

Aminosav sztereoizomerek közvetett és közvetlen folyadékkromatográfiás elválasztása

Ph.D. értekezés tézisei



Vékes Erika

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

SZEGED

2004

Témavezető: Dr. Péter Antal
egyetemi docens

2. Céltartalom

Célunk volt közvetlen kísérleti megfigyelésekkel megvizsgálni a különböző típusú szennyezések hatását a vízminőségre. A vizsgálat során egy 10 literes

1. Bevezetés

Az élő szervezet építőelemei többnyire királis molekulák pl.: fehérjék, szénhidrátok, a DNS. Mesterséges eredetű királis vegyületek például lehetnek a gyógyszerek és a növényvédőszer. Ezekkel szemben manapság alapvető követelmény, hogy királisan tiszta formában kerüljenek kereskedelmi forgalomba. Így mind az ipari, mind az alapkutatás szintjén nagy hangsúlyt fektetnek az egyes enantiomerek előállítására, azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az optikai izomerek előállításának három lehetséges módja van: racém keverék előállítása, tiszta királis forrás alkalmazása és enantioszelektív szintézis. A racém keverékek előállítása kevésbé költséges, így inkább a szintézist követő elválasztástechnika hatékonyságának kihasználásával igyekeznek tiszta izomerekhez jutni. Erre nagy szelektivitású és gyors, egyszerű módszeret kínál a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC). A nagyhatékonyságú királis kromatográfiában közvetett és közvetlen módszereket alkalmaznak az enantiomerek elválasztására és azonosítására. A közvetett módszer kolonna előtti származékképzést jelent királis reagenssel. A közvetlen módszerek közé a királis állófázis alkalmazása, illetve a királis mozgófázis adalékok felhasználása tartozik. Így a HPLC méltán vált népszerű módszerré a gyógyszerkutatás, biológia, biokémia területén.

A peptidek a receptorokkal való kölcsönhatás során meghatározott, rögzített formában vannak jelen. E konformációs gátak szerkezete csak részben ismert. Megismerésük egyik lehetséges módja a helyi konformációs gátak beépítése a peptidekbe. A gátolt szerkezetű peptideket úgy állítják elő, hogy olyan aminosavakból építik fel azokat, amelyek olyan funkció csoportot tartalmaznak – a természetes aminosavakhoz képest – amelyek elősegítik a biológiailag aktív konformáció rögzítését.

2. Célkitűzés

Célunk volt közvetett királis kromatográfiás módszer kidolgozása fehérjealkotó és nemfehérje alkotó aminosav enantiomerek elválasztására. A méréseink során egy új aktív

uretán típusú királis származékképző reagenst alkalmaztuk az (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észtert, többek között glicin, alanin, fenilalanin analóg sztereoisomerek, β -alkil-aminosav és iminosav analóg sztereoisomerek elválasztására.

A közvetlen módszerek alkalmazásánál a sikeres sztereoisomer elválasztások megvalósításán túlmenően célunk volt az elválasztás hőmérsékletfüggésének tanulmányozása. Ez felvilágosítást nyújthat, hogy milyen jellegű kölcsönhatás alakul ki a Chirobiotic R oszlop királis szelektora és az elválasztandó sztereoisomerek között különböző kromatográfiás módokban. Az enantioszelektív megkötődést kísérő standard szabadentalpia-változás különbség értékekből kívántunk következtetni a Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopok elválasztási mechanizmusára.

3. Alkalmazott módszerek

A vizsgálatokhoz a közvetett és a közvetlen királis kromatográfiás módszereket alkalmaztuk.

A közvetett módszerek közül (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észtert ((*S*)-NIFE), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranzil-izotiocianát (GITC), illetve a 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamid (FDAA) királis származékképző reagenseket alkalmaztuk a reakciókban. A származékképzési reakcióban keletkező diasztereomer termékeket akirális fordított fázisú oszlopokon választottuk el. Az (*S*)-NIFE-vel történő származékképzés termékeit HPLC-MS módszerrel azonosítottuk.

