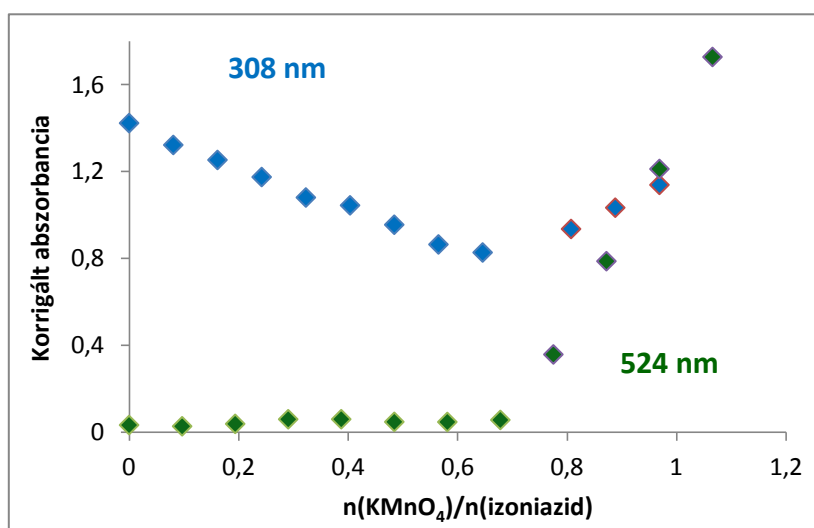
A 6. ábra egy spektrofotometriás titrálás során felvett spektrumsorozatot mutat be. Az elektromágneses színek látható tartományában az elnyelő részecske a kálium-permanganát, így az ábrán annak jellegzetes, több elnyelési maximumot is mutató spektrumát láthatjuk.



6. ábra A spektrofotometriás titrálás során felvett spektrumok

[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 két hullámhosszat választottunk ki. Az egyik az UV - tartományban található (308 nm), itt az izoniazidnak és a permanganátióknak, valamint a reakció termékeinek is van elnyelése. A másik hullámhossz a látható tartományban van (524 nm), így kálium-permanganátra nézve szelektív. Az itt mért abszorbanciaértékeket a hígulás értékével megszorozva korrigált abszorbanciaértékekhez jutottunk. Erre azért volt szükség, mert az oldatok fényelnyelése 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 görbéket 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 (7. ábra).



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

$$\lambda = 308 \text{ nm}, 524 \text{ nm}$$

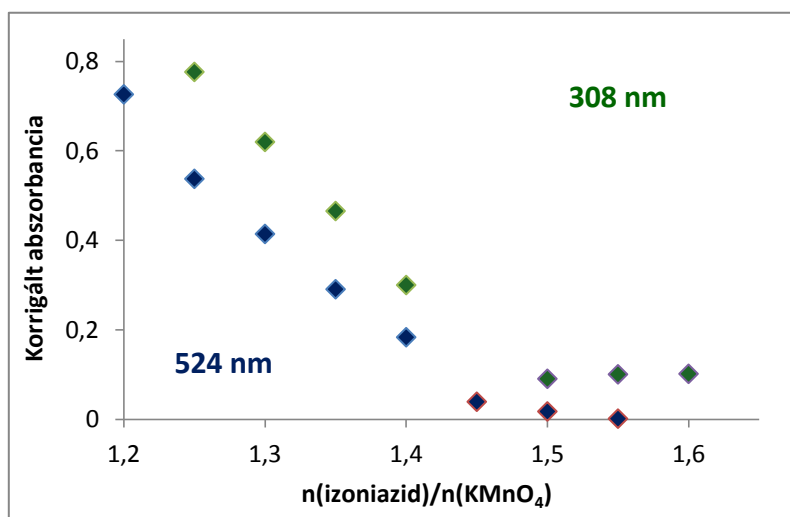
$[\text{izoniazid}] = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 4,85 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott

KMnO_4 térfogata = $0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

Az illesztett egyenesek egyenletéből megkapott metszéspont 524 nm-en: $x = 0,714 \pm 0,003$, ennek alapján a reakcióban egy izoniazidmolekulára átlagosan 0,714 permanganátió jut.

308 nm-en a metszéspontot szintén az illesztett egyenesekből határoztuk meg, amelynek értéke: $x = 0,68 \pm 0,01$. A kapott x érték szintén az egy izoniazidmolekulára jutó permanganácionok átlagos számát jelzi.

Fordítva elvégezve az eljárást, azaz kálium-permanganát oldatot titrálva izoniaziddal, az izoniazid arányát kifejező töréspontot az előbb kapott értékek reciprokanál vártuk (8. ábra).



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

$$\lambda = 308 \text{ nm}, 524 \text{ nm}$$

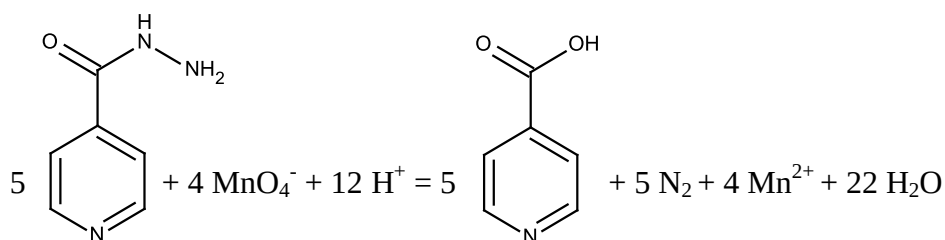
$[\text{izoniazid}] = 1,77 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KMnO}_4] = 5,89 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 9,85 \times 10^{-1} \text{ M}$, hozzáadott izoniazid térfogata = $0,100 \text{ cm}^3$ minden lépésben

A kálium-permanganátra jellemző elnyelési hullámhosszon a kapott metszéspont: $x = 1,42 \pm 0,01$.

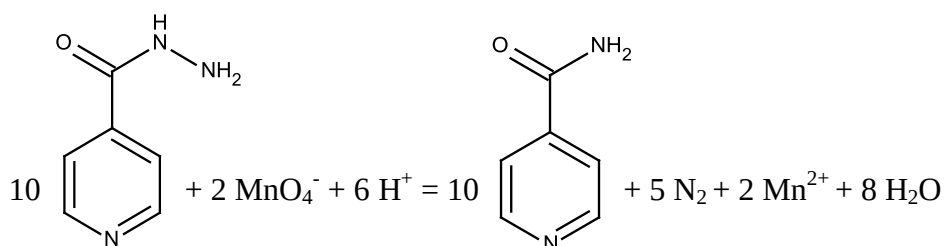
A kapott érték, mely ebben az esetben az egy permanganácionra jutó izoniazidmolekulák számát jelzi, nagyjából megfelel a várt eredménynek. Az izoniazid-permanganácion elnyelésre jellemző hullámhosszon a töréspont: $x = 1,47 \pm 0,006$.

Miután meghatároztuk a sztöchiometriát kifejező anyagmennyiség-arányokat, a lehetséges folyamatokon kezdtünk el gondolkodni. 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 nitrogéngáz és víz is képződik a reakció során:



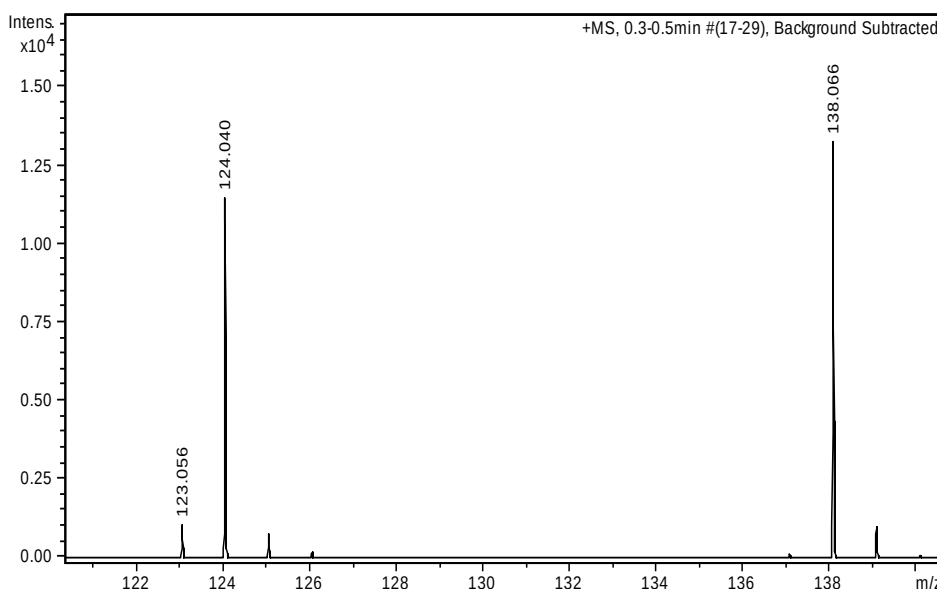
A másik lehetséges folyamatban az oxidáció terméke az izonikotinamid, amely mellett szintén Mn^{2+} -ionok, nitrogéngáz és víz keletkezik:



A két ismertett reakció sztöchiometriáját figyelembe véve látható, hogy az első esetben egy izoniazidmolekulára 0,8 permanganácion fogy, míg a második reakció esetén az egy izoniazidra jutó permanganácionok száma mindössze 0,2. Ezt összevetve a sztöchiometria meghatározásánál kapott mérési eredményekkel látható, hogy a két lehetséges útvonal közül az első jelenléte a meghatározó.

5.1.2. A reakció termékeinek azonosítása

A sztöchiometria meghatározása során feltételezett termékek jelenlétéről tömegspektrometriás analízis segítségével győződtem meg. A reakcióelegyben összekeverés előtt az izoniazid és a kénsav koncentrációja 1×10^{-3} M, a permanganácion koncentrációja 5×10^{-4} M volt (9. ábra).

