

**Új multi-információs vékonyréteg-kromatográfiás módszer és
berendezés**

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

KIVONAT

A találmány tárgyát multi-információs vékonyréteg-kromatográfiás eljárás képezi, amelyet egy olyan berendezésben hajtunk végre, amelyben a mozgó fázis lineáris áramlását is kialakíthatjuk egy olyan kromatográfiás réteglapon, mely úgy van részlegesen lefedve egy, a mozgó fázis számára átjárhatatlan fedőlappal, hogy a réteglap egyik vagy mindkét vége már nincs lefedve, és így az odaérkező mozgó fázis elpárolog, és így a réteglap ezen részén a mozgó fázissal oda eljutó komponensek koncentrálnak. Az eljárás alapvető jellemzője, hogy a fedőlap alatt vonuló mozgó fázis komponenseit egy vagy több álló helyzetű detektorral figyeljük, továbbá az, hogy az indítás ellentétes oldalán koncentrálnak komponenseket újabb kromatografálásnak vethetjük alá anélkül, hogy azokat eltávolítanánk a réteglapról. A fenti "on-line" mérést megismételhetjük tetszés szerinti számban, és ezután ugyan azon a réteglapon végezhetünk hagyományos "off-line" kromatografálást is.

A találmány tárgyát képezi a fenti eljárásban alkalmazható berendezés is.

jellemező ábra: 5. ábra

L. L. L.
1987. 02. 06.

Új multi-információs vékonyréteg-kromatográfiás módszer és berendezés

A találmány tárgyát új vékonyréteg-kromatográfiás módszer képezi, mellyel jelentősen növelhető a kromatografálás hatékonysága, ami elsősorban abban nyilvánul meg, hogy ugyanazt a mintát többszöri analízisnek lehet alávetni, és így lényegesen több információt lehet begyűjteni a vizsgált anyagról [ennek megfelelően a módszert esetenként MI-PC rövidítéssel is hivatkozunk, ami a módszer angol elnevezésére utal (Multi-Information Planar Chromatography)].

Az alábbiakban összefoglaljuk az ismert folyadékkromatográfiás módszereket.

A folyadékkromatográfiás technikákat két nagy csoportra lehet osztani: az oszlop- és a sík-, vagy más szóval planárokromatográfiás rendszerekre. Mindkét csoporton belül megkülönböztetünk kapilláraktivitással és kényszerárammal működő módszereket. Analitikai mérésekre, tehát az adott minta komponenseinek minőségi és mennyiségi elemzésére az oszlop-kromatográfiás módszerek közül csak a HPLC [High Performance (Pressure) Liquid Chromatography = nagynyomású folyadékkromatográfia] alkalmazható, míg a planárokromatográfiás módszerek mindegyike alkalmazható analitikai elemzésekre. A legelterjedtebb planárokromatográfiás módszer a TLC (Thin Layer Chromatography = vékonyréteg-kromatográfia) és a HPTLC (High Performance TLC = nagy teljesítményű TLC), míg a legelterjedtebben alkalmazott analitikai folyadékkromatográfiás módszer a HPLC

Ez utóbbi módszer számos előnnyel bír, melyek közül kiemeljük, hogy a kényszeráramoltatott mozgó fázis alkalmazása miatt az elválasztás és a detektálás folyamatosan történik, és a minta adagolása is a már mozgó fázisba történik, így a technika – a szakterületen használt kifejezést használva - “fully on-line”. A módszer könnyen automatizálható, ennek megfelelően a HPLC műszerek manapság teljesen automatizáltak és komoly szoftver támogatottsággal rendelkeznek.

A HPLC módszer hátrányaiként a következőket említhetjük:

- a) Egyszerre csak egy minta elemezhető, amely az egész műszert lefoglalja.
- b) Gyakorlatilag csak UV elnyeléssel rendelkező komponensek analizálhatóak (a poszt-kromatográfiás derivatizálás technikailag rendkívül nehézkes).
- c) Az elválasztásokhoz csak az UV detektálást nem zavaró (megfelelő “cut off” UV elnyelési értékű) oldószerek alkalmazhatóak.
- d) Az elemzés során a kis mennyiségű (kb. 1 μ l) minta komponensei nagy mennyiségű oldószerezrel (kb. 30 ml) eluálódnak, így az output oldalon összegyűjtött komponensekből a kiindulási minta gyakorlatban rutinszerűen alkalmazható módszerrel nem nyerhető vissza.

A jelen találmány szerinti megoldás a klasszikus planárokromatográfiás (TLC és HPTLC) módszerek továbbfejlesztett változatának tekinthető, így az alábbiakban áttekintjük azok előnyeit és hátrányait.

A “klasszikus” TLC/HPTLC előnyei

- a) Az elemzések 90-95 %-ában szilika állófázist alkalmaznak, mely jelentős kölcsönhatást biztosít az elválasztandó kom-

ponensek és az álló fázis között, így nehezen elválasztható komponensek is jól kromatografálhatóak.

b) A réteglap egyszer használatos, így nem kell komoly minta-előkészítési művelet és nem jelentkezik az ún. "remember" effektus, azaz az álló fázist nem befolyásolja egy előző elválasztásból származó esetleges anyagmaradék.

c) A mozgó fázis optimalizálásához kb. 80 oldószer alkalmazható, párhuzamos kísérletekben, tehát a mozgófázis optimalizálása gyors művelet.

d) Egy-egy réteglapon 15–30 minta elemezhető párhuzamosan,

e) Többféle kifejlesztési mód (lineáris, cirkuláris, anticirkuláris, két dimenziós, többszöri kifejlesztésű) alkalmazható az elemzési problémától függően.

f) Az "off-line" detektálásból (azaz: a kromatografálás befejezése után, attól térben és időben elválasztva történik a detektálás) következik, hogy gyakorlatilag bármely oldószer alkalmazható a mozgó fázis alkotórészeként, mivel a kifejlesztés után, a szárítás során levegő áramoltatásával vagy melegítéssel eltávolításra kerülnek az oldószerek, így azoknak az UV tartományban zavaró tulajdonsága ("cut off" UV elnyelési érték) nem tud érvényesülni.

g) Az "off-line" detektálásból következik, hogy mintegy 500 reagens alkalmazható poszt-kromatográfiás ágensként, így az UV detektálás mellett a specifikus detekció is megvalósítható,

h) A már denzitométerrel *in situ* detektált réteglap akár évekre is archiválható,

i) Az egy mintára eső elemzési költség igen alacsony (a HPLC költségének kb. egyharmada).

A "klasszikus" TLC/HPTLC hátrányai

a) A felbontó képesség kicsi, mivel csak kapilláris aktivitással és nem kényszerárammal migrál a mozgó fázis, így annak áramlási sebessége folyamatosan csökken, nem az optimumon folyik az elválasztás.

b) Az állófázis átlagos szemcsemérete nagyobb (5-6 μm a HPTLC lapoknál és 11 μm a TLC lapoknál) és nem szferikus, mert az a jelenlegi műszaki megoldásokkal nem ragasztható a réteglap hordozójához.

c) A módszer "fully off-line", tehát az egyes fázisok (minta felvitel, elválasztás, detektálás) térben és időben egymástól elkülönülnek, így az egyes műveletek csak külön-külön automatizálhatóak.

d) A TLC/HPTLC elválasztás mindig száraz réteglappal kezdődik. Ebből következik, hogy a rétegen a több komponensű mozgó fázis maga is kromatografálódik. A száraz (telítetlen) réteglapon kezdett elválasztásnál az egyes oldószerek frontjai lépcsős gradienst alkotnak, a frontok zavarhatják a denzitometriás mérést.

e) A TLC/HPTLC elválasztások megfelelő reprodukálhatóságához komoly szakismeret és tapasztalat kell. A módszer kutatói presztízse kicsi, a kutatók nem szívesen dolgoznak a nem teljesen automatizált módszerrel.

Lényegében a TLC és HPTLC előnyei és hátrányai megegyeznek. A két módszer közti lényeges különbség az álló fázis szemcseméretéből adódik. A HPTLC álló fázisának kisebb szemcseméretéből (nagyobb fajlagos felületéből) következően jobb az elválasztóképessége, de mivel kisebb a kapilláris aktivitás, így csak kisebb távolságra fejleszthető ki.

