



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8602393

Nederland

⑲ NL

⑤4 Solubilisatiechromatograaf.

⑤1 Int.Cl⁴: G01N 30/02.

⑦1 Aanvrager: Yokogawa Hokushin Electric Corporation te Tokio, Japan.

⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8602393.

②2 Ingediend 22 september 1986.

③2 Voorrang vanaf 26 september 1985, 9 oktober 1985, 9 oktober 1985.

③3 Land van voorrang: Japan (JP).

③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 213337/85 , 225850/85 , 225852/85 .

⑥2 - -

④3 Ter inzage gelegd 16 april 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Solubilisatiechromatograaf.

Gebied van de uitvinding.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een solubilisatie-
5 chromatograaf waarin een oplosmiddel bestaande uit een buffermengsel en
geïoniseerde micellen door een capillair kan stromen waarvan de beide
einden respectievelijk met de pluskant van een elektrische gelijkspan-
ningsbron en met de minkant daarvan worden verbonden, waarna een mon-
ster in het bovengenoemde capillair wordt ingevoerd; de componenten van
10 het monster door een combinatie van het ontledingsverschijnsel van het
monster in de bovengenoemde geïoniseerde micellen en capillaire elek-
troforese werking worden gescheiden, waarbij de componenten van het
monster kwalitatief of kwantitatief worden geanalyseerd.

15 Achtergrond van de uitvinding.

Fig. 1 toont het principe en de samenstelling van een algemeen be-
kende solubilisatiechromatograaf. 1 is een capillair bestaande uit een
kolom, waarvoor bijvoorbeeld een samengesmolten siliciumdioxide capil-
lair wordt toegepast. 2 en 3 zijn houders die elk een gemengde oplos-
20 sing van een buffermengsel en micellen bevatten. De beide einden van
het capillair 1 zijn afzonderlijk in de houders geplaatst. Voor de
bovengenoemde micellen, colloïde ionen gevormd door ontleding, wordt
bijvoorbeeld natriumdodecylsulfaat (SDS) in de bufferoplossing toege-
past. E is een elektrische bron waarvan de pluskant met een in de hou-
25 der 2 gedompelde elektrode 4 is verbonden en waarvan de minkant met een
in de houder 3 gedompelde elektrode 5 is verbonden, om tussen de beide
einden van het capillair 1 een spanning aan te leggen. Op het capilair
1 is aan zijn gedeelte nabij de elektrode 5 aan de minkant een detector
6, bijvoorbeeld een ultraviolette spectrofotometer aangebracht.

30 Zoals getoond in fig. 2 stromen door het capillair 1 twee fasen
van micellen en buffermengsel die een dergelijke samenstelling hebben.
Met andere woorden, wanneer aan het capillair een hoge spanning wordt
aangelegd stroomt als gevolg van elektro-osmosestroming het bovenge-
noemde buffermengsel in de richting van de met A aangegeven pijl. Aan
35 de andere kant is ontleed SDS (micel) anionisch en heeft, als gevolg
van elektroforese, de eigenschappen om zich in een richting naar de
pluskant te verplaatsen welke richting tegengesteld is aan de richting
van de stroming van het buffermengsel. Wanneer echter de verplaatsings-
snelheid van het bovengenoemde buffermengsel groter is dan die van de
40 micellen als gevolg van elektroforese, komen de SDS-micellen uiteinde-

8602393

lijk met achterstand ten opzichte van het bovengenoemde buffermengsel bij de houder 3 aan.

Wanneer aan de zijde van elektrode 4 aan de pluskant een monster SM wordt geïnjecteerd in het capillair 1 waarbinnen een stroming van deze twee fasen aanwezig is, wordt een component van het monster, welke in het geheel niet in de bovengenoemde micellen oplosbaar is, door een elektro-osmosestroom meegevoerd en verplaatst deze zich samen met het bovengenoemde buffermengsel met zeer grote snelheid naar de zijde van de elektrode 5 aan de minkant. Aan de andere kant verplaatst zich een component van het monster welke volledig in de micellen is opgelost met dezelfde snelheid als die van de micellen, waardoor de aankomst aan de zijde van houder 3 maximaal wordt vertraagd. Een tussenliggende component van het monster, welke slechts in bepaalde mate in de micellen oplosbaar is, verplaatst zich met een gemiddelde snelheid. Elke component van het monster die in het capillair 1 wordt verplaatst heeft daardoor een retentietijd die overeenkomt met het verschil in de mate van oplosbaarheid. Daardoor wordt, wanneer de op deze wijze gescheiden componenten van het monster door een in de uitgangszijde van het capillair 1 aangebrachte detector 6 worden gedetecteerd, een chromatogram verkregen dat overeenkomt met de mate van oplosbaarheid van elke monstercomponent.