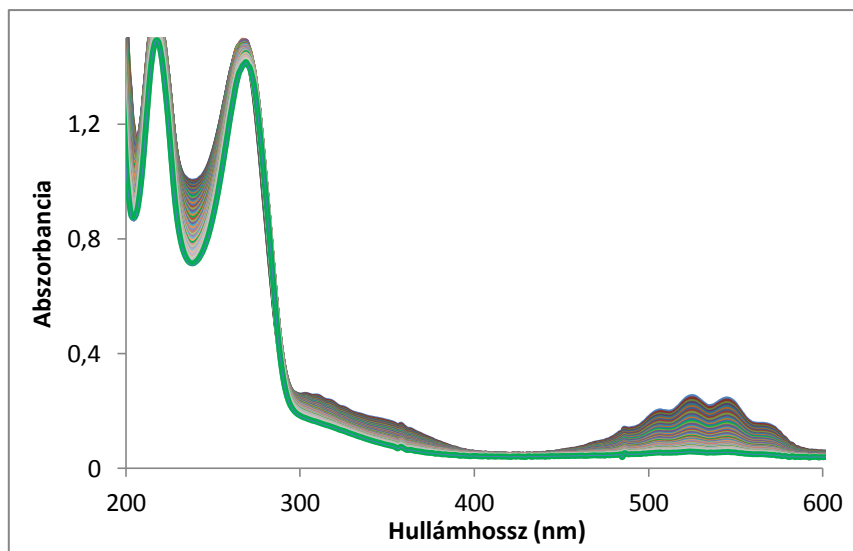


9. ábra A reakcióelegy tömegspektruma

A felvett tömegspektrumban nagy intenzitással megjelenik a feleslegben maradt protonált izoniazid 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 megállapított ténnyel, miszerint a két termék közül az izonikotinsav keletkezik számottevő mértékben, hiszen a protonált izonikotinsav jele sokkal intenzívebb, mint a protonált izonikotinamidé.

5.1.3. A mérési hullámhossz meghatározása

A sztöchiometria meghatározása után további spektrofotometriás kísérletek során diódasoros készülékkel követtem a reakcióelegy a spektrális változásait az idő függvényében (10. ábra). Mivel látható hullámhossztartományban a kálium-permanganáton kívül egyik reaktánsnak sincs elnyelése (az eredmények elemzése szerint pedig a termékeknek sem), így a keverék abszorbanciáját is nagymértékben annak az elnyelése határozza meg. A kinetikai mérések elvégzéséhez ez az elnyelési hullámhossz ideális. Ezért további, részletes kinetikai kísérleteket 537 nm-en folytattunk.

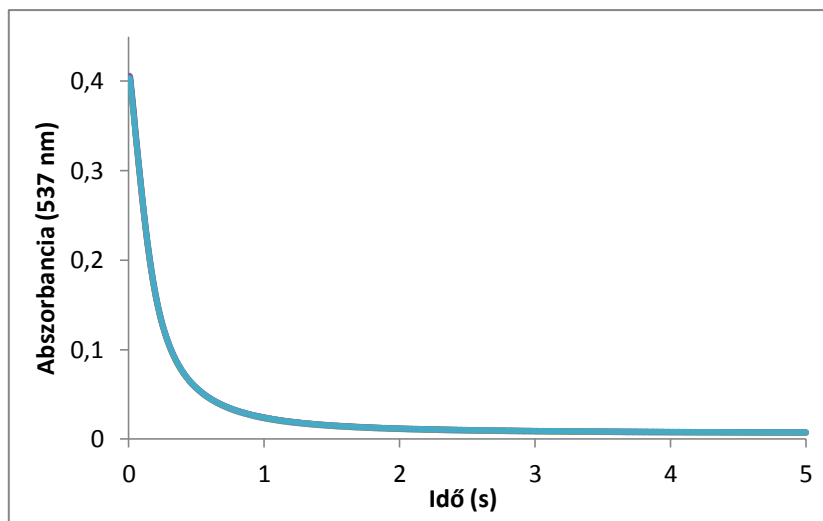


10. ábra A spektrum változása az időben az izoniazid és permanganátion reakciója során
[izoniazid] = $2,5 \times 10^{-3}$ M, $[\text{KMnO}_4]$ = $1,25 \times 10^{-4}$ M, $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ = 1,15 M

5.1.4. A reakció kinetikájának tanulmányozása

5.1.4.1. Elsőrendű kinetika vizsgálata

A reakció kinetikai görbéjét stopped-flow készüléken való mérés segítségével vettem fel, ugyanis az izoniazid kálium-permanganáttal való reakciójának időbeli lefutása rendkívül gyors. Gyakorlatilag két másodperc elteltével már nem változott az abszorbancia, tehát a folyamat befejezettnek tekinthető. A mérést az előzőekben meghatározott hullámhosszon, 537 nm-en végeztük. A reprodukálhatóságot jelzi, hogy a 11. ábrán öt egymás utáni kísérlet görbéje látható.



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

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

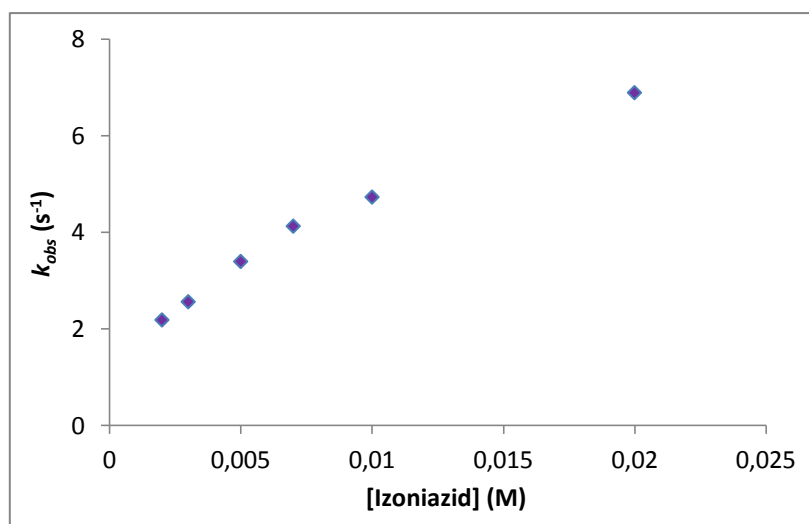
$$[\text{izoniazid}] = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,47 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

A feltüntetett koncentrációértékek tükrözik, hogy permanganátióra nézve pszeudo-elsőrendű körülmények között dolgoztunk, hiszen az izoniazidot nagy feleslegben alkalmaztuk. Ennek megfelelően a 11. ábrán látható görbére megkíséreltük az exponenciális függvény illesztését. A kapott eredmény bizonyos mértékben megfelelt várakozásainknak, ugyanis az exponenciális görbe viszonylag jó közelítéssel illeszthető a kísérleti adatokra.⁴⁹ Ez azt bizonyíthatná, hogy a reakciósebesség elsőrendű a meghatározó reaktánsra, azaz a KMnO_4 -ra nézve. Az illeszkedés azonban nem tökéletes, erre a jelenségre később még visszatérünk.

5.1.4.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata

A reakciósebesség koncentrációfüggését oly módon is vizsgáltuk, hogy az egyik reaktáns állandó kiindulási koncentrációja mellett a másikat folyamatosan változtattuk, az elsőrendű illesztéssel meghatározott k_{obs} értékeket pedig a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Állandó permanganation- és változó izoniazidkoncentráció mellett azt tapasztaltuk, hogy a koncentrációfüggés nem lineáris (12. ábra).



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

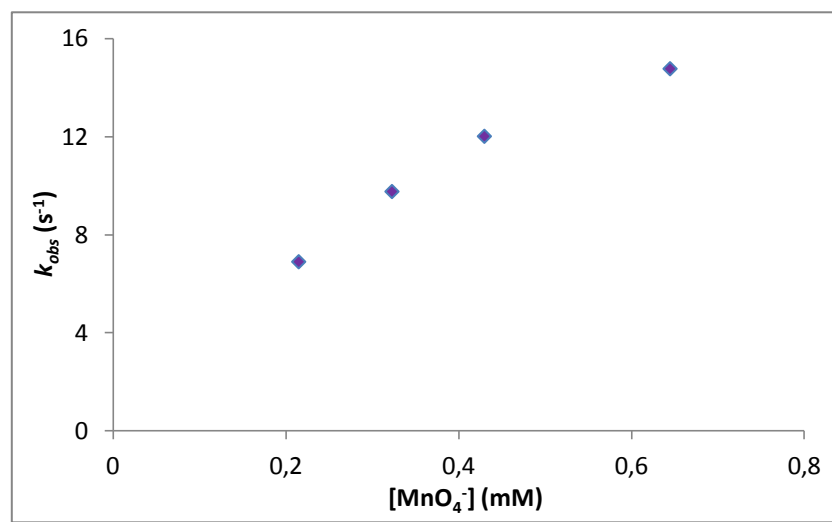
$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

$$[\text{KMnO}_4] = 4,29 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 0,98 \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

A kísérletsorozatot elvégeztük állandó izoniazid- és változó permanganátion-koncentráció mellett is, majd 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 (13. ábra).

A permanganátionra kapott koncentrációfüggés élesen ellentmond az exponenciális illesztéseknél feltételezett elsőrendű kinetikának. Abban az esetben ugyanis a reakciósebességre jellemző k_{obs} értékek nem függnének a koncentrációtól, tehát konstansfüggvényt kellene kapnunk. A már említett nem tökéletes illeszkedés és az illesztésekből nyert k_{obs} -értékek jelentős függése a permanganátion koncentrációjától együttesen már bizonyossá teszi, hogy nem egy egyszerű pszeudo-elsőrendű folyamatról van szó (13. ábra). 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.