Régebb óta fennáll az igény arra, hogy kiaknázzák a vékonyréteg-kromatográfiás módszerek esetében is a folyamatosan mozgó oldószerfázis alkalmazásából származó előnyöket. Például a Brenner–Niederwieser (BN) kamra [A. Niederwieser and C.C. Honegger, *in* J.C. Giddings and R. A. Keller (Editors), *Advances in Chromatography. Vol. 2*, Dekker, New York, 1966, pp. 123-131] alkalmazásánál a horizontálisan elrendezett és a mintákat már tartalmazó réteglap egy üveglappal van lefedve, úgy hogy a réteg és az üveglap közti távolság 3 mm-nél kisebb legyen. A mozgó fázist egy szűrőpapír segítségével juttatják a rétegre, ezzel megkezdődik a kromatográfiás elválasztás. A rétegen a mozgó fázis a kapilláris aktivitás hatására kezdetben gyorsan, majd egyre lassabban migrál. Ahogy az oldószerfront eléri a fedőlap végét, egy fűtőblokk hatására a mozgó fázis elkezd párologni, és ettől kezdve a mozgó fázis áramlási sebessége állandó lesz. A kamra és a technika az alsó R_F tartományban elhelyezkedő komponensekre nézve kiváló elválasztást biztosít.

Ezen az elven alapszik egy másik hasonló megoldás, az SB–CD (Short Bed–Continuous Development= rövid ágyas folyamatos kifejlesztés) kamra [T. Omori, *in*: Planar Chromatography, A Retrospective View for the Third Millennium (Sz. Nyiredy, Ed.), Springer, Budapest, 2001, pp. 120-136] működése is, ahol egyrészt a gőztér nagyobb, másrészt a mozgó fázis elpárologtatása szoba hőmérsékleten történik. A kifejlesztési távolság és ezzel az áramlási sebesség szabadon változtatható. Minél kisebb a kifejlesztési távolság, annál nagyobb áramlási sebességi szinten állandósul a mozgó fázis állandó sebessége. Az 1. ábra az SB–CD kamra két végállását szemlélteti, a maximális, illetve a minimális elérhető áramlási sebességgel.

Mindkét kamra típussal egy idő eltelte után (miután az oldószerfront elérte a fedőlap végét) állandó áramlási sebesség érhető el, így az alacsony R_F értékkel migráló komponensek hatékonyan elválaszthatók.

További elválasztási nehézségek küzdhetők le az ún. szekvenciális technikával [P. Buncak, *GLT Suppl. Chromatogr.*, 3 (1982)], ahol a mozgó fázis térben és időben szabadon variálható módon juttatható a rétegekromatográfiás lemez bármely részére. Alkalmazásával a minta azon komponensei, amelyek egy adott mozgó fázissal nem váltak el egy másik, adekvát mozgó fázis alkalmazásával elválhatnak, miközben a már elvált komponensek nem találkoznak az új mozgó fázissal. Az elválasztást nemcsak az új adekvát mozgó fázis segíti, hanem a kezdeti nagyobb migrációs sebesség is.

A technika nemcsak a klasszikus TLC/HPTLC kifejlesztéseknél alkalmazható, hanem a preparatív RPC (Rotation Planar Chromatography) technikánál is [Sz. Nyiredy, C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, in R.E. Kaiser (Editor), *Planar Chromatography Vol.1*, Huethig, Heidelberg-Basel-New York, 1986, p.119], ahol a mozgó fázis migrálását a kapilláraktivitáson túlmenően a centrifugális erő is segíti, mivel a módszerben köralakú réteglapot használnak, melyet a lap középpontja körül megpörgetnek, változtatható szögsebességgel.

Az utóbbi évtizedekben került kifejlesztésre az OPLC (Overpressured Layer Chromatography = túlnyomásos rétegekromatográfia) [E. Tyihák, E. Mincsovics and H. Kalász, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 75]. Alapvető érdeme, hogy a módszerrel sikerült hatékony kényszeráramoltatást megvalósítani a vékonyréteg-kromatográfia területén. A megoldásban speciáli-

san három oldaláról (off-line technika) vagy mind a négy oldaláról ("on-line" technika) speciális polimerrel impregnált (szélezett) réteglapra közvetlenül egy nyomásálló rugalmas zárólap kerül, és így a gőztér kizárásával, kb. 50 bar nyomás alatt, "síkelrendezésű oszlop"-pá alakítható át a rendszer, ami kényszeráram (pumpa) alkalmazásával mind "off-line", mind "on-line" módusban alkalmazható, hidat képezve az oszlop és planáris kromatográfiás technikák között.

Az OPLC elválasztás detektálása három féle módon oldható meg. Egyrészt az elválasztást követően (amikor a kifejlesztő rendszer frontja eléri a réteglap felső végét) "off-line" detektálás alkalmazható. Ebben az esetben a szárított réteglapot az érzékelő rendszer, a denzitométer előtt elmozdítják és a reflektált, illetve áteresztett fényben az elválasztást értékelik. Másrészt, túlfuttatást alkalmazva, a réteglap végét elhagyó efluens összetevőire végzik az értékelést az áramló anyagban átfolyó küvettás detektor, vagyis "on-line" detektálás alkalmazásával. Abban az esetben ha komplex minták komponenseinek elválasztása a feladat és a komponensek retenciója közti különbség igen nagy, akkor harmadik megoldásként lehetőség van a kétféle detektálás kombinálására. Ilyenkor a magas R_f tartományban elhelyezkedő komponenseket elvezetik a rétegről, vagyis "on-line" detektálják átfolyó küvettás detektor alkalmazásával, míg az alacsony R_f tartományban elhelyezkedő komponenseket az elválasztás befejezte és a réteg megszáritása után a denzitométer előtt elmozdítva, "off-line" detektálják (lásd HU 196509 számú szabadalmi leírásban ismertetett módszert).

A találmány szerinti megoldás tárgyalásához célszerű a TLC/HPTLC módszereknél általánosan alkalmazott kiértékelési technikát, a denzitometriás mérést röviden ismertetni.

A szokásos off-line detektálásnál a már kifejlesztett, azaz a kromatografált réteget helyezzük a denzitométer x-y koordináták irányába mozgatható asztalára, ahol sötét térben egy-egy minta elválasztott komponenseit adott hullámhosszá (UV vagy látható) fénnel megvilágítjuk és a visszaverődött fény mennyiségét alakítjuk át Gauss-görbe formájú kromatográfiás csúcsokká egy elnyelést vagy a visszaverődést mérő optikai berendezés segítségével. A szkennelés után kapjuk meg a denzitogramot, ahol az egyes csúcsoknak a minta felvitel helyétől mért távolsága a komponens minőségére, a csúcsok alatti területek nagysága pedig a komponens mennyiségére jellemző. A technika hátránya, hogy a réteglap sík felülete (amely sztereomikroszkóp alatt nézve erősen tagolt, éles kiemelkedések és bemélyedések jellemzik) erősen szórja a fénynyalábot, így ezzel sokat veszít a mérés az érzékenységéből. Ennek tulajdonítható, hogy ha egy vonalkódot (idealizált kromatogram) szkennelünk, csak akkor kapunk alapvonal elválasztást, ha két vonal között legalább 1 mm távolság van. Amennyiben egymás mellé felvitt, de ki nem fejlesztett mintákat szkennelünk, úgy legalább 1,5 mm távolság esetén kapunk alapvonal elválasztást. Így gyakran előfordul, hogy a denzitométer hibájából a (vizuálisan) teljesen elválasztott komponensek nem adnak a denzitogramon alapvonal-elválasztást.

A "klasszikus" TLC/HPTLC módszereknél problémát okoz az ún. "háttér effektus", mely akkor jelentkezik, ha a mozgó fázis valamelyik komponensének frontja egybeesik egy vizsgált anyag foltjával. A probléma többszöröződése esetén beszélünk az ún.

multi-front hatásról, ami felléphet több komponensű kifejlesztő rendszerek esetén. Megjegyezzük, hogy ez a hatás a TLC/HPTLC elválasztásoknál denzitometriásan korrigálható, illetve az OPLC módszernél elkerülhető, ha a mozgó fázissal ekvibrált réteglapot, vagyis "on-line" technikát alkalmazunk.