Om echter met een dergelijke inrichting een nauwkeurige analyse uit te voeren, is het noodzakelijk om steeds een constante hoeveelheid van het monster in het capillair 1 in te voeren. Ter verduidelijking, met de gebruikelijke inrichting zoals getoond in fig. 1 wordt een werkwijze voor het sturen van een hoeveelheid van het in het capillair 1 ingevoerde monster uitgevoerd door een hoogteverschil tussen de houders 2 en 3 aan te brengen en door gebruik te maken van het drukverschil. Bij deze werkwijze is het echter noodzakelijk om de monsterhouder omhoog te brengen om het vereiste drukverschil te bewerkstelligen, hetgeen een lastig karwei is. Bij het omhoog brengen van de monsterhouder wordt verder het capillair 1 vaak verschoven waardoor de reproduceerbaarheid van deze inrichting wordt verlaagd. Hoewel het bovendien noodzakelijk is om de hoeveelheid van het ingevoerde monster in overeenstemming met het scheidend vermogen van de kolom (het capillair 1) van een dergelijke inrichting te wijzigen, is het moeilijk om de hoeveelheid van het geïnjecteerde monster nauwkeurig te sturen en een dergelijk proces op de bovengenoemde wijze uit te voeren.

Samenvatting van de uitvinding.

Het doel van de uitvinding is het verschaffen van een solubilisa-
 tiechromatograaf die gemakkelijk te besturen is en waarvan de hoeveel-
 heid van het in het bovengenoemde capillair ingevoerde monster gemakke-
 5 lijk te wijzigen is. De samenstelling van een chromatografie-inrichting
 volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door een driewegverbindingsdeel
 waarvan de eerste opening met het bovengenoemde capillair is verbonden,
 de tweede opening met een buisdeel is verbonden waardoor het bovenge-
 noemde oplosmiddel en het monster worden toegevoerd en waarvan de als
 10 een uitstroomopening toegepaste derde opening aan de inlaatzijde van
 het bovengenoemde capillair is aangebracht om de inlaat van het capil-
 lair in aanraking te brengen met een stroom van een oplossing van het
 bovengenoemde oplosmiddel en het monster en om de bovengenoemde oplos-
 sing door de derde opening te laten uitstromen uitgezonderd het gedeel-
 15 te dat in het capillair wordt gevoerd; en afzonderlijk aangebrachte
 middelen voor het wijzigen van de aanraaktijd van het capillair met het
 bovengenoemde monster of voor het sturen van de hoeveelheid van het in
 capillair gezogen monster om een bepaalde hoeveelheid van het monster
 in het capillair in te voeren.

20. Verdere kenmerken van een chromatografie-inrichting volgens de
 uitvinding zijn dat de aanraaktijd van de inlaat van het capillair met
 het bovengenoemde monster door het wijzigen van de stroomsnelheid van
 het bovengenoemde oplosmiddel wordt gewijzigd of door het wijzigen van
 de hoeveelheid van het geïnjecteerde monster in de bovengenoemde buizen
 25 waardoor het oplosmiddel en het monster worden toegevoerd.

Nog verdere kenmerken van een chromatografie-inrichting volgens de
 uitvinding zijn dat de hoeveelheid van het in het capillair gezogen
 monster door het wijzigen van de grootte van de aan de beide einden van
 het capillair aangelegde spanning of door het wijzigen van de duur van
 30 de aangelegde spanning wordt gestuurd.

Nog weer verdere kenmerken van een chromatografie-inrichting vol-
 gens de uitvinding zijn dat aan het bovengenoemde driewegverbindings-
 deel een ultrasone piezoëlektrische omzetter is bevestigd om het boven-
 genoemde monster door middel van ultrasone trillingen in het capillair
 35 te voeren, waarbij de hoeveelheid van het in het capillair gezogen mon-
 ster door het wijzigen van de grootte of de frequentie van de aan de
 ultrasone piezoëlektrische omzetter aangelegde spanning wordt gestuurd.

Korte beschrijving van de tekeningen.