13. ábra Az izoniazid és KMnO₄ közötti reakció pszeudo-elsőrendű sebességi állandójának függése a permanganátion koncentrációjától

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

$$[\text{izoniazid}] = 2,00 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 0,98 \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

5.1.4.3. Autokatalízis tanulmányozása

Az alkalmazott savas közeg alapján nyilvánvaló, de már a sztöchiometria meghatározásánál is ismertettük, hogy a lejátszódó reakciók során Mn²⁺-ionok keletkeznek, amelyek autokatalitikus hatása permanganometriás titrálások esetében már régóta ismert. Ennek alapján feltételezhető, hogy a reakcióban keletkező Mn²⁺-ionok a folyamatban az autokatalizátor szerepét tölthetik be, így a teljes kinetikai görbe valóban nem pszeudo-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.

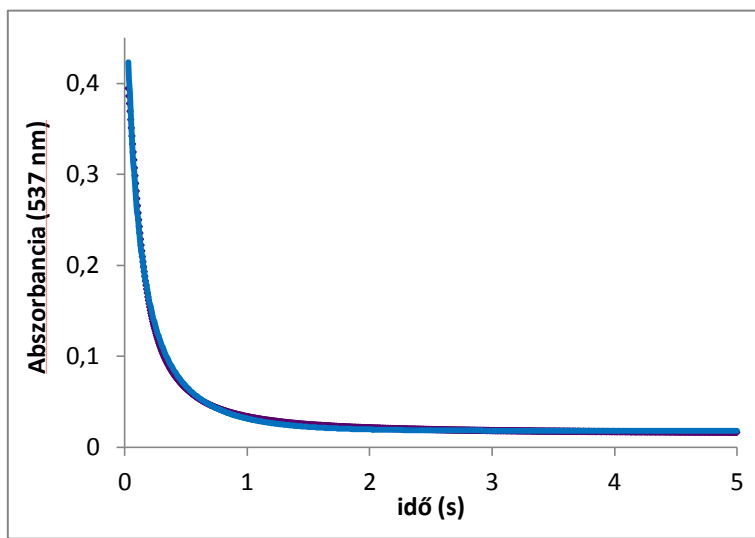
Az autokatalízist legegyszerűbb formában leíró sebességi egyenlet, melynek első tagja az autokatalizátortól független, míg második tagja az autokatalizátorra elsőrendű, a következő:

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

A differenciálegyenlet megoldásával pedig a következő koncentráció-idő görbéhez jutunk:

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

Az így kapott függvényt kitűnően lehetett illeszteni a kísérleti adatokra (14. ábra). Ez arra utal, hogy a folyamatban valóban szerepet játszhat az autokatalízis.



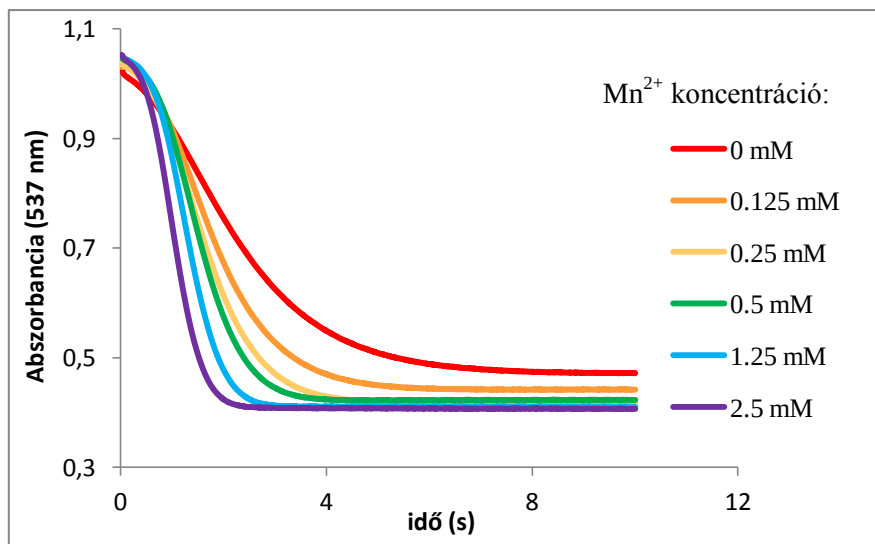
14. ábra Autokatalitikus sebességi egyenlet illesztése a mérési adatokra

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

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

$$T = 25^\circ\text{C}$$

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: olyan rendszereket tanulmányoztunk, amelyekben megegyezett az izoniazid, a permanganátion illetve a kénsav koncentrációja. Az egyetlen különbség az volt, hogy kezdetben mangán(II)-szulfátot is adtunk hozzájuk, figyelve azt, hogy ez milyen hatással van a kinetikai görbék lefutására. A kísérlet eredménye a 15. ábrán látható.



15. ábra A Mn²⁺-ionok autokatalitikus hatásának vizsgálata

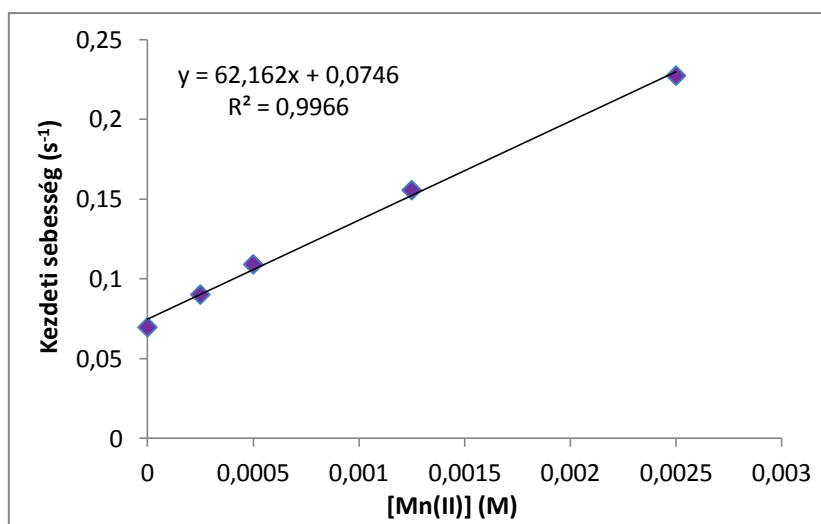
$$\lambda = 537 \text{ nm}$$

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

$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

Az ábrán látható, hogy a Mn²⁺-ionoknak valóban van hatása a folyamatra, hiszen a reakció a növekvő Mn²⁺-koncentrációval fokozatosan gyorsul. Habár a hozzáadott MnSO₄ 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.

A kinetikai görbék kezdeti szakaszára egyenest illesztve meghatároztuk a kezdeti sebességeket, majd megfigyeltük azok függését a Mn²⁺-ionok koncentrációjától (16. ábra):



16. ábra Az izoniazid és KMnO_4 közötti reakció kezdeti sebességének függése a Mn^{2+} -ionok koncentrációjától

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

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

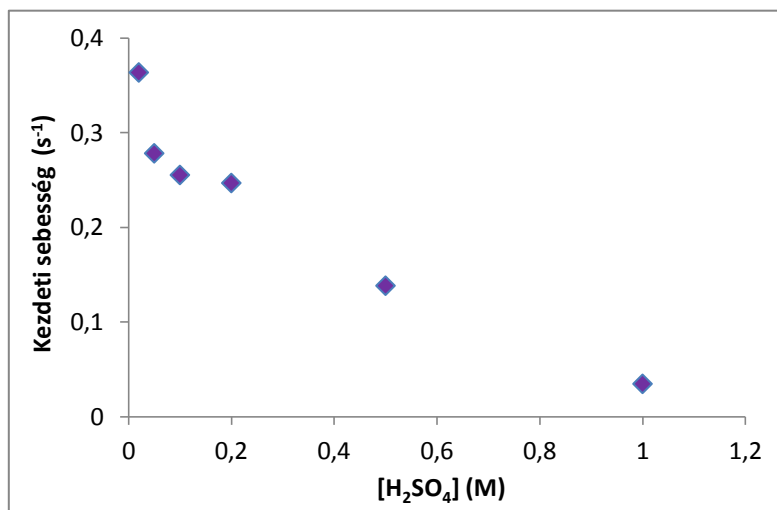
$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

A lineáris összefüggés arra utal, hogy a reakciót leíró sebességi egyenletben Mn^{2+} -ionokra nézve elsőrendű tag is található. Esetünkben ez azt jelenti, hogy a 28. oldalon, az 5.1.4.3 fejezetben már ismertetett elsőrendű autokatalízis sebességi egyenlete valóban alkalmazható erre a reakcióra, hiszen abban az autokatalizátortól független tag mellett egy arra elsőrendű tag is található. Az egyenes pozitív tengelymetszete arra utal, hogy a reakció Mn^{2+} -ionok jelenléte nélkül is lejátszódik (izoniazid és permanganátion esetében a kapott görbék az origóból indulnak ki), ez is összhangban van azzal a kvalitatív megfigyeléssel, hogy a reakció MnSO_4 kezdeti hozzáadása nélkül is gyorsan lejátszódik, s nem tapasztalható az erősen autokatalitikus folyamatokra jellemző indukciós periódus

5.1.4.4. A reakciósebesség függése a kénsav koncentrációjától

Kísérleteink során a kénsav használata a savas közeg biztosítása végett történt, a hozzáadott mennyiség az egyes méréseknél pedig nem volt szisztematikus. Kíváncsiak voltunk azonban, hogy a kénsav koncentrációjának változtatása milyen hatással lesz a reakció sebességére, így azonos izoniazid- és permanganátion koncentráció mellett 0,010-1,000 M tartományban változtattuk a rendszerben lévő kénsav koncentrációját. Az előző koncentrációfüggéssel kapcsolatos mérésekkel ellentétben a kiértékelés során a pszeudoelsőrendű sebességi együtthatók értékei helyett a kezdeti sebességre kapott értékeket