Egy elemzés során az analitikus feladata, hogy az adott mintáról minél több, lehetőleg teljes információt nyerjen. Erre a célra szolgálnak a multi-dimenzionális kromatográfiás rendszerek. Például a multi-dimenzionális HPLC módszernél az első elválasztás után az egyes frakciókat egy második oszlopon tovább frakcionálják, az így kapott frakciók közül a tovább vizsgálandót egy harmadik oszlopon tovább elemzik stb. Nyilvánvaló, hogy a módszer gyakorlati alkalmazása igen bonyolult és költséges.

A fenti módszer kétdimenziós változata könnyen megvalósítható a "klasszikus" TLC /HPTLC módszerrel, amennyiben az első kifejlesztés után a kapott foltokat egy második irányban – merőlegesen az első irányra – ismételten kifejlesztjük (előnyösen más mechanizmussal, vagy álló- és/vagy mozgó fázis alkalmazásával). Ezzel a technikával az elemzendő mintáról kapott információ növelhető, de a minta újra már nem elemezhető.

A találmány kidolgozása során célul tűztük ki olyan vékonyréteg-kromatográfiás módszer kidolgozását, ahol az elemzendő mintáról a lehető legtöbb információ szerezhető be. Ennek érdekében célul tűztük ki egy olyan rendszer kidolgozását, melyben

a) lehetőség van arra, hogy folyamatosan áramló mozgó fázist alkalmazzunk (így a mintát injektálhassuk egy olyan ekvibrált réteglapra, amely már egyensúlyba jutott a mozgó fázissal, azaz a mintaadagolás "on-line" történhessék),

b) lehetőség van arra, hogy a mozgó fázisban migráló minta komponenseit folyamatosan detektálhassuk (szintén "on-line" módon),

c) az elválasztáson és az "on-line" detektáláson átjutott anyagot olyan állapotban gyűjtsük össze, ami lehetővé teszi, hogy azt további elemzéseknek (elválasztásoknak és detektálásoknak) vessük alá (akár ismételten "on-line" módon, akár "off-line" módon) az adott réteglapról ki nem lépve, lényegében tetszés szerinti számban.

A találmány kidolgozását az az alapvető felismerés tette lehetővé, hogy amennyiben egy szokásos TLC/HPTLC lapot egy olyan fedőlappal, előnyösen kvarcüvegből készült fedőlappal fedünk le, amely egy detektor, előnyösen egy denzitométer adatgyűjtő egysége számára átlátszó (azaz nem okoz számottevő információvesztést) !!! vagy a fedőlap ugyan nem átlátszó, de azon akkora nyílás van, amibe illeszkedik a denzitométer adatgyűjtő egysége, és a fedőlap alatt lehetővé tesszük, hogy a mozgó fázis folyamatosan áramolhasson, akkor egy újfajta "on-line" vékonyréteg-kromatográfiás adatelemzési megoldásra nyílik lehetőség, melynek segítségével egy adott mintáról lényegesen több információt gyűjthetünk be, mint bármelyik ismert megoldással.

A mozgó fázis folyamatos áramlását a következő módon sikerült biztosítani:

- a) a fedőlapot olyan közel helyezzük el a TLC/HPTLC lap fölött, hogy alatta a mozgó fázis lényegében ne tudjon párologni,
- b) a TLC/HPTLC lap belépési (input) oldalán folyamatosan biztosítjuk a mozgó fázist, előnyösen úgy, hogy a TLC/HPTLC

lap szilárd fázisa egy szűrőlap segítségével összeköttetésben van egy tartállyal, melyben a mozgó fázis található,

c) a TLC/HPTLC lap kilépési (output) oldalán folyamatosan biztosítjuk a mozgó fázis elpárolgását, előnyösen úgy, hogy a fedőlap nem fedi le a teljes TLC/HPTLC lapot, még előnyösebb esetben külön nitrogén gáz áramoltatásával vagy vákuum alkalmazásával biztosítjuk az egyenletes és gyors párolgást (hőre nem érzékeny anyagok esetében melegítést is alkalmazhatunk).

A mozgó fázis áramlási sebességének linearizálása és az optimum közelítésének lehetősége azon a jelenségen alapszik, hogy a réteget fedő fedőlap alól kilépő kifejlesztőszer (mozgó fázis) szobahőmérsékleten történő elpárologtatásával, azaz a kapilláraktivitás segítségével aránylag alacsony, de állandó áramlási sebesség érhető el. Ezzel a detektálást zavaró multi-front hatás is kiküszöbölhető, miután a rétegen a mozgó fázis ekvilibrált állapotba kerül, ha már az összes oldószeralkotó eléri a réteglemez output oldalát.

Az output oldalon a párolgás következtében vékony sávban, szilárd formában összegyűjtött mintát újabb vizsgálatoknak vetjük alá, akár

a) egy vagy több (elvileg tetszőleges számú) újabb, állandóan áramló mozgó fázissal végzett elválasztásnak és "on-line" detektálásnak (itt a minta felvitele nem lesz "on-line", mivel az álló fázison található mintát kezdi kromatografálni a mozgó fázis), vagy

b) egy olyan szokásos "off-line" kromatografálásnak, ahol a mozgó fázis nem áramlik folyamatosan, majd a kapott szokásos kromatogramot szokásos "off-line" technikával kielemezzük, és ezt követően

c) a kapott szokásos kromatogramot egy új irányból (célszerűen merőlegesen az eredeti irányra) újabb szokásos "off-line" jellegű kromatografálásnak vetjük alá.

Megjegyezzük, hogy a szokásos "off-line" elemzések alatt is gyűjthetünk adatokat a minta alkotóiról a detektor segítségével.

További leküzdendő problémát jelentett az analizálandó minta "on-line" (mozgó fázisba történő) adagolása, mivel ez a "klasszikus" TLC/HPTLC módszereknél eddig nem merült fel igényként. A számos kínálgató lehetőség közül az injektációs technika bizonyult a legjobbnak a gyakorlatban (Hamilton-fecskendő vagy annak automatizált változata).

A találmány elsődleges tárgya tehát multi-információs vékonyréteg-kromatográfiás eljárás, amelyet egy olyan berendezésben hajtunk végre, amelyben a mozgó fázis lineáris áramlását is kialakíthatjuk egy olyan kromatográfiás réteglapon, mely úgy van részlegesen lefedve egy, a mozgó fázis számára átjárhatatlan fedőlappal, hogy a réteglap egyik vagy mindkét vége már nincs lefedve, és így az odaérkező mozgó fázis elpárolog, és így a réteglap ezen részén a mozgó fázissal oda eljutó komponensek koncentrálnak, azzal jellemezve, hogy

a) a réteglap egyik végén visszük fel a mintát, azt kromatografáljuk a mozgó fázis segítségével, miközben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral "on-line" módon jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a kromatografálást addig folytatjuk, míg a minta valamennyi komponense összegyűlik a réteglap másik végén (továbbiakban: első "on-line" detektációs kromatografálás),

majd kívánt esetben, amennyiben további információt kívánunk szerezni a mintáról,

b₁) az a) lépésben koncentrálódt mintát ismert módon újra kromatografáljuk az előző kromatografálással ellentétes irányba, majd kívánt esetben arra merőleges irányban is, a közvetlenül megelőző lépésben alkalmazottal megegyező vagy eltérő összetételű mozgó fázissal, miközben kívánt esetben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a réteglapot "off-line" módszerrel kiértékeljük (továbbiakban: egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálás), vagy

b₂) az a) lépésben összegyűlt mintát újra kromatografáljuk az előző kromatografálással ellentétes irányba, az előzővel megegyező vagy egy eltérő összetételű mozgó fázissal, miközben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral "on-line" módon jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a kromatografálást addig folytatjuk, míg a minta valamennyi komponense összegyűlik a réteglap minta indításával átellenes végén (továbbiakban: további "on-line" detektálásos kromatografálás),

majd kívánt esetben, amennyiben további információt kívánunk szerezni a mintáról,

c₁) a b₂) lépésben összegyűlt mintával végrehajtjuk a b₁) pont szerinti egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálást, vagy

c₂) a b₂) lépésben összegyűlt mintával tetszés szerinti számban megismételjük a b₂) pont szerinti további "on-line" detektálásos kromatografálást, majd kívánt esetben végrehajtjuk a b₁) pont szerinti egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálást.

Az alkalmazott kifejezéseket az alábbiakban értelmezzük.