A közvetlen módszerek során felhasznált királis állófázisok: Chirobiotic T, Chirobiotic Tag, Chirobiotic R, Crownpak CR (+) voltak.

4. Alkalmazott készülékek

Folydékkromatográf:

Waters M-600 alacsonynyomású gradiens pumpa, Waters M-996 fotodiódasoros detektor, Waters Millennium 2010 és 32 adatfeldolgozó rendszer;

Waters 1525 magasnyomású gradiens pumpa, Waters 487 kétsatornás UV-VIS detektor, Waters 717 automata mintaadagoló, Waters Breeze adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA).

Merck Hitachi L-6000 izokratikus pumpa (Merck Hitachi, Tokyo, Japán), Shimadzu SPD6AV detektor (Shimadzu, Tokyo, Japán), HP 3395 Integrátor (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

Tömegspektrométer:

Quattro II (Micromass UK, Altrincham, Anglia)

5. Eredmények

5.1. Aminosav sztereoizomerek elválasztása közvetett módszerrel (*S*)-NIFE) alkalmazásával

Az (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter alkalmazásával közvetett királis kromatográfiás módszert dolgoztunk ki fehérjealkotó és nemfehérje alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztására.

5.1.1. Az (*S*)-NIFE származékképző reagenst sikeresen alkalmaztuk Gly, Ala, Phe, Pro analóg sztereoizomerek, β -Me(alkil)Trp sztereoizomerek, tetrahidroizokinolin vázas karbonsav és pipekolinsav sztereoizomerek elválasztására..

5.1.2. Rámutatunk, hogy a származékképzési reakció hozama függ a reakcióidőtől, pH-tól és a reagens/aminosav molaránytól. Az egyes aminosav családokra optimalizáltuk a származékképzési reakció körülményeit.

5.1.3. HPLC-MS módszerrel kimutattuk, hogy a származékképzési reakciót melléktermékek (4-nitrofenol, fenilalanin-metoxietil-észter (Phe-észter), *N,N*-bisz-(3-fenilpropionsav-metoxietil-észter-2-il (szimmetrikus karbamid) keletkezése kíséri.

5.1.4. HPLC-MS módszerrel igazoltuk, hogy a származékképző reagens nemcsak az aminosav primer aminocsoportjával, hanem az „imino”-csoporttal és fenolos hidroxilcsoporttal is reakcióba lép. (*S*)-NIFE nem lép reakcióba az alkoholos hidroxilcsoporttal. A képződött mono- és bisz- származékokat sikeresen elválasztottuk.

5.1.5. Megállapítottuk, hogy a (*S*)-NIFE-aminosav származékok elnyelési maximuma 205 nm-en van, amelyen a kimutatási határ 3/1 jelzaj viszony mellett 20 pmol-nak adódott.

5.1.6. Sikeresen megoldottuk sztérikusan erősen gátolt vegyületek (α -Me-Tic, prolinok, β -alkil-aminosavak) származékképzését és a keletkezett diasztereomer termékek elválasztását.

5.1.7. Megállapítottuk, hogy a szerves módosítóként MeOH-t tartalmazó eluens nagyobb szelektivitást mutatott az (*S*)-NIFE-vel képzett diasztereomer termékek elválasztásában. Egyes esetekben az egyik diasztereomer termék együtt eluálódott a „szimmetrikus karbamid”-dal MeOH tartalmú eluensben, amit az eluens vagy a gradiens program módosításával ki tudtunk küszöbölni.

5.1.8. Megállapítottuk, hogy az (*S*)-NIFE származékok retencióját egy homológ soron belül elsősorban a hidrofób jelleg határozza meg.

5.1.9. Egy futtatásban megoldottuk a fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztását: Kivéve: Glu, Thr, Gln, Asn.