ábrázoltuk a kénsavkoncentráció függvényében. A kezdeti sebesség értékeket a kapott kinetikai görbe kezdeti szakaszára történő másodfokú függvény illesztésével kaptuk meg. A kapott eredmények alapján a koncentrációfüggés a 17. ábrán látható:



17. ábra: A reakció kezdeti sebességének változása a kénsav koncentrációjának függvényében

$$[\text{izoniazid}] = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{KMnO}_4] = 1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

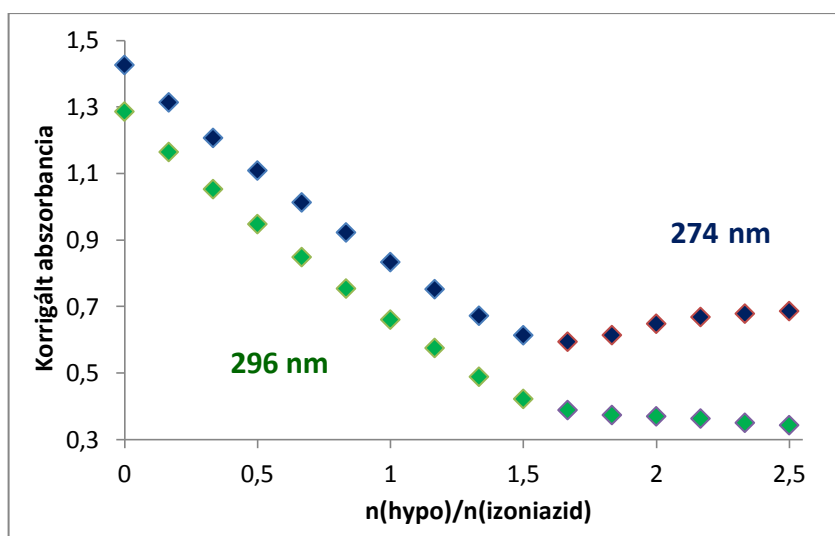
Jól látható, hogy a kénsav koncentrációjának növekedésével a kezdeti sebességek csekély mértékben csökkennek. Ez a típusú függés gyakran jellemző a szerves anyagok oxidációs folyamataira, vagy másképpen megfogalmazva: az oxidálószerek általában savas közegben tárolhatók jobban vizes oldatban. A hatás értelmezéséhez azonban további kísérletekre van szükség. Az izoniazid három ismert pK-ja 1.8, 3.8 és 10.8.⁵⁰ A legkisebb nincs távol a kísérletek során alkalmazott tartománytól, így nem kizárható, hogy a reakciósebesség pH-függésének kialakításában szerepe van az izoniazid protonálódási egyensúlyainak is.

5.2. Az izoniazid és a hipoklorition közötti reakció

5.2.1. A reakció sztöchiometriája, a végbemenő folyamatok köre

A permanganátionos oxidációhoz hasonlóan elsőként ebben az esetben is a folyamat sztöchiometriáját kívántuk meghatározni a már bemutatott spektrofotometriás titrálással. Első lépésben 2,000 ml kezdeti térfogatú, 3×10^{-4} M koncentrációjú izoniazidoldatot titráltunk 1×10^{-3} M koncentrációjú lúgos hipoklorition-oldattal, amelyből minden lépésben $0,100 \text{ cm}^3$ -t adtunk az elegyhez, majd felvettük a spektrumot.

A hipoklorition anyagmennyiségének meghatározásához a kapott spektrumsorozat két abszorpciós maximumát választottuk, így a megfelelő ábrákat a 274 nm-en illetve a 296 nm-en kapott adatok felhasználásával szerkesztettük (18. ábra).



18. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség – arányának függvényében

$$\lambda = 274 \text{ nm}, 296 \text{ nm}$$

[izoniazid] = 3×10^{-4} M, [hipoklorition] = 1×10^{-3} M, [NaOH] = 0,01 M, hozzáadott NaOCl térfogata = $0,100 \text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

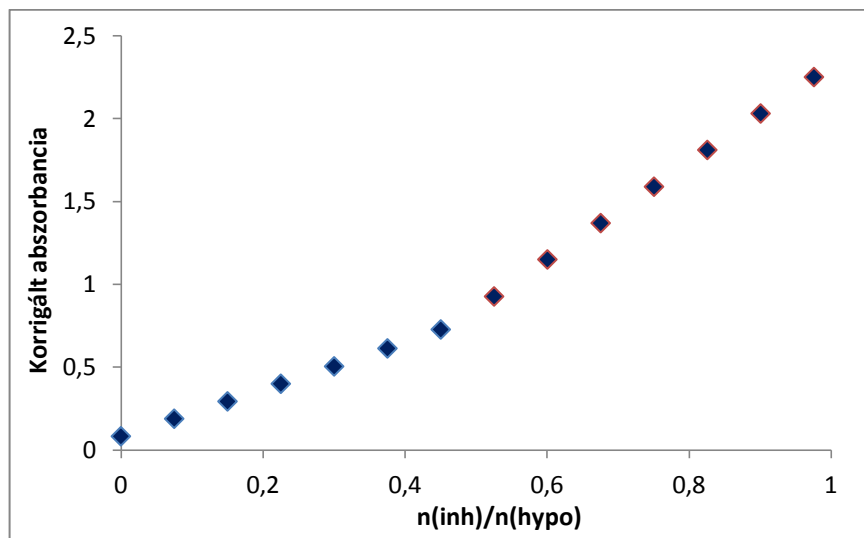
$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Az illesztett egyenesek egyenletéből számolt metszéspont: $x = 1,49 \pm 0,03$, azaz egyetlen izoniazidmolekulára átlagosan mintegy 1,5 hipoklorition jut a reakció során.

A másik hullámhosszon ugyanúgy számolva a metszéspont értéke: $x = 1,49 \pm 0,04$, amely szintén az egy izoniazidmolekulára jutó hipokloritionok átlagos számát jelzi. Fordítva

elvégezve a kísérletet, ebben az esetben is a kapott x értékek reciprokát vártuk. A $2,000\text{ cm}^3$ $6,4 \times 10^{-4}\text{ M}$ koncentrációjú lúgos hipoklorition-oldat titrálását $1 \times 10^{-3}\text{ M}$ koncentrációjú izoniazidoldattal végeztük, amelyből tizenhárom lépésben, mindig $0,100\text{ cm}^3$ -t adtunk a reakcióelegyhez, majd felvettük a spektrumokat.

A felvett spektrumok alapján ebben az esetben egyetlen hullámhosszat tudtunk kiválasztani az izoniazid anyagmennyiségének meghatározására, így a korrigált abszorbanciaértékek változását 264 nm -en vizsgáltuk (19. ábra):



19. ábra A korrigált abszorbanciaértékek változása a reaktánsok anyagmennyiség – arányának függvényében

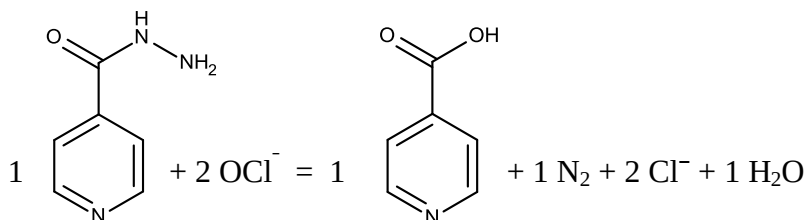
$$\lambda = 264\text{ nm}$$

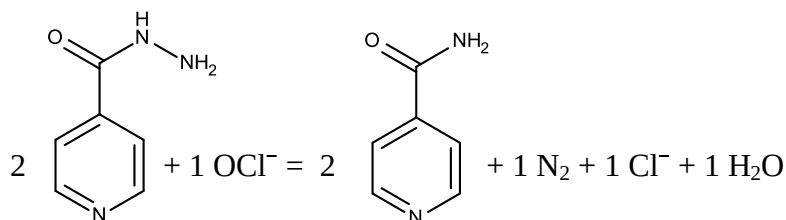
$[\text{izoniazid}] = 1 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{hipoklorition}] = 6,4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0,01\text{ M}$, hozzáadott izoniazid térfogata = $0,100\text{ cm}^3$ minden egyes lépésben

$$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$$

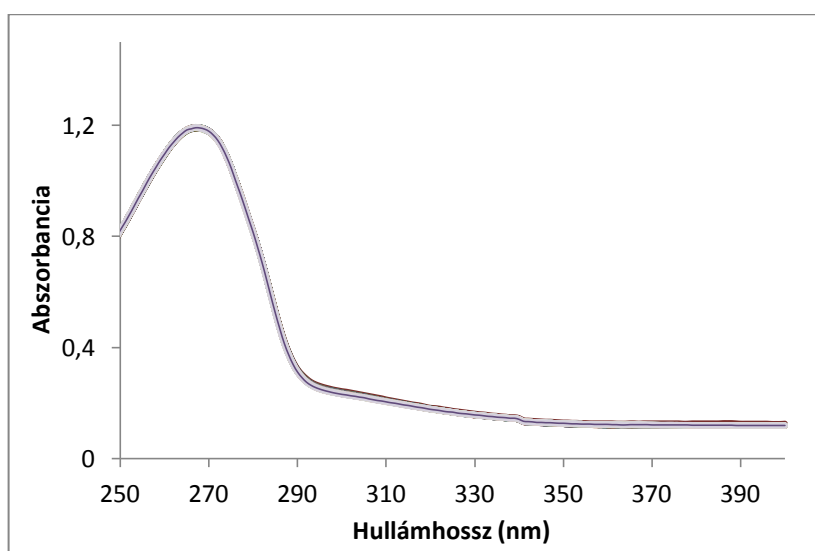
Az illesztett egyenesek metszéspontja ebben az esetben: $x = 0,42 \pm 0,02$, azaz egyetlen hipokloritionra átlagosan $0,42$ izoniazidmolekula jut a reakció során.