40 Fig. 1 is een tekening die het principe en de samenstelling van

860 2393

een tot op dit moment algemeen bekende solubilisatiechromatograaf toont.

Fig. 2 is een schematische voorstelling van de werking van de in fig. 1 getoonde bekende inrichting.

5 Fig. 3 toont de samenstelling van een uitvoeringsvoorbeeld van een inrichting volgens de uitvinding.

Fig. 4 is vergrote dwarsdoorsnede van een belangrijk deel van het uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding zoals getoond in fig. 3.

10 Fig. 5 (a)-(c) zijn schematische voorstellingen van de werking van het uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding zoals getoond in fig. 3.

Fig. 6 toont een samenstelling van een verder uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding.

15 Fig. 7 toont de samenstelling van nog een verder uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding.

Fig. 8 is een vergrote doorsnede van een belangrijk deel van het uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding zoals getoond in fig. 7.

20 Fig. 9 (a)-(d) zijn schematische voorstellingen van de werking van het uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding zoals getoond in fig. 8.

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding.

25 Fig. 3 toont een samenstelling van een uitvoeringsvoorbeeld van een inrichting volgens de uitvinding, en fig. 4 toont een vergrote dwarsdoorsnede van een belangrijk deel van het uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding. In deze figuren zijn elementen die in hoofdzaak dezelfde zijn als in fig. 1 met dezelfde verwijzingscijfers aangegeven en een beschrijving van deze elementen wordt achterwege
30 gelaten. 7 is een lage-drukpomp voor het vanaf een houder 2 door het buisdeel 8 naar de stroomafwaartse zijde verzenden van een oplosmiddel bestaande uit het buffermengsel en micellen, en omvat toevoermiddelen voor het oplosmiddel.

35 S is een in het midden van het buisdeel 8 aangebrachte monsterklep en is samengesteld uit een zeswegscharnelklep S_1 en een meetlus S_2 . Een bepaalde hoeveelheid van het door een monsterinjectiepoort S_3 gevoerde monster wordt door het omschakelen van klep S_1 in het buisdeel 8 geïnjecteerd. 9 is een buisvormige elektrode die met het eindgedeelte
40 van het buisdeel 8 is verbonden en eveneens met de pluskant van de

8602393

elektrische bron E is verbonden.

10 is een driewegverbindingsdeel waarvan de eerste opening met het capillair 1 is verbonden, waarvan de tweede opening met de buisvormige elektrode 9 door welke het bovengenoemde oplosmiddel en het monster
 5 stromen is verbonden en waarvan de derde opening als uitstroomopening wordt toegepast. Fig. 4 toont vergroot een dwarsdoorsnede van deze delen. In fig. 4 toont 10a het hoofdlichaam van het driewegverbindingsdeel, 10b een klemschroef voor het bevestigen van de buisvormige elektrode 9 aan het hoofdlichaam 10a in de tweede opening, 10c een klem-
 10 schroef voor het bevestigen van het capillair 1 aan het hoofdlichaam 10a in de eerste opening, en 10d een klemschroef voor het bevestigen van een uitstroombuis 11 aan het hoofdlichaam 10a in de derde opening.

De werking van de op deze wijze samengestelde inrichting wordt nu onder verwijzing naar de schematische voorstellingen van fig. 5 beschreven. Fig. 5(a) toont de toestand van de inrichting voordat het
 15 monster in het buisdeel 8 wordt geïnjecteerd. In deze toestand stroomt alleen het oplosmiddel bestaande uit het buffermengsel en de micellen door het buisdeel 8 en wordt het bovengenoemde oplosmiddel gedeeltelijk door de elektro-osmosestroom en door elektroforese als gevolg van de
 20 door de elektrische bron E aangelegde spanning in het capillair 1 gevoerd. Het resterende deel van het oplosmiddel dat niet in het capillair 1 is gevoerd stroomt door de uitstroombuis 11 weg.

Wanneer via de monstertekleef 8 een monster in het buisdeel 8 wordt geïnjecteerd, wordt het monster tussen twee delen van het oplosmiddel
 25 opgesloten en vormt een band B zoals getoond in fig. 5(b) waarna het zich met het door de pomp 7 toegevoerde oplosmiddel verplaatst. Wanneer de band B in aanraking wordt gebracht met het inlaateinde van het capillair 1 (fig. 5(c)) wordt het monster door de elektro-osmosestroom en door elektroforese in het capillair 1 gevoerd, waarbij de rest van
 30 het monster dat niet in capillair is gevoerd door de uitstroombuis 11 weg stroomt, zoals in het geval van het bovengenoemde oplosmiddel.