Kromatográfiás réteglapon (röviden: réteglapon) egy olyan tárgyat értünk, mely egy megfelelő hordozón (például üveg, alufólia, oldószerrezisztens műanyag) egy arra egyenletesen felvitt kromatográfiás szorbens réteget (például szilikagél vagy annak amino-, C_{2-18} alkil-, ciano- stb. származéka) tartalmaz, melynek vastagsága általában 10-25 μm . A szorbens réteg átlagos szemcsemérete általában 5-11 μm , de speciális esetekben alkalmazhatunk 5 μm -nél kisebb átlagos szemcseméretű, előnyösen szférikus szemcséket tartalmazó réteglapot.

A mozgó fázis alatt a kromatografálás alatt alkalmazott oldószert vagy egy vagy több oldószer keverékét értjük, amellyel a kromatografálást végezzük. Erre a célra számos oldószer és oldószerelegy alkalmas, melyek közül példaként említjük a következőket: hexán, dietil-éter, metanol, etanol, tetrahidrofurán, etilacetát, aceton, metil-etil-keton, toluol, kloroform, víz (továbbá ecetsav, hangyasav, ammónium-hidroxid stb. vizes oldata).

A fedőlappal szemben alapvető elvárás, hogy az ne legyen átjárható az oldószer számára, így annak elpárolgását megakadályozza a réteglap lefedett részén. Azonban vagy a) lényegében teljesen "átlátszónak" kell lennie a detektor számára, azaz nem árnyékolhatja le zavaró mértékben a detektor által vizsgált jeleket, vagy b) a fedőlap ugyan nem átlátszó, de azon olyan nyílás van kiképezve, amibe illeszkedik a denzitométer adategyűjtő egysége. Előnyösen UV-áteresztő kvarcüveget alkalmazunk, de színes anyagok esetében használhatunk normál üveget vagy áttetsző műanyagot is, továbbá izotópos követés esetén fény számára át nem járható anyagokat is (fém, műanyag) alkalmazhatunk. Radioaktív anyagokból származó jelek esetén célszerű a fenti b) lehetőséget választani, azaz ez esetben a de-

tektor a fedőlap nyílásában helyezkedik el, és a sugárzás nem jut ki a berendezésből.

A találmány alapvető eleme az, hogy a réteglap fölött egy vagy több detektor helyezkedik el, amely a mérés során nem mozog, azonban a mozgó fázis elhalad alatta, ezzel mozgatva alatta a minta alkotóit. A detektornak képesnek kell lennie egy vagy több olyan jel érzékelésére, amellyel követhető a minta alkotóinak mozgása, és abból előnyös esetben mennyiségi és minőségi adatok olvashatók ki.

A detektor célszerűen UV-detektor, de lehet egyéb hullámhosszé elektromágneses sugárzásra vagy egyéb sugárzásra érzékeny detektor is.

A minta injektálását célszerűen "on-line" módon végezzük, azaz a már áramló mozgó fázisba adagoljuk a mintát. Ennek egy előnyös megvalósítása során gázkromatográfiás mikrofecskendőt alkalmazunk, mellyel a kis térfogatú minta pillanatszerűen juttatható egy szeptumon át a rendszerbe, oly módon, hogy a nedves réteglaptól a fecskendő tűjének vége optimális távolságra legyen. Még előnyösebb esetben állófázis ekvilibrálást követően injektáljuk a mintát.

Egyes esetekben célszerű lehet az, hogy először a mintát visszük a réteglapra, majd azt követően indítjuk el a mozgó fázis áramlását.

Előnyös esetben a mozgó fázis sebességvektorának irányával megegyező irányban egymás után több detektort alkalmazunk, és a nyert adatokból a szokásos mennyiségi és minőségi meghatározásokon túl a kromatografálás időbeli lefutását is analizáljuk. Még előnyösebb esetben egy vonalban kettő, három vagy négy detektort helyezünk el így.

Másik előnyös megoldás szerint a mozgó fázis sebességvektorára merőleges irányban több detektort alkalmazunk, melyek közül legalább egyet úgy helyezünk el, hogy az a minta alkotóitól mentes mozgó fázis jeleit érzékelje, majd annak adataiból meghatározzuk és szükség esetén kompenzáljuk a háttéreflektust. Még előnyösebb esetben két ilyen detektort alkalmazunk, melyek közül egyik az oldószerben vándorló mintaalkotók jeleit érzékeli, a másik pedig az anyagmentes mozgó fázis jeleit méri.

Különösen előnyös az a megoldás, ahol a fenti két előnyös megoldást egyidejűleg alkalmazzuk, célszerűen párban elhelyezett 4, 6 vagy 8 detektorral.

A detektor lehet egy szokásos sötétben mérő denzitométer része [ilyen berendezésekre példa: CAMAG (Muttensz, CH), DESAGA (Wiesloch, DE), vagy SHIMADZU (Tokió, JP)], azonban a gyakorlatban különösen előnyösnek bizonyult olyan detektor alkalmazása, mely képes normál megvilágításban is dolgozni és a kiértékelő berendezéssel üvegszáloptikás összeköttetésben van [J&M (Aalen, DE)].

A gyakorlatban célszerűnek bizonyult olyan berendezés alkalmazása, amely csak az egyik végén rendelkezik olyan lefedetlen résszel, ahol a mozgó fázis el tud párologni, így a különböző futtatások között magát a réteglapot forgatjuk a kívánt irányba (lásd az alább részletezett 2. ábrát). Azonban például sorozatmérések esetén célszerű lehet olyan berendezés alkalmazása, amelynek mindkét végén indítható a mozgó fázis (lásd az alább részletezett 3. ábrát), így a réteglap mozgatása nélkül elvégezhető a mérések legtöbbje (a 90 °-os elforgatáshoz ki kell

emelni ez esetben is a réteglapot, hacsak nincs megoldva a réteglap tetszés szerinti forgatása a berendezésen belül).

A fenti megoldások esetében célszerű (és technikailag egyszerűen megoldható), hogy az egy vagy több detektor pozíciója a réteglaphoz képest változtatható legyen.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, a fenti eljárásban alkalmazható berendezés is (lásd 2. ábra), amelynek felépítése a következő: egy 1 tartóelemen rögzített 2 réteglap, ahol 3 távtartók tartják a 2 réteglap felett a réteglapnál kisebb méretű 4 fedőlapot, amely fölött egy vagy több 5 detektor van elhelyezve, ahol a berendezés szélén 6 mozgó fázis tárolására szolgáló 7 tároló helyezkedik el, amely egy megszakíthatóan kapcsolódó 8 közvetítőszervvel kapcsolódik a 2 réteglaphoz, és adott esetben a 7 tárolóval átellenes szélén párolgást elősegítő 9 egységgel rendelkezik, és/vagy a 7 tároló felöli szélén 10 adagolóegység van elrendezve.

A berendezés tartalmazhat két 6 mozgó fázis tárolására szolgáló 7 tárolót is (lásd 3. ábra).

A berendezés részeit az alábbiakban ismertetjük közelebbről.

Az 1 tartóelem megfelelő szilárdságú, alaktartó, a szobajövő mozgó fázist oldószereivel szemben ellenálló anyagból készül. A gyakorlatban előnyösen műanyagból, még előnyösebben teflonból készül az 1 tartóelem. Konkrét kialakítása megfelelhet bármelyik szokásos TLC/HPTLC berendezés megfelelő elemének.

A 2 réteglapot a fentiekben már tárgyaltuk.

A 3 távtartók szintén megfelelő szilárdságú, alaktartó, a szobajövő mozgó fázist oldószereivel szemben ellenálló anyagból készülnek. Előnyösek a műanyag (teflon) és üveg távtartók.

Még előnyösebb esetben a távtartók csíkszerűen helyezkednek el a berendezés két oldalán, párhuzamosan a mozgó fázis sebességvektorával.

A 4 fedőlapot, a fölötte elhelyezkedő egy vagy több 5 dektort és a 6 mozgó fázist a fentiekben már tárgyaltuk.

A 6 mozgó fázis tárolására szolgáló, előnyösen egy vagy kettő 7 tároló szintén megfelelő szilárdságú, alaktartó, a szobajövő mozgó fázist oldószerével szemben ellenálló anyagból készül. Előnyösen ugyanolyan anyagból készül, mint az 1 tartóelem.