A feltételezett sztöchiometria itt is két határérték között változhat:





Látható, hogy a kísérletesen kapott értékek nem felelnek meg az elméleti várakozásoknak. Ennek oka egy összetettebb sztöchiometria illetve több párhuzamos reakciólépés is lehet. A jelenség magyarázata további megfontolásokat illetve kísérleteket igényel. Az azonban látható, hogy a hipokloritonok feleslege esetén egységnyi izoniazidra a vártnál több hipokloriton fogy. Ennek oka például lehet az is, hogy a folyamatban nitrogéngáz helyett valamilyen más oxidációs állapotú termék keletkezik. A jelenség tisztázásának érdekében fotometriás kísérlettel győződünk meg arról, hogy a két lehetséges oxidációs termék, az izonikotinsav illetve az izonikotinamid nem lép-e további reakcióba egy újabb hipokloritonnal. Izonikotinsav esetén 50 perc elteltével sem tapasztaltunk változást (20. ábra), tehát a termék stabilisnak tekinthető az általunk tanulmányozott időintervallumban:



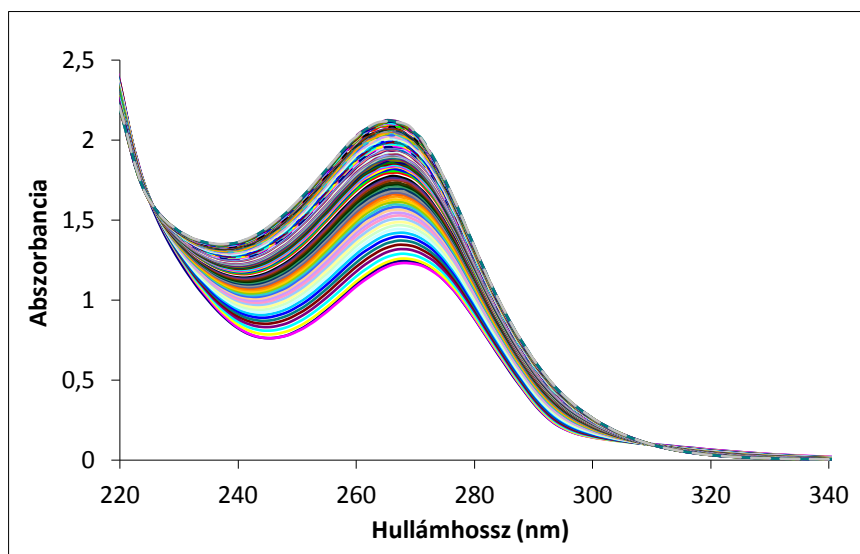
20. ábra Az izonikotinsav – hipokloriton reakció spektrális változásai

[izonikotinsav] = 5×10^{-4} M, [NaOCl] = 5×10^{-4} M, [NaOH] = 0,01 M,

T = 25 °C

t = 50 perc, ciklusidő = 30 másodperc

A kísérletet izonikotinamiddal elvégezve azt tapasztaltuk, hogy a kezdeti spektrum változott, azaz további reakció ment végbe (21. ábra). Ez magyarázatot adhat a sztöchiometria meghatározásakor tapasztalt nem várt jelenségre, illetve a reakció mechanizmusának tanulmányozásakor is fontos tényező lesz.

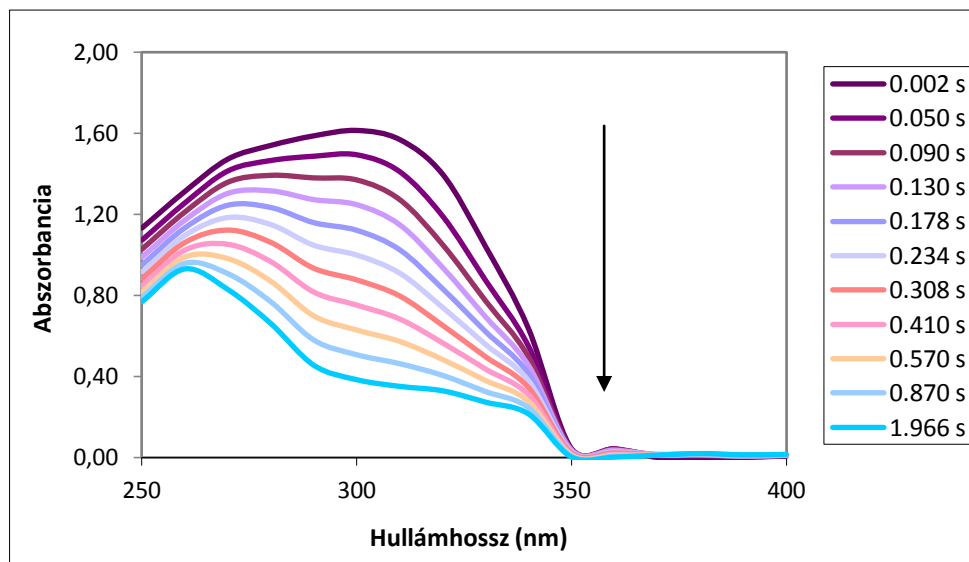


21. ábra Az izonikotinamid – hipoklorit ion reakció spektrális változásai
[izonikotinamid] = 5×10^{-4} M, [NaOCl] = 5×10^{-4} M, [NaOH] = 0,01 M,
T = 25 °C
t = 50 perc, ciklusidő = 30 másodperc

5.2.3. A reakció kinetikájának tanulmányozása

5.2.3.1. A mérési hullámhossz meghatározása

A mérési hullámhossz meghatározásához stopped-flow készülék segítségével vettük fel a reakcióelegy spektrumát. Látható, hogy a kiindulási elegy 300 nm körül széles elnyelési sávval rendelkezik (22. ábra). A további kinetikai méréseket a maximum közelében, 320 nm-en végeztük.



22. ábra Az izoniazid – hipokloriton reakció spektrális változásai

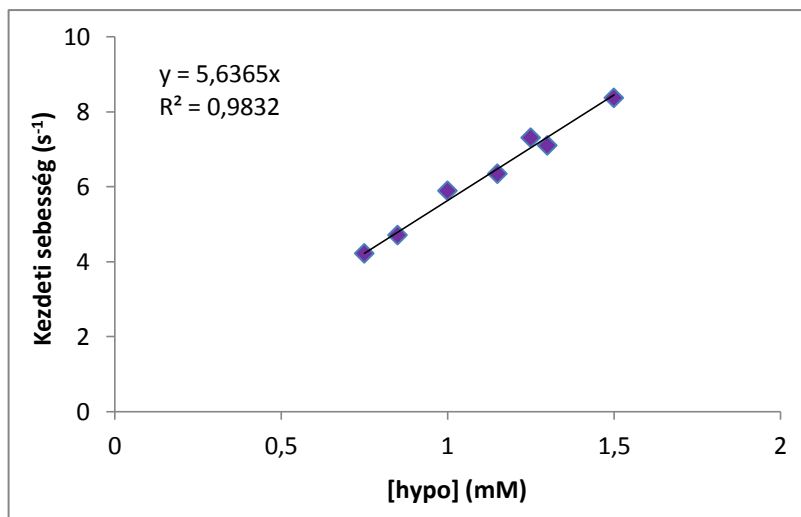
[izoniazid] = 5×10^{-4} M, [NaOCl] = 1×10^{-3} M, [NaOH] = 0,01 M

$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

$t = 2\text{ s}$

5.2.3.2. A reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálata

A reakciósebesség koncentrációfüggését az előzőekhez hasonló módon tanulmányoztuk, azaz csak egyetlen reaktáns koncentrációját változtattuk a kinetikai görbék felvétele során. A folyamat kinetikáját a kezdeti sebességek módszerével tanulmányoztuk, azaz a görbék első 5 pontjára (0 – 0,05 s) illesztett egyenesek meredekségét használtuk a folyamat sebességének a jellemzésére. A kapott kezdeti sebességeket (adott hullámhosszon, a rendűség megállapításánál a moláris abszorbanciák ismeretére nincsen szükség) az adott reagens koncentrációjának függvényében ábrázolva hipokloriton esetében lineáris összefüggést figyeltünk meg (23. ábra), azaz a folyamat elsőrendű a hipokloriton koncentrációjára nézve. Itt meg kell jegyezni, hogy a 23. ábra pontjainak a folyamat sztöchiometriáját is figyelembe véve minden esetben a hipokloriton van feleslegben, bár ez a felesleg viszonylag csekély, azaz pseudo-elsőrendű körülmények fenntartásához korántsem lenne elegendő. Így tehát a rendűséget szigorúan véve úgy kell értelmezni, hogy az oxidálószer feleslege esetén érvényes.