5.1.10. A β -alkil-szubsztituált-Trp, β -MePhe, β -MeTic, β -MeTyr, β -MeTrp sztereoizomerek esetén rávilágítottunk arra, hogy a sztereoizomerek elválasztásakor az eluens szerves módosítójának cseréje, illetve a kolonna cseréje megváltoztathatja az egyes sztereoizomerek elúciós sorrendjét.

5.1.11. (*S*)-NIFE származékképző esetén az elúciós sorrend: (*S*)<(*R*).

- ☐ Kivétek: fehérjealkotó aminosavak: Arg, His, Asn, Gln, Cys,
- ☐ Prolin analógok: allil-, benzil-, naftil szubsztituált analógok (Cahn-Ingold-Prelog szabály).

5.1.12. β -alkil aminosavak esetén $(2S,3S) < (2R,3R)$.

5.1.13. A közvetett és közvetlen kromatográfiás módszerek összehasonlítását végeztük el Pro, Gly, Ala, Phe és β -alkil-Trp sztereoizomerek elválasztására. Megállapítottuk, hogy:

- ☐ Pro analóg sztereoizomerek elválasztásában az (S)-NIFE a leghatékonyabb,
- ☐ a Gly analógok esetében mind a közvetett mind a közvetlen módszerek jól alkalmazhatók,
- ☐ Ala, Phe analógok elválasztására az antibiotikum alapú kolonnák mellett a származékképző reagensek közül az (S)-NIFE, GITC, FDAA is alkalmasak.
- ☐ A β -alkil-Trp sztereoizomerek csak közvetlen módszerekkel (S)-NIFE, GITC, FDAA választhatók el. A királis származékképzők közül a leghatékonyabb az (S)-NIFE.

5.1.14. Az (S)-NIFE származékképző reagenst a Fluka 2002-ben kereskedelmi forgalomba hozta.

5.2. Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfiás viselkedésének összehasonlítása

5.2.1. A β -aminosav enantiomerek retenciós paraméterei a MeOH tartalom függvényében a fordított fázisú kromatográfiának megfelelő módon változnak a Chirobiotic T és TAG oszlopokon.

5.2.2. Az „iminosav” enantiomerek retenciós faktorai a MeOH tartalom függvényében a Chirobiotic T és TAG oszlopokon eltérően viselkednek. A Chirobiotic T oszlopon U-alakú görbe szerint, míg a Chirobiotic TAG oszlopnál maximum görbe szerint változnak az enantiomerek retenciós faktorai a MeOH tartalom növekedésével.

5.2.3. Primer és szekunder α -aminosavak esetén nem szükséges a cukorrészek által biztosított királis centrumok és funkciók csoportok jelenléte a sikeres királis elválasztáshoz.

5.2.4. β -aminosavak esetében a cukorrészek és az apoláris oldallánc jelenléte hozzájárult a királis felismeréshez, ami a sikeres elválasztás feltétele volt. Ennek valószínű oka a királis szénatom egy szénatommal távolabb van a karboxilcsoporttól, mint az α -aminosavaknál.

5.3. Hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára

5.3.1. Megállapítottuk, hogy a Chirobiotic R oszlopon a vizsgált vegyületek közül a Trp, *eritro*-, *treo*- β -MeTrp sztereoizomerek retenciók faktorai a MeOH tartalom növekedésével U-alakú görbe szerint változtak, ami a hőmérséklet növekedésével még kifejezőbbé vált.

5.3.2. Kimutattuk, hogy a *N*-benziloxikarbonil-triptofán (Z-Trp), *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-triptofán (DNTPyr-Trp), 1-[5-klór-2-(metilamino)fenil]-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin (CMP-Tic), 5-fenil-tetrahidrofuran-2-on-butano-4-lakton („butirolakton”) a sztereoizomerek retenciók paraméterei hagyományos fordított fázisú kromatográfiának megfelelő módon változnak a Chirobiotic R oszlopon a MeOH tartalom növekedésével.