A megszakíthatóan kapcsolódó 8 közvetítőszerv biztosítja a mozgó fázisnak a 3 réteglapra való feljutását. Lehet egy távirányítású adagolószerv is, de működhet a kapilláraktivitás elvén is. Ez esetben képesnek kell lennie a mozgó fázis felszívására és továbbítására. Előnyösen szűrőpapírt alkalmazunk erre a célra, és a megszakíthatóságot a szűrőpapírnak a 3 réteglaphoz való odaszorításával és eltávolításával biztosítjuk.

A párolgást elősegítő 9 egység alkalmazása csak opcionális, mivel számos mozgó fázisként alkalmazható oldószer megfelelő mértékben párolog szobahőmérsékleten (pl.: hexán). Nehezebben párolgó mozgó fázis esetén alkalmazhatunk önmagában ismert párolgást elősegítő 9 egységet, ami alapulhat például melegítésen (pl. fűtőszál), fűvátáson (pl. száraz nitrogénáram elvezetése a 3 réteglapnak a 4 fedőlap alól kinyúló része felett), illetve a szívatáson (vákuum kialakítása a 3 réteglapnak a 4 fedőlap alól kinyúló része felett, és egyben biztosítani a levegő beáramlását).

A 10 adagoló egység alkalmazása szintén csak opcionális, mivel egyszerűen kézzel is felvihetjük a mintát a 3 réteglapra.

Azonban célszerű egy olyan egység alkalmazása, ami ezt a műveletet megkönnyíti. Alkalmazhatunk bármely szakterületen ismert adagolási módszert, például a Hamilton-fecskendő adagolás automatizált változatát. Előnyösnek bizonyult a gyakorlatban a 6. ábrán vázolt egység, ahol egy 12 szeptum átszúrásával egy 11 injektáló nyíláson keresztül előnyösen Hamilton-fecskendő segítségével injektáljuk be a mintát. Az itt ábrázolt adagoló egység tartalmaz továbbá egy 13 adagoló nyílást is, melyen keresztül a 6 mozgó fázist juttatjuk a 7. tárolóba.

A találmány szerinti megoldás előnyeit az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A folyamatos kifejlesztési technikával az alsó Rf tartományban lévő komponensek jobban elválaszthatók.
2. A folyamatos kifejlesztési technikával az áramlási sebesség linearizálható attól az időponttól kezdve, hogy a mozgó fázis a fedőlap output szélét elérte. Ezzel az elválasztás hatékonysága nő.
3. A vékonyréteg-kromatográfiában elsőként került alkalmazásra az "on-line" injektálás, mellyel az elválasztás hatékonysága nő (az álló fázis és a minta közti nem kívánt kötődés csökkenthető).
4. Az "off-line" mintaadagolási technikával jobb mintafelvétel érhető el, mint a jelenleg forgalomban lévő automatikus mintafelviteli berendezésekkel, ezzel az elválasztás hatékonysága nő.
5. Az "on-line" detektálásnál a réteg felületének egyenetlensége nem befolyásolja a detektálást, mivel a detektálás alatt a háttér nem változik.
6. A megoldás során nem várt további előnyként jelentkezett, hogy az áramló mozgó fázis felett végzett "on-line"

denzitométeres mérések lényegesen pontosabbak és érzékenyebbek, mint a hagyományos, megszáritott lap felett végzett "off-line" mérések.

7. Referencia detektor alkalmazásával a több komponensű mozgó fázisok frontjainak az elemzést zavaró hatása kiküszöbölhető.

8. Az "on-line" és "off-line" mintaadagolás és detektálás szabadon kombinálható.

9. Megoldható lett a minta elválasztásának a kromatografálás alatti folyamatos nyomon követése.

10 Ugyanazon kis mennyiségű mintából (kb. 1 μ l) elvileg számtalan kromatográfiás információ nyerhető.

11. Ugyanazon kis mennyiségű mintából (kb. 1 μ l) elvileg számtalan spektroszkópiás információ nyerhető (egy adott anyagnak minden oldószerben más a spektruma).

12. Az ekvibrált mozgó fázison "on-line" injektálással és "on-line" detektálással elemzett minta elválasztási eredményeiből rendkívül jó közelítéssel valószínűsíthető a HPLC elválasztás eredménye.

Az alábbiakban megadott példákkal közelebbről ismertetjük a találmány szerinti MI-PC megoldást, anélkül hogy oltalmi igényünket az azokban foglaltakra szándékoznánk korlátozni.

1.példa (lásd 4. ábra)

Általános megoldás

1. Az első lépésben az ekvibrált TLC/HPTLC lap "A" oldalra on-line injektáljuk a minta alikvót részét. Az állandó sebességgel migráló mozgó fázis a minta komponenseit különböző mértékben osztja meg az álló-, és mozgó fázis között, ennek hatására jön létre az elválasztás. Az elválasztási távolság végén a

denzitométer a komponenseket "on-line" detektálja, majd az elvált (vagy el nem vált) komponensek kilépve a kvarc üveglap alól a mozgó fázis evaporációja miatt egy hajszál vékony sávban koncentrálnak. Ezzel a mintáról kapott első információ után a minta alkalmassá válik a következő elemzés végrehajtására.

2. Az on-line elválasztást és detektálást követően, a réteglap megszáritása után, a réteglap "B" (másik) oldaláról megkezdődhet a vékony sávban koncentrált minta egy kezdetben csökkenő, majd állandósult sebességgel történő kifejlesztése előnyösen egy másik mozgó fázis alkalmazásával, majd on-line detektálása. Ezen második elemzést követően a mintáról kapott második információ birtokában a minta komponensei a réteglap másik oldalán újra egy hajszál vékony sávban koncentrálnak, de most már az eredeti mintafelviteli oldalon.

3. A második elválasztást és on-line detektálást követően, a réteglap megszáritása után, megkezdődhet az újra vékony sávban koncentrált minta egyre csökkenő sebességgel történő kifejlesztése, majd off-line detektálása. Ezen harmadik elemzést követően (ami megfelel egy "klasszikus" TLC/HPTLC vizsgálatnak) a mintáról kapott harmadik információ birtokában a minta komponensei a réteglap "A"–"B" sávjában helyezkednek el.

4. A negyedik kromatográfiás elválasztást a réteglap 90°-os elforgatása után, a réteglap második dimenziójában fejlesszük ki, majd az elválasztást értékeljük. Ezzel ugyanazon mintáról a negyedik információ birtokába juthatunk.

Megjegyezzük, hogy a 2. lépés "n" alkalommal ismételhető meg, célszerűen mindig eltérő összetételű mozgó fázis alkalmazásával.

Természetesen a 4 művelet közül az adott elemzési feladattól függően már az első két vagy három elemzés is elegendő információt biztosíthat, de akár az első is elegendő lehet.

Megjegyezzük, hogy a "fully on-line" TLC/HPTLC eredménye alapján ugyanazon típusú álló fázis és azonos mozgó fázis esetén adott minta HPLC elemzésének eredménye jó közelítéssel előre valószínűsíthető. Ez különösen komplex, általában biológiai mátrixok elemzésénél előnyös, hiszen a TLC/HPTLC állófázison a minta egy részének esetleges irreverzibilis adszorpciója egyrészt detektálható, másrészt annak eltávolítása tanulmányozható, ezzel pedig a HPLC álló fázisának élettartama jelentősen megnövelhető.

2. példa

Az 1. példa szerint járunk el, de páros számú 2. lépés szerinti mérést végzünk, és csak egy irányban hajtjuk végre a klasszikus "off-line" detektálást. A megvalósítás folyamatábráját az 5. ábra mutatja be.

3. példa

Az alkalmazott berendezést a 6. ábra szemlélteti. A lineáris elrendezésű kamrába a szilikagél szorbens fázissal felfelé fordítva helyezzük el a 3 réteglapot, majd a 3 réteglap és a 4 kvarcüveg fedőlap között a hosszanti elrendezésű 2 üveg távtartók segítségével 1 mm-es rést biztosítunk. A 6 mozgó fázist szűrőpapír segítségével juttatjuk a 3 réteglapra (a szűrőpapír szolgál 8 megszakíthatóan kapcsolódó közvetítőszervként).