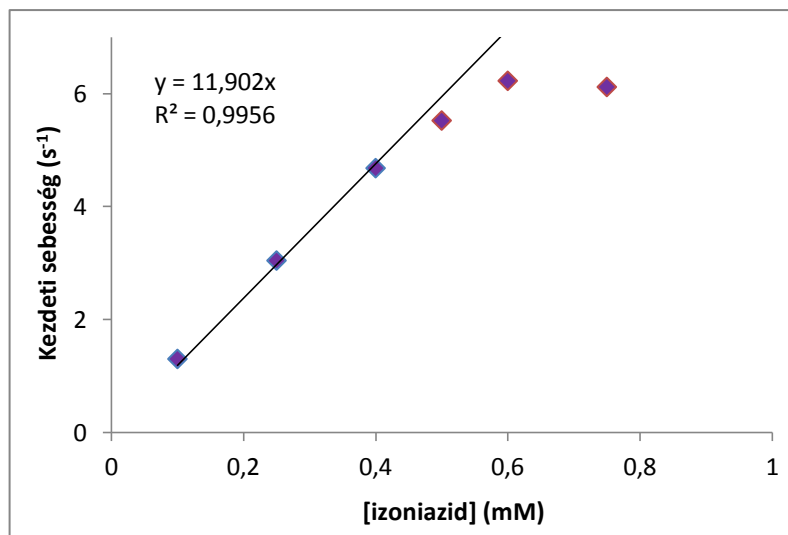
23. ábra A reakciósebesség függése a hipokloriton koncentrációjától

$$[\text{izoniazid}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{NaOH}] = 0,01 \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$t = 20 \text{ s}$$

A kísérletet izoniaziddal is elvégezve azt tapasztaltuk, hogy kisebb koncentrációk esetén az összefüggés szintén lineáris, azonban a koncentráció növelésével egy telítési görbére hasonló ábrához jutunk (24. ábra). Ennek oka, hogy a reakciósebesség az izoniazid koncentrációjára nézve is elsőrendű, azonban nagyobb koncentrációk esetében már független a koncentrációtól, ezért tapasztaljuk a telítési jelenséget. A 24. ábra alaposabb tanulmányozásával megállapítható, hogy az egyenes arányosságtól, vagyis az izoniazidra nézve elsőrendű függéstől való eltérés akkor válik kimutathatóvá, amikor összességében az izoniazid van feleslegben a reakció során. Ez önmagában még nem indokolja az egyenestől való eltérést, de jó összhangban van azzal, hogy a sztöchiometriai vizsgálatok során a két különböző típusú (izoniazid – nátrium-hipoklorit, illetve nátrium-hipoklorit – izoniazid) spektrofotometriás titrálás látványosan különböző sztöchiometriai arányokra vezetett. Így az nagy biztonsággal kijelenthető, hogy izoniazidfelesleg esetén más reakcióutak (is) fontosak, mint ha az oxidálószeret használjuk feleslegben. A tapasztalatok szerint a rendszer kinetikai leírása oxidálószer-felesleg esetében könnyebb.



24. ábra A reakciósebesség függése az izoniazid koncentrációjától

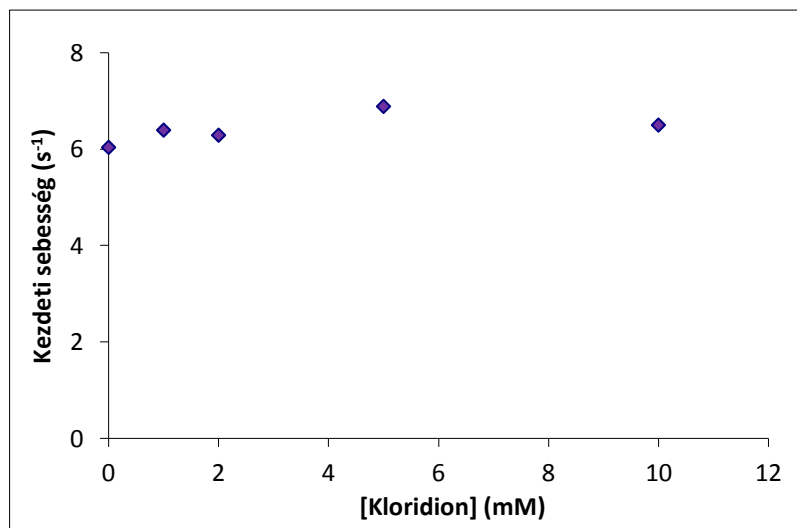
$$[\text{NaOCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}, [\text{NaOH}] = 0,01 \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$t = 20 \text{ s}$$

Könnyen előfordulhat, hogy a NaOCl oldat kloridion-tartalma különböző mellékreakciókhoz vezethet, ezzel többek között a folyamat sebességét is változtatva. Kísérleteink során kloridmentes hipoklorit-ion-oldattal dolgoztunk, azonban kíváncsiak voltunk arra, hogy a mi rendszerünkben tapasztalható-e ehhez hasonló viselkedés. Ennek érdekében tanulmányoztuk a NaOCl-oldatokhoz előzetesen hozzáadott szilárd NaCl koncentrációjának hatását a kinetikai görbék lefutására. A 25. ábra egy ilyen kísérletsorban meghatározott kezdeti sebességeket mutatja be.

Ahogy az a 25. ábrán látható, a hozzáadott kloridionok nem befolyásolták reakció kezdeti sebességét, s a részletes kinetikai tapasztalatok szerint a kloridion-koncentráció változása a kinetikai görbék lefutását sem befolyásolta. Így megállapítható, hogy az általunk tanulmányozott rendszerben az említett hatás nem játszik szerepet. Ennek okát jelentheti a lúgos pH, ugyanis az alkalmazott tartományban a kloridionok hozzáadása nem változtatja meg a hipoklorit-ion és a klór közötti egyensúlyt, amely nagy kloridion-koncentráció esetén is a hipoklorit-ion irányába van eltolódva. Másként megfogalmazva: a $\text{OCl}^- + 2\text{H}^+ + \text{Cl}^- = \text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$ egyensúlyban lúgos pH-kon a hidrogénion-koncentráció túlságosan kicsi a jelentős klórképződéshez.



25. ábra A reakciósebesség függése a kloridionok koncentrációjától

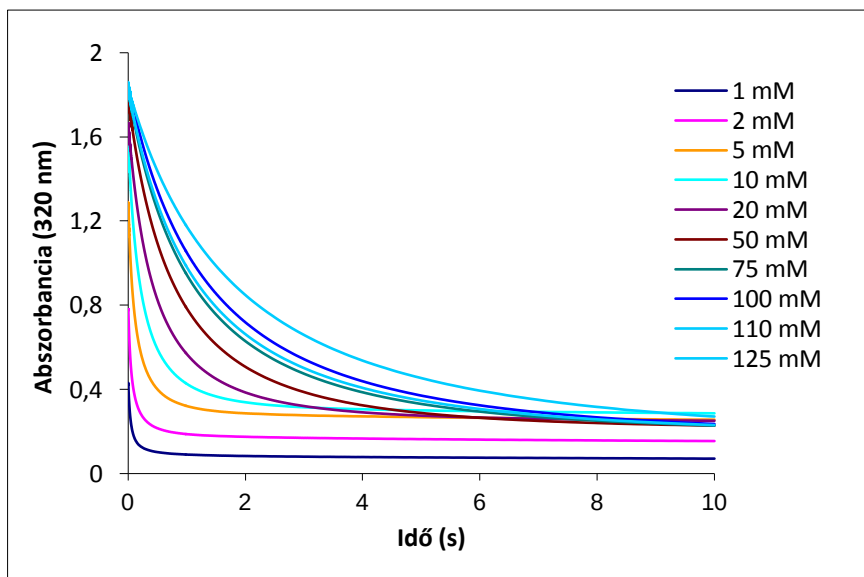
$[\text{izoniazid}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NaOCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0,01 \text{ M}$

$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

$t = 10 \text{ s}$

5.2.3.3. A reakciósebesség függése a nátrium-hidroxid koncentrációjától

Az egyes reagensek mellett fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy az alkalmazott NaOH koncentrációja, azaz a közeg pH-ja, hogyan hat a reakciósebességre. Ezt az előző alfejezetben már megemlített klórképződési egyensúlyi reakció pH-függése is indokolta. A koncentrációfüggést $1 \times 10^{-3} - 1,25 \times 10^{-1} \text{ M}$ koncentrációtartományban tanulmányoztuk, amelynek során a 26. ábrán látható kinetikai görbéket kaptuk. A görbék egyértelműen azt mutatják, hogy lúgosabb oldatokban az izoniazid és a hipokloriton közötti oxidációs reakció lényegesen lassabbá vált. Míg 11 körüli pH-n (1 mM NaOH) az abszorbanciaváltozás gyakorlatilag 0,5 s alatt végbement, addig 13-as pH fölött (125 mM) NaOH a spektrális változások befejeződéséhez mintegy 10 s-ra volt szükség.