5.3.3. A királis elválasztás hajtóerejét jellemző $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket a MeOH tartalom függvényében ábrázolva, megállapítottuk, hogy a Trp, *eritro*-, *treo*- β -MeTrp, és a butirolakton esetén kis negatív érték tapasztalható, ami azt jelenti, hogy a sztereoizomerek elválasztása kis szelektivitású a Chirobiotic R oszlopon. A DNTPyr-Trp, CMP-Tic, Z-Trp sztereoizomerek elválasztása nagy negatív $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékkel jellemezhető, ami azt jelenti, hogy a Chirobiotic R oszlopon elválasztásuk enantioszelektivitása nagyobb, mint az előbb említett csoporté.

5.3.4. Megállapítottuk, hogy fordított fázisú módban az „ikerionos” és a negatív töltésű vegyületek kölcsönhatása kedvezőbb az állófázissal, mert az elektrosztatikus kölcsönhatás kialakítására alkalmas funkciók csoporttal rendelkeznek.

5.3.5. Normál és polár-organikus módban más jellegű kölcsönhatások a meghatározóak a királis elválasztás során (hidrogén-híd, π - π -, dipól-dipól-, szterikus kölcsönhatás).

5.3.6. A térszerkezet merevítése és a funkciók csoportok által kialakított kölcsönhatások elősegítették a királis felismerést (DNPyrr-Trp, Z-Trp, CMP-Tic).

5.3.7. A királis felismeréshez nem feltétlen szükséges az elsődleges kölcsönhatás kialakítására képes csoport jelenléte. Az erős másodlagos kölcsönhatások elősegítik a királis felismerést (CMP-Tic, „butirolakton”).

5.3.8. Az entalpia-entrópia kompenzáció vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy a Chirobiotic R oszlopon az egyes enantiomerek elválasztási mechanizmusa hasonló.

5.3.9. Az entalpia-entrópia kompenzációból megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek és az állófázis között kétfajta kölcsönhatás alakul ki, az egyik csoportba tartoznak a Z-Trp, DNPyrr-Trp, a másikba pedig a CMP-Tic, butirolakton, Trp, *eritro*-, *treo*- β -MeTrp sztereioizomerek. Egy csoporton belül a kölcsönhatás jellege hasonló.

6./A. Az értekezés alapját képező publikációk

1. A. Péter, E. Vékes, G. Török

Application of (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester as a new chiral derivatizing agent for proteinogenic amino acid analysis by high-performance liquid chromatography

Chromatographia; **52** (2000) 821-826.

IP: 1,619

2. A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé, F. Borremans

Application of a new chiral derivatizing agent to the enantioseparation of secondary amino acids

J. Chromatogr. A; **948** (2002) 283-294.

IP: 3,098

3. E. Vékes, G. Török, A. Péter, J. Sági, D. Tourwé

Indirect high-performance liquid chromatographic separation of stereoisomers of β -alkyl-substituted amino acids by the application of (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester as chiral derivatizing agent