Amikor a kívánt kifejlesztési távolságot (célszerűen TLC réteg esetén 7 cm, HPTLC réteg esetén 4 cm) eléri a 13 adagolónyíláson beadagolt 6 mozgó fázis leglassabban haladó utolsó komponense és kialakul a teljes ekvibráció, a mintát a 12

szeptumon és a 11 injektáló nyíláson keresztül Hamilton-fecskendő segítségével beinjektáljuk. Az injektálást gyorsan, kis térfogatban és közelről végezzük, hogy a minta a legkisebb mértékben terüljön szét az áramlás alatt álló 3 réteglapon. A 4 fedőlap végén elhelyezett 5 denzitométer optikája előtt elhaladt elvált (vagy csak részlegesen elvált) komponensek jeleit "on-line" detektáljuk.

A minta összes komponensének átérése után a 3 réteglapot megszáritjuk, a 6 mozgó fázist befogadó 7 tárolóban 6 mozgó fázist cserélünk, és a 3 réteglapot fordítva visszahelyezzük a 1 tartóelembe, majd egy új szűrőpapírcsík alkalmazásával kapcsolatot teremtünk a 6 mozgó fázis és a 3 réteglap között, és ezzel megkezdjük az ellenkező irányé kifejlesztést. Az 5 denzitométerrel ismét "on-line" detektáljuk az elvált (vagy csak részlegesen elvált) komponensek jeleit.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Multi-információs vékonyréteg-kromatográfiás eljárás, amelyet egy olyan berendezésben hajtunk végre, amelyben a mozgó fázis lineáris áramlását is kialakíthatjuk egy olyan kromatográfiás réteglapon, mely úgy van részlegesen lefedve egy, a mozgó fázis számára átjárhatatlan fedőlappal, hogy a réteglap egyik vagy mindkét vége már nincs lefedve, és így az odaérkező mozgó fázis elpárolog, és így a réteglap ezen részén a mozgó fázissal oda eljutó komponensek koncentrálnak, azzal jellemezve, hogy

a) a réteglap egyik végén visszük fel a mintát, azt kromatografáljuk a mozgó fázis segítségével, miközben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral "on-line" módon jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a kromatografálást addig folytatjuk, míg a minta valamennyi komponense összegyűlik a réteglap másik végén (továbbiakban: első "on-line" detektálásos kromatografálás),

majd kívánt esetben, amennyiben további információt kívánunk szerezni a mintáról,

b₁) az a) lépésben koncentrálnak mintát ismert módon újra kromatografáljuk az előző kromatografálással ellentétes irányba, majd kívánt esetben arra merőleges irányban is, a közvetlenül megelőző lépésben alkalmazottal megegyező vagy eltérő összetételű mozgó fázissal, miközben kívánt esetben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a réteglapot "off-

line" módszerrel kiértékeljük (továbbiakban: egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálás), vagy

b₂) az a) lépésben összegyűlt mintát újra kromatografáljuk az előző kromatografálással ellentétes irányba, az előzővel megegyező vagy egy eltérő összetételű mozgó fázissal, miközben a réteglap fölött elhelyezett egy vagy több detektorral "on-line" módon jeleket veszünk fel a detektor(ok) alatt elhaladó anyag(ok)ról, majd a kromatografálást addig folytatjuk, míg a minta valamennyi komponense összegyűlik a réteglap minta indításával átellenes végén (továbbiakban: további "on-line" detektálásos kromatografálás),

majd kívánt esetben, amennyiben további információt kívánunk szerezni a mintáról,

c₁) a b₂) lépésben összegyűlt mintával végrehajtjuk a b₁) pont szerinti egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálást, vagy

c₂) a b₂) lépésben összegyűlt mintával tetszés szerinti számban megismételjük a b₂) pont szerinti további "on-line" detektálásos kromatografálást, majd kívánt esetben végrehajtjuk a b₁) pont szerinti egy vagy két "off-line" detektálásos kromatografálást.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépésben először a mintát visszük a réteglapra, majd azt követően indítjuk el a mozgó fázis áramlását.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépésben először elindítjuk a mozgó fázis áramlását, majd rögtön vagy az állófázis ekvilibrálást követően injektáljuk a mintát.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázis sebességvektorának irányával megegyező irányban egymás után több detektort alkalmazunk, és a nyert adatokból a szokásos mennyiségi és minőségi meghatározásokon túl a kromatografálás időbeli lefutását is analizáljuk.

5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázis sebességvektorára merőleges irányban több detektort alkalmazunk, melyek közül legalább egyet úgy helyezünk el, hogy az a minta alkotóitól mentes mozgó fázis jeleit érzékelje, majd annak adataiból meghatározzuk és szükség esetén kompenzáljuk a háttéreffektust.

6. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egyidejűleg alkalmazzuk a 4. és 5. igénypont szerinti detektorokat.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan berendezést alkalmazunk, amely csak az egyik végén rendelkezik olyan lefedetlen résszel, ahol a mozgó fázis el tud párologni, így a különböző futtatások között magát a réteglapot forgatjuk a kívánt irányba.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a 6. ábra szerinti berendezést alkalmazzuk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az UV-fényt átengedő kvarcüveg fedőlapot alkalmazunk.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy detektorként egy UV-detektort alkalmazunk.

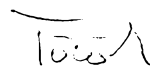
11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy réteglapként egy szokásos TLC vagy HPTLC réteglapot alkalmazunk.

12. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy réteglapként egy 5 μ m-nél kisebb átlagos szemcseméretű, előnyösen szferikus szemcséket tartalmazó réteglapot alkalmazunk.

13. Berendezés multi-információs vékonyrétegekromatográfiához, azzal jellemezve, hogy egy tartóelemen (1) rögzített réteglapja (2) van, továbbá a réteglap (2) felett egy a réteglapnál (2) kisebb méretű fedőlap (4) van távtartókon (3) keresztül a réteglap (2) és a tartóelem (1) egyikéhez csatlakoztatva, továbbá a fedőlap (4) fölött legalább egy detektor (5) van elhelyezve, és a berendezés szélén mozgó fázist (6) befogadó tároló (7) van kiképezve, amely megszakíthatóan kapcsolódó közvetítőszerven (8) át kapcsolódik a réteglaphoz (2), és adott esetben a tárolóval (7) átellenes szélén párolgást elősegítő egységgel (9) rendelkezik, és/vagy a tároló (7) felöli szélén adagolóegység (10) van elrendezve.

14. A 13. igénypont szerinti berendezés, azzal jellemezve, hogy a berendezés két szélén egy-egy mozgó fázist (6) befogadó tároló (7) van kiképezve.

A meghatalmazott:

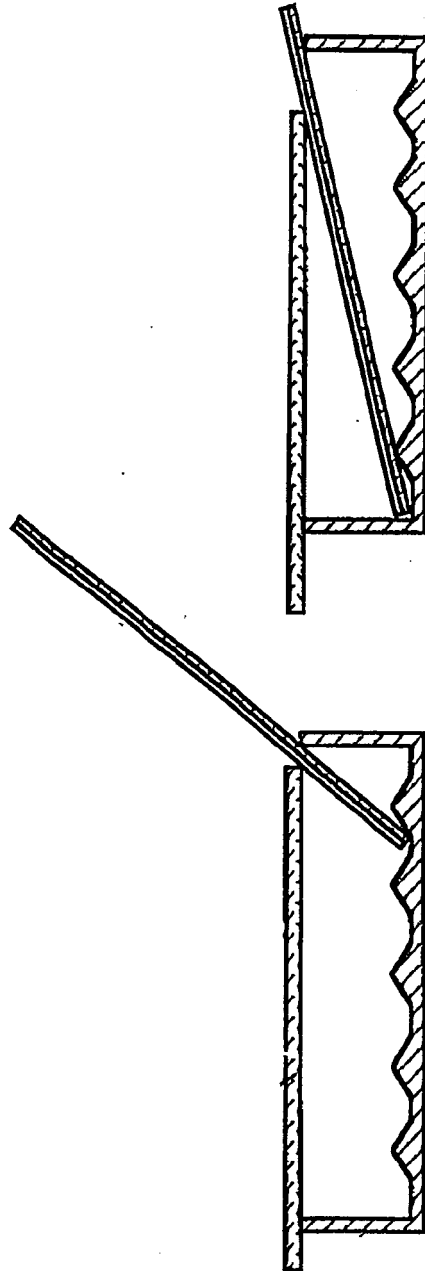


DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
dr. Török Ferenc
szabadalmi ügyvivő