26. ábra A reakciókinetikai görbék lefutása különböző NaOH- koncentráció esetén

$$[\text{izoniazid}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{NaOCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$t = 10 \text{ s}$$

A kísérletek során azt az érdekes jelenséget tapasztaltuk, hogy a kezdeti abszorbanciaértékek rendkívül eltérnek (27. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy készülék holtidején belül lejátszódik egy gyors protonálódási egyensúly. Hogy erről meggyőződjünk, különböző NaOH-koncentrációk mellett vettük fel egy adott koncentrációjú izoniazidoldat spektrumát. A növekvő lúgkoncentrációval együtt eltolódás jelentkezett a nagyobb hullámhosszak felé, amely alátámasztja a gyors folyamatról való feltételezéseinket. A kezdeti abszorbancia – [NaOH] összefüggés az alábbi összefüggéssel jellemezhető:

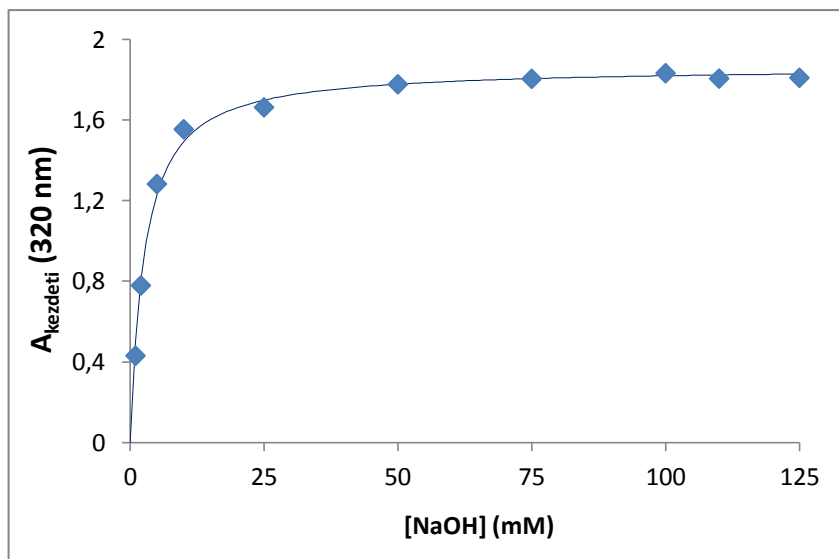
$$A_{\text{mért}} = \frac{A_{\text{savas}} * K_b + A_{\text{bázikus}} * [\text{OH}^-]}{K_b + [\text{OH}^-]},$$

ahol A_{savas} = a protonált formához tartozó abszorbancia

$A_{\text{bázikus}}$ = a deprotonált formához tartozó abszorbancia

Az összefüggésben szereplő $[\text{OH}^-]$ értékeket pedig a következő módon számítottuk ki:

$$[\text{OH}^-] = \frac{c_{\text{NaOH}} - c_{\text{izoniazid}} - K_b + \sqrt{(c_{\text{NaOH}} - c_{\text{izoniazid}} - K_b)^2 + 4K_b c_{\text{NaOH}}}}{2}$$



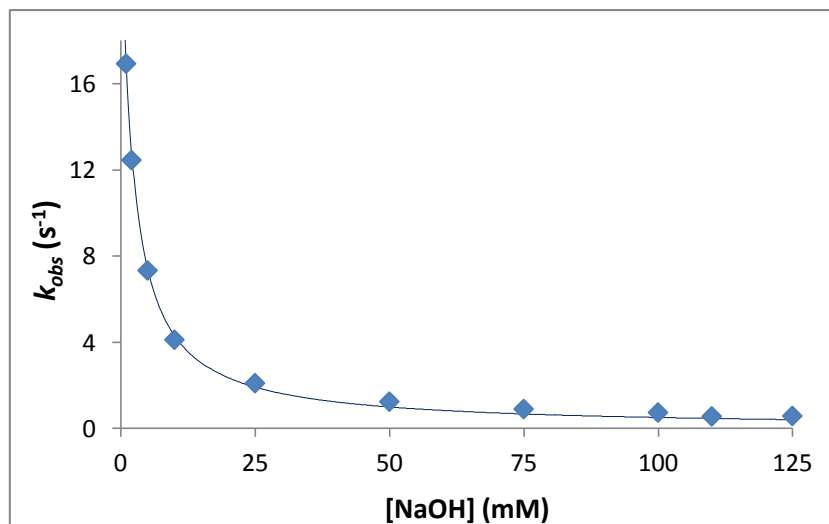
27. ábra A kezdeti abszorbancia függése a NaOH koncentrációjától

$$[\text{izoniazid}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{NaOCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Az illesztés eredményeként a következő paraméterértékeket kaptuk $A_{\text{savas}} = 0$, $A_{\text{bázikus}} = 1,863 \pm 0,019$, $K_b = 2,37 \times 10^{-3} \pm 1,537 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$. Az így meghatározott bázikus disszociációs állandó (K_b) értékéből $\text{pK} = 11,375$ következik, amely, figyelembe véve a kissé eltérő kísérleti körülményeket is, jó egyezésben van az irodalomban található legnagyobb 10.8-as pK értékkel is.⁵⁰

A 26. ábrán bemutatott kinetikai görbék egyexponenciális függvénnyel való illesztésekor igen jó illeszkedést tapasztaltunk. A kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó (k_{obs}) értékeket a NaOH - koncentráció függvényében ábrázoltuk (28. ábra). A 26. ábrán bemutatott jelenségnek (vagyis a nagyobb pH hosszabb reakcióidőt eredményez) megfelelően a pszeudo-elsőrendű sebességi állandók is csökkennek a pH növekedésével, 16 s^{-1} körüli kezdeti értékről 1 s^{-1} alá.



28. ábra A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók függése a NaOH koncentrációjától

$$[\text{izoniazid}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{NaOCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$t = 10\text{-}20 \text{ s}$$

$$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

A 28. ábra pontjai kiválóan illeszthetők a következő egyenlettel:

$$k_{obs} = \frac{k * K_b}{K_b + [\text{OH}^-]}$$

Ebben a képletben a **k** érték a protonált izoniazid és a hidroxidionok között végbemenő folyamatra jellemző sebességi állandó, míg **K_b** az izoniazid deprotonálódási egyensúlyára vonatkozik. A képlet azt feltételezi, hogy a deprotonált izoniazid nem reagál kimutatható mértékben a hipoklorit-ionnal. Az illesztéssel kapott állandók: $k = 24,9 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ és $K_b = 2,1 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$. Az így, tehát kinetikai adatokból számolt K_b (illetve $pK = 11,32$) értéke mind a közvetlen egyensúlyi adatokból (27. ábra) számolt állandóval, mind az irodalmi pK -adattal⁵⁰ elfogadható egyezést mutat.

6. Összefoglalás

Jelen tudományos diákköri dolgozat tárgya az izoniazid és különböző szervesetlen oxidálószerek között végbemenő reakció. Az izoniazid a tuberkulózis megelőzésében és kezelésében használt első számú antibiotikum. Lebontása az élő szervezetben oxidáció valamint hidrolízis által történhet. Kísérleteim során az izoniazidot permanganáttal illetve hipokloritinnel oxidáltam savas valamint bázikus közegben.

Első lépésben a végbemenő reakciók sztöchiometriáját határoztam meg. Az izoniazid oxidációja két reakcióúton játszódhat le. Egyik esetben a hidrazincsoport oxidációjával izonikotinsav, míg a másik esetben izonikotinamid keletkezik. A permanganátos oxidáció esetén az izonikotinsavat eredményező folyamat dominál, míg a hipokloritinos oxidáció során egy bonyolultabb sztöchiometriával kell számolnunk.

A kinetikai mérésekhez szükség volt az optimális hullámhossz meghatározására. A reakcióelegy teljes spektrumát felvéve ez a hullámhossz a permanganátos oxidáció esetén 537 nm-nek, míg a hipokloritinos folyamatnál 320 nm-nek adódott. A további kinetikai méréseket ezeken a meghatározott hullámhosszakon folytattam.

A permanganátos oxidáció tanulmányozásakor az izoniazidot nagy feleslegben alkalmaztam, azonban a várt elsőrendű reakció elméletét két okból is el kellett vetnem. Figyelembe véve az autokatalitikus hatású Mn^{2+} -ionok keletkezését, feltételeztem az autokatalízist. Ezt alátámasztja az autokatalitikus sebességi egyenlet meglepően jó illeszkedése a kinetikai görbére. A kezdeti sebességek lineáris függést mutatnak a Mn^{2+} -ionok koncentrációjával, így nagy valószínűség szerint a folyamat jellemezhető az elsőrendű autokatalízis sebességi egyenletével.

Oxidálószerként hipokloritont alkalmazva a kezdeti sebességek lineáris függést mutatnak az oxidálószer koncentrációjával, míg izoniazid esetében a már tapasztalt nemlineáris összefüggést figyeltük meg. Továbbá bizonyítottuk, hogy a kloridionok a folyamatra nem gyakorolnak hatást, ennek kloridiontartalmú NaOCl esetében lenne jelentősége.

A kezdeti sebességre kapott értékek mindkét reakció esetén csökkennek a kénsav/nátrium-hidroxid koncentrációjának növekedésével, ezt a jelenséget részben értelmezheti az izoniazid sav-bázis egyensúlya.

7. Summary

The topic of the present thesis is the reaction between isoniazid and two different inorganic oxidizing agents. Isoniazid is a first-line antibiotic used in the treatment of tuberculosis, its *in vivo* breakdown can occur via oxidation and hydrolysis. During my experiments, isoniazid was oxidized with permanganate ion and hypochlorite ion in acidic and basic medium.

At first, the stoichiometry of the reactions was determined. Oxidation of isoniazid gives two products: isonicotinic acid and isonicotinamide. Spectrophotometric titration results suggest that the pathway leading to isonicotinic acid dominates during the oxidation with permanganate ion. However, in the case of oxidation with hypochlorite ion, a more complicated, variable stoichiometry was found.

For the 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 in the case of the oxidation with permanganate ion and 320 nm in the case of the reaction with hypochlorite ion. Detailed kinetic measurements were carried out at these wavelengths.

During the oxidation with permanganate ion, a large excess of isoniazid was used. However, the pseudo-first order kinetic assumptions had to be rejected for two reasons. Considering that Mn^{2+} ions often have an autocatalytic effect in the medium used, 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. The initial rates of the reaction show linear dependence on the Mn^{2+} concentration, so there is a first order term with respect to Mn^{2+} -ions in the rate equation describing the reaction, thus it is more likely that the process can be described by a first order autocatalytic rate equation.

Using hypochlorite ion as oxidizing agent, the initial rates show linear dependence on the concentration of the hypochlorite ion and we observed the same non-linear dependence with respect to isoniazid as before. Moreover, we proved that chloride ions do not have any effect on the process.

The initial rate values decrease as the concentration of the sulfuric acid/sodium hydroxide increases in both cases, this phenomenon can be interpreted by the protolytic equilibria of isoniazid.