J. Chromatogr. A; **949** (2002) 125-139.

IP: 3,098

4. A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong, D. Tourwé
Enantioseparation by HPLC of imino acids on macrocyclic glycopeptide stationary phases and as their (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester derivatives
Chromatographia; **56** (2002) S-41-47.
IP: 1,230
5. A. Péter, E. Vékes, L. Gera, M. Stewart, D.W. Armstrong
Comparison of the direct and indirect LC methods for separating enantiomers of unusual glycine and alanine amino acid analogues
Chromatographia; **56** (2002) S-79-89.
IP: 1,317
6. G. Török, A. Péter, E. Vékes, J. Sági, M. Laronze, J-Y, Laronze, D.W. Armstrong
Enantiomeric high-performance liquid chromatographic separation of β -substituted tryptofan analogues
Chromatographia; **51** (2000) S-165-174.
IP: 1,619
7. A. Péter, G. Török, E. Vékes, J. Van Betsbrugge, D. Tourwé
HPLC separation of enantiomers of α -substituted proline analogues by the application of (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester as chiral derivatizing agent
J Liq. Chromatogr. and R. T; **27** (2004) 17-28.
IP: 0,819
8. A. Péter, E. Vékes, D. W. Armstrong, D. Tourwe, L. Gera, F. Fülöp
A comparison of the separation efficiencies of Chirobiotic T and TAG columns in the separation of unusual α - and β -amino acids
J. Chromatogr. A (közlésre elküldve)
IP: 3,098
9. A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong
Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase
J. Chromatogr. A; **958** (2002) 89-107.
IP: 3,098
- High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino acids
Balázs Szendrői, 91 on High-Performance Separation Methods
Book, 2-4 September, 2001, Hungary

Egyéb publikációk

1. Péter, A. Árki, **E. Vékes**, D. Tourwe, L. Lázár, F. Fülöp, D. W. Armstrong
Direct and indirect high-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids

J. Chromatogr. A; (közlésre elküldve)

2. A. Péter, **E. Vékes**, A. Árki, D. Tourwč, W. Lindner
Direct HPLC enantioseparation of α -substituted proline analogs on a quinine-derived chiral anion exchanger stationary phase

J. Sep. Sci; **26** (2003) 1125-1132.

6./B. Tudományos előadások és poszterek

1. **Vékes E.**, Olajos E., Péter A., D. Tourwé

Szubsztituált fenil-alanin analógok enantiomerjeinek elválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával XXII. Kémiai Előadói Napok,
Szeged, November 1-3, 1999.

2. Péter A., **Vékes E.**, Péter M., Fülöp F., Tóth G., Tourwé D.

Új királis derivatizálószer alkalmazása az aminosavak kromatográfiájában
MTA, Peptidkémiai Munkabizottság Ülése
Balatonszéplak, május 29-31, 2000.

3. Péter A., **Vékes E.**, Péter M., Fülöp F., Tóth G., Tourwé D.

Új királis derivatizálószer alkalmazása az aminosav analitikában
Vegyészkonferencia
Debrecen, július 5-7, 2000. október 2.

4. **E. Vékes**, A. Péter, D. Tourwé, G. Tóth

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of secondary amino acids by application of (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl) phenylalanine methoxyethyl ester [(*S*)-NIFE] as new chiral derivatizing agent

ACE, Advances in Chromatography, Electrophoresis and related separation methods
Eger, August 30-September 1, 2000, Hungary.

5. Vékes. E., Péter A., Tóth G., Tourwé D.

Szekunder aminosavak HPLC-s elválasztása új királis származékképző reagens alkalmazásával

Elválasztástudományi Vándorgyűlés,

November 8-10, Visegrád, 2000

6. Péter A., Vékes E., Péter M., Fülöp F., Tóth G., Tourwé D.

Új királis derivatizálószer alkalmazása az aminosavak kromatográfiájában

Elválasztástudományi Vándorgyűlés

Visegrád, 2000, november 8-10.

7. Vékes E., Péter A., Török G.;

Új királis származékképző reagens alkalmazása β -helyzetben szubsztituenst tartalmazó aminosav analógok enantiomerjeinek elválasztására

Kémiai Előadói Napok

Szeged, 2000, november 20-22.