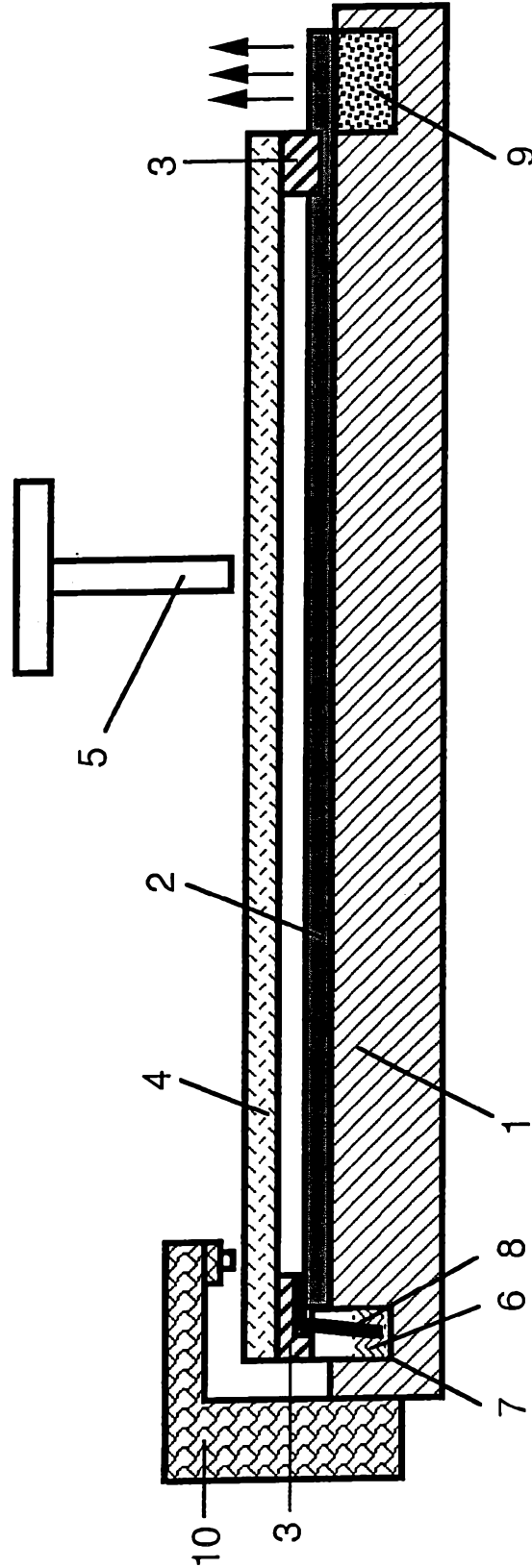
2004. 02. 06.