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 vegyszereket és eszközöket, így lehetővé tette dolgozatom elkészítését.

Köszönök minden anyagi támogatást, amelyet a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 ENVIKUT projekt résztvevőjeként kaptam.

Végül köszönöm a D503 és D524 labor tagjainak a támogató légkört és a segítséget.

9. Irodalomjegyzék

1. Szabados, H. Isoniazid antituberkulotikumot tartalmazó konjugátorok tervezése, szintézise és in vitro biológiai aktivitásuk vizsgálata. (Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2007).
2. Johnsson, K. & Schultz, P. G. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7425–7426 (1994).
3. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. & Cole, S. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**, 591–593 (1992).
4. Lw, H. & Io, F. Relation of pyrogallol-peroxidative activity to isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Tuberc.* **75**, 670–674 (1957).
5. Wolman, Y., Gallop, P. M., Patchornik, A. & Berger, A. Peptide Synthesis via Oxidative Activation of Acid Hydrazides. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1889–1892 (1962).
6. Nelson, S. D., Mitchell, Timbrell, J. A., Snodgrass, W. R. & Corcoran, G. B. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science* **193**, 901–903 (1976).
7. Wiseman, B. *et al.* Isonicotinic Acid Hydrazide Conversion to Isonicotinyl-NAD by Catalase-peroxidases. *J. Biol. Chem.* **285**, 26662–26673 (2010).
8. Singh, R. *et al.* Catalase-peroxidases (KatG) Exhibit NADH Oxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 43098–43106 (2004).
9. Pierattelli, R. *et al.* Enzyme-catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class III Peroxidases. *J. Biol. Chem.* **279**, 39000–39009 (2004).
10. Zhao, X. *et al.* Hydrogen Peroxide-Mediated Isoniazid Activation Catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* Catalase–Peroxidase (KatG) and Its S315T Mutant^{†,‡}. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 4131–4140 (2006).
11. Wengenack, N. L., Hoard, H. M. & Rusnak, F. Isoniazid Oxidation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG: A Role for Superoxide Which Correlates with Isoniazid Susceptibility. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9748–9749 (1999).
12. Magliozzo, R. S. & Marcinkeviciene, J. A. Evidence for Isoniazid Oxidation by Oxyferrous *Mycobacterial* Catalase–Peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11303–11304 (1996).

13. Wang, J.-Y., Burger, R. M. & Drlica, K. Role of Superoxide in Catalase-Peroxidase-Mediated Isoniazid Action against Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 709–711 (1998).
14. Shoeb, H. A., Bowman, B. U., Ottolenghi, A. C. & Merola, A. J. Evidence for the generation of active oxygen by isoniazid treatment of extracts of Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 404–407 (1985).
15. Zabinski, R. F. & Blanchard, J. S. The Requirement for Manganese and Oxygen in the Isoniazid-Dependent Inactivation of Mycobacterium tuberculosis Enoyl Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2331–2332 (1997).
16. Singh, R. *et al.* Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Arch. Biochem. Biophys.* **471**, 207–214 (2008).
17. Deemagarn, T. *et al.* Structural Characterization of the Ser324Thr Variant of the Catalase-peroxidase (KatG) from Burkholderia pseudomallei. *J. Mol. Biol.* **345**, 21–28 (2005).
18. Goodwin, D. C., Grover, T. A. & Aust, S. D. Roles of Efficient Substrates in Enhancement of Peroxidase-Catalyzed Oxidations†. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 139–147 (1997).
19. Pelizzetti, E., Meisel, D., Mulac, W. A. & Neta, P. Electron transfer from ascorbic acid to various phenothiazine radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6954–6959 (1979).
20. Juchau, M. R. & Horita, A. Metabolism of Hydrazine Derivatives of Pharmacologic Interest. *Drug Metab. Rev.* **1**, 71–100 (1972).
21. Goodwin, D. C., Aust, S. D. & Grover, T. A. Evidence for Veratryl Alcohol as a Redox Mediator in Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 5060–5065 (1995).
22. Kovács, L., Bokros, A. & Kupihár, Z. Karbonsav-hidrazidok oxidatív átalaktísáa karbonsavakká. Az N'-szubsztitúció hatása a reakció sztöchiometriájára.
23. Tsuji, J., Nagashima, T., Qui, N. T. & Takayanagi, H. Facile oxidative conversion of hydrazides of carboxylic acids to corresponding acids, esters and amides using copper compounds. *Tetrahedron* **36**, 1311–1315 (1980).
24. McCombie, S. W., Lin, S.-I. & Vice, S. F. New reactions of hydrazides. Part 1: Directed ortho- and lateral metalation of aromatic carbocyclic and heterocyclic systems. *Tetrahedron Lett.* **40**, 8767–8770 (1999).
25. Pratt, S. A., Goble, M. P., Mulvaney, M. J. & Wuts, P. G. M. Dialkylhydrazides for directed orthometalations. *Tetrahedron Lett.* **41**, 3559–3562 (2000).

26. Wuts, P. G. M. & Goble, M. P. Cleavage of N',N'-Dialkylhydrazides with PhI(OH)OTs. *Org. Lett.* **2**, 2139–2140 (2000).
27. Forbes, L. V. *et al.* Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 949–960 (2012).
28. Eum, S.-Y. *et al.* Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary tb. *Chest* **137**, 122–128 (2010).
29. Hofstra, A. H., Li-Muller, S. M. & Uetrecht, J. P. Metabolism of isoniazid by activated leukocytes. Possible role in drug-induced lupus. *Drug Metab. Dispos.* **20**, 205–210 (1992).
30. Goodwin, D. C., Grover, T. A. & Aust, S. D. Redox Mediation in the Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Aminopyrine: Possible Implications for Drug–Drug Interactions. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 476–483 (1996).
31. Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H. & Kettle, A. J. Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome IMPLICATIONS FOR MICROBIAL KILLING. *J. Biol. Chem.* **281**, 39860–39869 (2006).
32. A, K., C, G. & C, W. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. (1997). at <<http://www.biochemj.org/bj/321/bj3210503.htm>>
33. Burner, U., Obinger, C., Paumann, M., Furtmüller, P. G. & Kettle, A. J. Transient and Steady-state Kinetics of the Oxidation of Substituted Benzoic Acid Hydrazides by Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 9494–9502 (1999).
34. Wengenack, N. L. *et al.* Redox Potential Measurements of the Mycobacterium tuberculosis Heme Protein KatG and the Isoniazid-Resistant Enzyme KatG(S315T): Insights into Isoniazid Activation. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 11508–11513 (2000).
35. Amos, R. I. J., Gourlay, B. S., Schiesser, C. H., Smith, J. A. & Yates, B. F. A mechanistic study on the oxidation of hydrazides: application to the tuberculosis drug isoniazid. *Chem. Commun.* 1695–1697 (2008). doi:10.1039/B719570B
36. Prütz, W. A., Kissner, R. & Koppenol, W. H. Oxidation of NADH by Chloramines and Chloramides and Its Activation by Iodide and by Tertiary Amines. *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 297–307 (2001).
37. Rj, S., Jm, Z., Bb, P. & Aj, S. Chlorination or reduced nicotinamide adenine dinucleotides by myeloperoxidase: a novel bactericidal mechanism. *J. Reticuloendothel. Soc.* **27**, 31–38 (1980).

38. Griffin, B. W. & Haddox, R. Chlorination of NADH: Similarities of the HOCl-supported and chloroperoxidase-catalyzed reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 305–309 (1985).
39. Zgliczyński, J. M., Stelmaszyńska, T., Domański, J. & Ostrowski, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **235**, 419–424 (1971).
40. Harrison, J. E. & Schultz, J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **251**, 1371–1374 (1976).
41. Prütz, W. A., Kissner, R., Koppenol, W. H. & Rügger, H. On the Irreversible Destruction of Reduced Nicotinamide Nucleotides by Hypohalous Acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 181–191 (2000).
42. Varale, A. & Hilage, N. Kinetic and mechanistic study of oxidation of isonicotinic acid hydrazide by Thallium(III) in acidic medium. *International Journal of ChemTech Research* **1**, 270–274
43. Tsuji, J., Takayanagi, H. & Toshida, Y. ORGANIC SYNTHESIS BY MEANS OF METAL COMPLEXES. XVI. EFFICIENT CATALYTIC OXIDATION REACTIONS OF *p*-PHENYLENEDIAMINE, DIHYDRAZONES OF α -DIKETONES, AND HYDRAZIDES OF CARBOXYLIC ACIDS USING COPPER SALTS. *Chem. Lett.* **5**, 147–148 (1976).
44. Aylward, J. B. & Norman, R. O. C. Reactions of lead tetra-acetate. Part XVI. The oxidation of monoacylhydrazines. *J. Chem. Soc. C Org.* 2399–2402 (1968). doi:10.1039/J39680002399
45. Szabó, M. A piroszölősav és a kloriton közötti redoxireakció kinetikája. (Debreceni Egyetem, 2013).
46. Gordon, G. & Tewari, P. H. The Kinetics of the Reaction between Vanadium(II) and Chlorate in Aqueous Perchloric Acid. *J. Phys. Chem.* **70**, 200–204 (1966).
47. Tonomura, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J. & Hiromi, K. Test reactions for a stopped-flow apparatus: Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by l-ascorbic acid. *Anal. Biochem.* **84**, 370–383 (1978).
48. Peintler, G., Nagy, A., Horváth, A. K., Körtvélyesi, T. & Nagypál, I. Improved calibration and use of stopped-flow instruments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 2575–2586 (2000).
49. Bogdándi, V. Az izoniazid és a permanganátion közötti reakció. (Debreceni Egyetem, 2013).
50. Becker, C. *et al.* Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Isoniazid. *J. Pharm. Sci.* **96**, 522–531 (2007).