8. A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé

Application of a new chiral derivatizing agent for the enantioseparation of secondary amino acids

25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

Maastricht, 17-22 June;2001, Netherlands

9. G. Török, E. Vékes, D. Tourwé, G. Tóth, J. Sapi, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -alkyl substituted amino acids

25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

Maastricht, 17-22 June;2001, The Netherlands

10. E. Vékes, G. Török, A. Péter, D. Tourwé

HPLC enantioseparation of unusual amino acids

ACE, Advanced in Chromatography, Electrophoresis and Related Separation Methods

Budapest, 25-26 June; 2001, Hungary

11. A. Péter, E. Vékes, G. Török, D.W. Armstrong, D. Tourwé

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino acids

Balaton Symposium '01 on High-Performance Separation Methods

Siófok, 2-4 September, 2001, Hungary

12. **E. Vékes**, A. Péter, L. Gera, J.M. Stewart, D.W. Armstrong
High-performance liquid chromatographic chiral separation of unusual amino acids
Balaton Symposium '01 on High-Performance Separation Methods
Siófok, 2-4 September, 2001, Hungary
13. G. Török, J. Van Betsbrugge, **E. Vékes**, D. Tourwé, A. Péter
Chiral high-performance liquid chromatographic enantioseparation of α -substituted proline analogues
Symposium on Peptido- and Protein Mimetics
Spa, 9-14 September, 2001, Belgium
14. **Vékes E.**, Török R., Péter A., Armstrong, D.W.
A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára
Kémiai Előadói Napok (KEN)
Szeged, Október 29-31, 2001
15. A. Péter, G.Török, **E.Vékes**, J. Van Betsbrugge, D. Tourwé, W. Lindner
Chiral high-performance liquid chromatographic enantioseparation of α -substituted proline analogues
27th European Peptide Symposium
Sorrento, Augusztus 31.-Szeptember 6., 2002, Olaszország
16. **Vékes E.**, Péter A., Armstrong, D.W.
A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2002
Lillafüred, Október 16-18, 2002
17. **Vékes E.**, Árki A., Péter A.,
Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfiás viselkedésének összehasonlítása
Kémiai Előadói Napok (KEN)
Szeged, Október 28-30, 2002
18. **Vékes E.**, Péter A., Árki A., Fülöp F.,
 β -aminosav enantiomerek elválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával
Ph.D.Tudományos Napok 2003
Budapest, Április 10-11, 2003
19. Árki A., **Vékes E.**, Sztojkov-Ivanov A., Péter A.,
Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfiás viselkedésének összehasonlítása
Ph.D.Tudományos Napok 2003
Budapest, Április 10-11, 2003

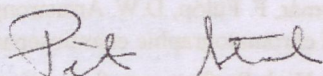
20. E. Vékes, A. Péter, A. Árki, F. Fülöp, D.W. Armstrong
Chiral high-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids
27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques,
Nice, June 15-19, 2003, Franciaország

21. E. Vékes, A. Árki, F. Fülöp, G. Tóth, A. Péter
Comparison of efficiency of C₁₈ columns in the indirect HPLC enantioseparation
5th Balaton Symposium '03 on High-Performance Separation Methods
Siófok, 3-5 September, 2003, Hungary

22. A. Árki, E. Vékes, M. Solymár, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
Chiral high-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids
5th Balaton Symposium '03 on High-Performance Separation Methods
Siófok, 3-5 September, 2003, Hungary

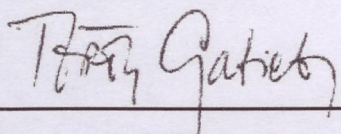
7. Társ szerzői nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, és az adott publikáción alapuló adott tézispontban foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat e célból a jövőben sem használhatom fel.



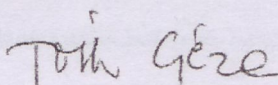
Péter Antal

5.1.1-5.1.14; 5.2.1-5.2.4; 5.3.1-5.3.9



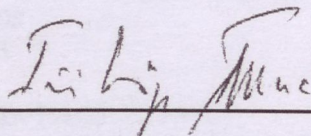
Török Gabriella

5.1.1-5.1.8; 5.1.10-5.1.13



Tóth Géza

5.1.1; 5.1.4; 5.1.7; 5.1.8; 5.1.11



Fülöp Ferenc

5.2.1-5.2.4