KÖZZETÉTELI
PÉLDÁNY



1. ábra

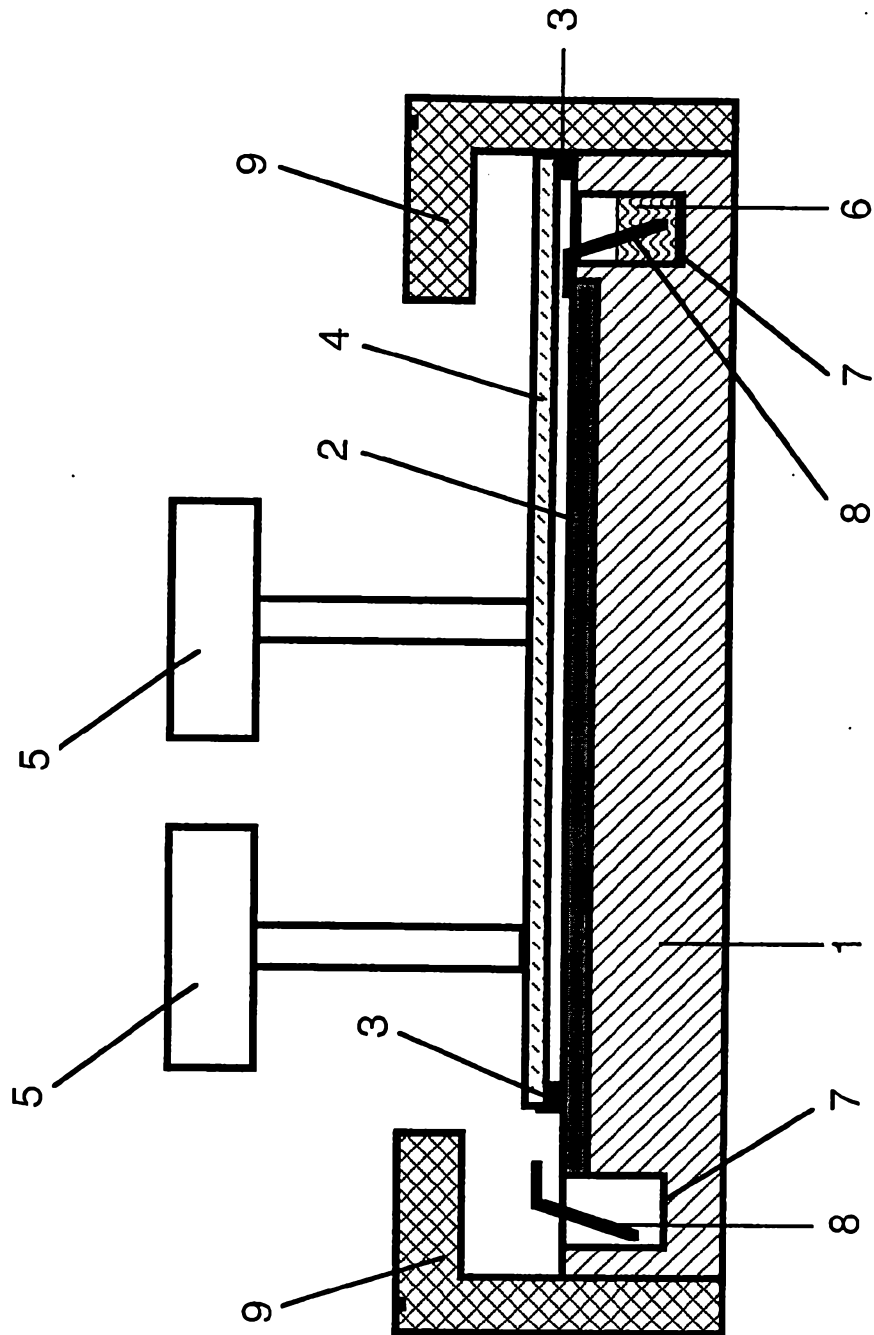
KÖZZÉTELT
PÉLDÁNY



2. ábra

KÖZZETÉTEL
PÉLDANY

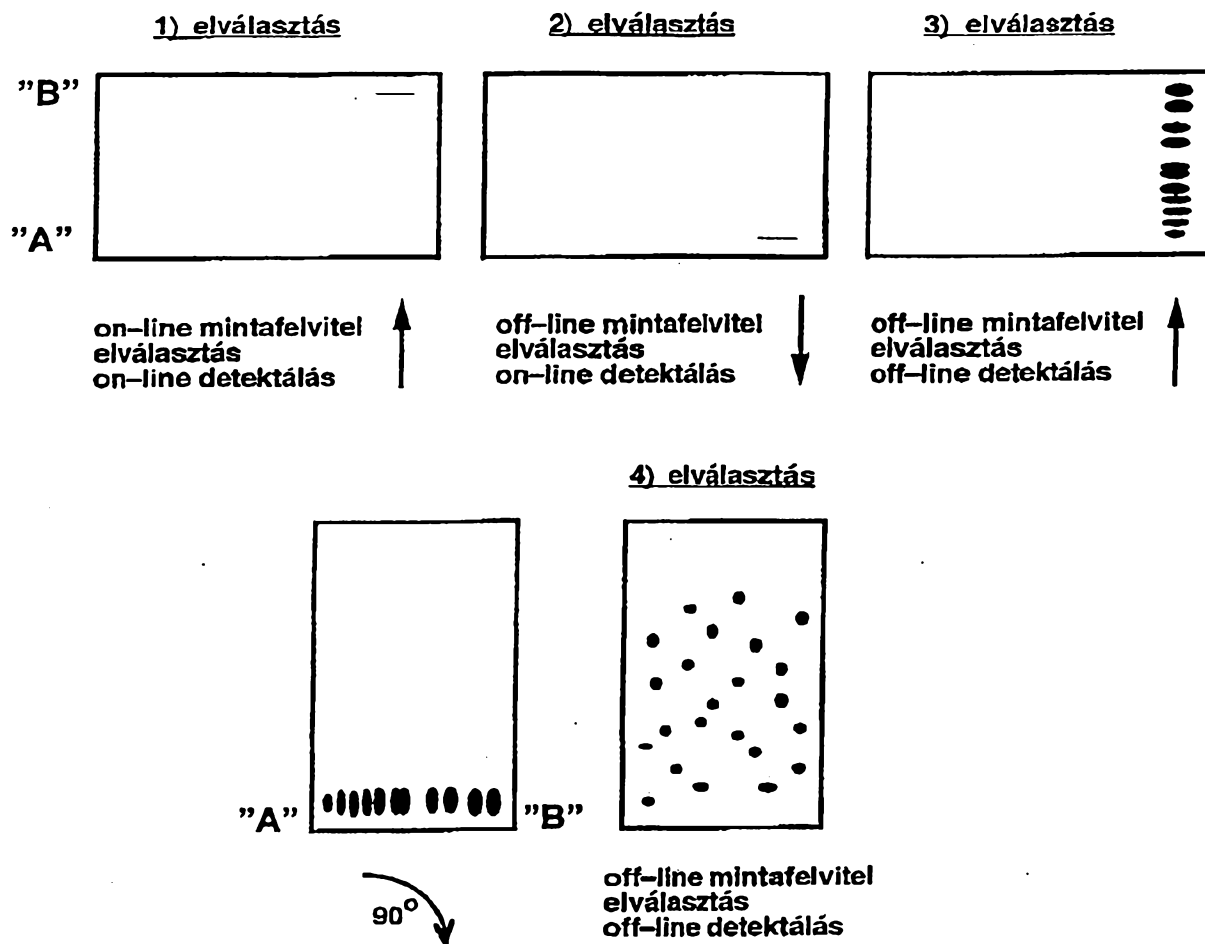
3/6



3. ábra

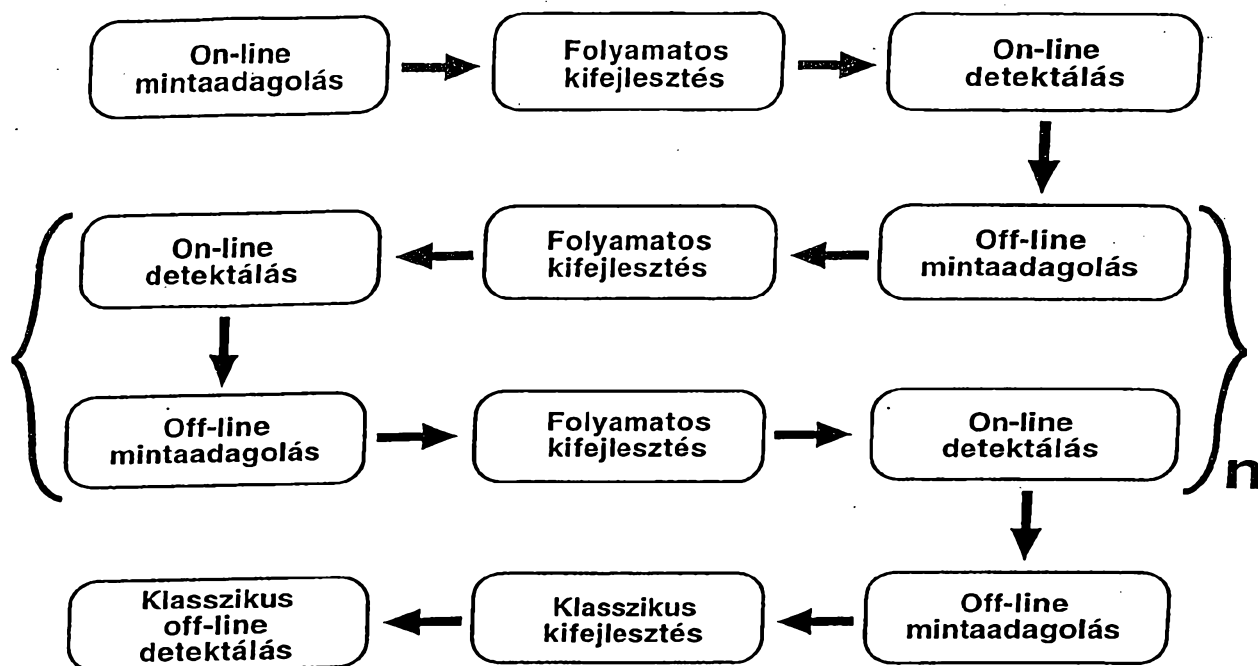
KÖZZETÉL
PÉLDÁNY

4/6



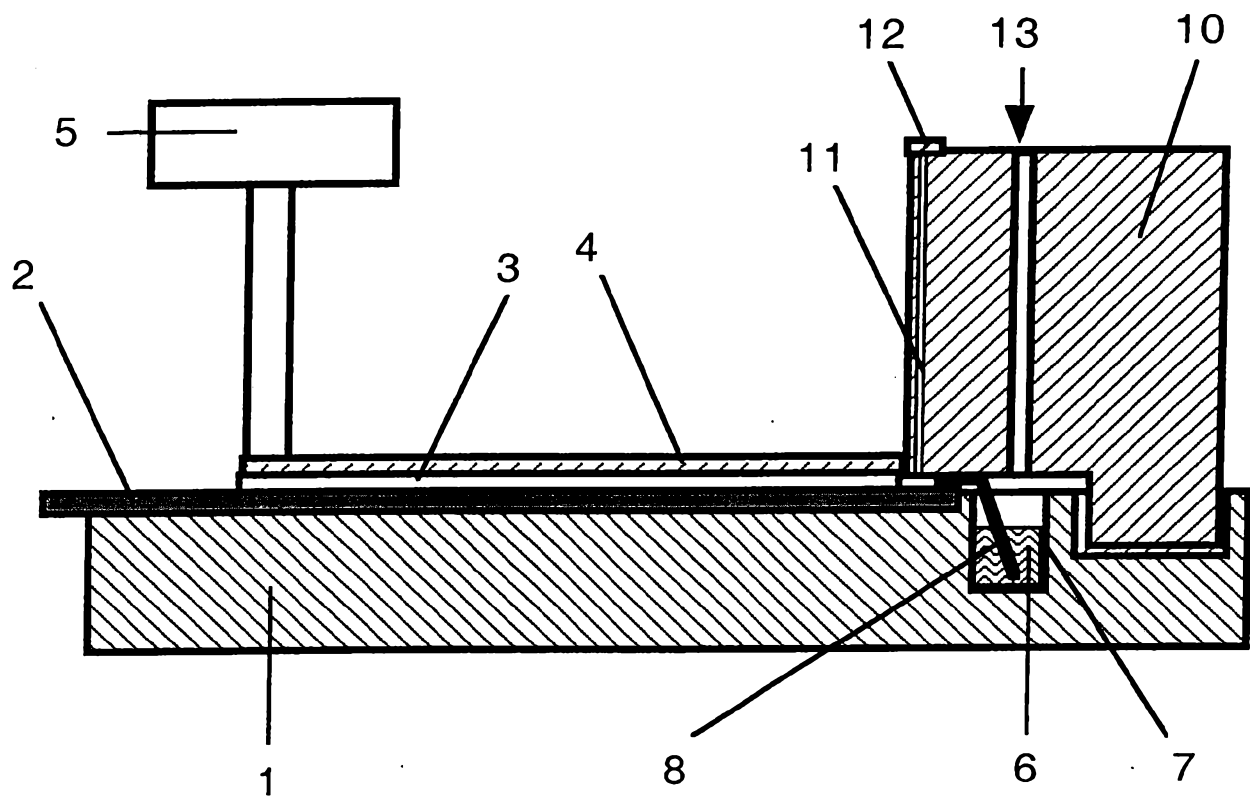
4. ábra

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



5. ábra

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



6. ábra