In dit proces is de hoeveelheid van het in het capillair 1 ingevoerde monster evenredig met de aanraaktijd van het uiteinde van het capillair 1 met het monster, indien de aangelegde spanning E constant
 35 is. Daardoor is het, wanneer de aanraaktijd gestuurd kan worden, mogelijk om de hoeveelheid van het in het capillair ingevoerde monster te sturen.

Voor dit doel is, in het uitvoeringsvoorbeeld, in een eerste werkwijze de snelheid van pomp 7 gewijzigd om de aanraaktijd van de band B
 40 met het uiteinde van het capillair 1 te wijzigen. In een tweede werk-

8602393

wijze is de meetlus S_2 van de monsterklep S gewijzigd en is de hoeveelheid van het in het buisdeel 8 via de monsterklep S ingevoerde monster gewijzigd om de breedte van de band B te wijzigen en om de aanraaktijd van de band B met het uiteinde van het capillair 1 te wijzigen.

Met de bovengenoemde werkwijze kan op eenvoudige wijze de sturing en wijziging van de hoeveelheid van het in het capillair 1 ingevoerde monster worden uitgevoerd en hoeft bovendien het capillair 1 niet bewogen te worden voor het sturen en wijzigen van de ingevoerde hoeveelheid van het monster, zodat de reproduceerbaarheid van de inrichting niet wordt geschaad. Voorts kan een analyse worden uitgevoerd zonder vermindering van het rendement van de kolom omdat de optimale hoeveelheid van het ingebrachte monster in overeenstemming met het scheidend vermogen van de kolom kan worden gekozen.

Fig. 6 toont de samenstelling van een verder uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding. In fig. 6 zijn elementen die in hoofdzaak dezelfde zijn als die in fig. 3 met dezelfde verwijzingscijfers aangegeven en de beschrijving van dergelijke elementen wordt achterwege gelaten. Een deel E' , omgeven door een afwisselend lang en kort gestreepte lijn, is een elektrisch bronelement dat zodanig is opgebouwd dat de spanning van de elektrische bron E_1' via een stuurorgaan E_2' aan de beide einden van het capillair 1 wordt aangelegd.

Wanneer de hoeveelheid van het via de monsterklep S in het buisdeel 8 geïnjecteerde monster constant is en de stroomsnelheid van een door de pomp 7 toegevoerd oplosmiddel constant is, is de hoeveelheid van het in het capillair 1 gevoerde monster afhankelijk van de grootte van de aan de beide einden van het capillair 1 aangelegde spanning of van de duur van de aangelegde spanning.

In het uitvoeringsvoorbeeld, in een toestand waarin de hoeveelheid van het via de monsterklep S geïnjecteerde monster constant is ingesteld en de stroomsnelheid van door de pomp 7 toegevoerd oplosmiddel constant is ingesteld, wordt de grootte of de duur van de bovengenoemde aangelegde spanning door het stuurorgaan E_2' gestuurd om de hoeveelheid van het in het capillair 1 ingebracht monster te sturen. Met een dergelijke werkwijze kan bovendien een uitwerking gelijk aan die in het bovengenoemde uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding worden verkregen.

Fig. 7 toont de samenstelling van nog een verder uitvoeringsvoorbeeld van de inrichting volgens de uitvinding. In fig. 7 zijn elementen die in hoofdzaak gelijk zijn aan die in de figuren 3 en 7 met dezelfde

8602393

verwijzingscijfers aangegeven en de beschrijving van dergelijke elementen wordt achterwege gelaten. Aan 10' zijn ook het buisdeel 9 en een als uitstroombuis dienende buisvormige elektrode 11' verbonden en voorts is het capillair 1 met 10' verbonden waarbij het capillair het
 5 bovengenoemde buisdeel onder een rechte hoek snijdt. Een ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 is aan dat deel van 10' bevestigd dat tegenover het inlaateinde van het capillair 1 ligt. 13 is een oscillator die de ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 aandrijft en 14 is een schakelaar die de verbinding van de elektrische bron E met de beide
 10 einden van het capillair 1 stuurt.

Fig. 8 toont vergroot een aanzicht van de doorsnede van het driewegverbindingsdeel 10'. In fig. 8 toont 10a' het hoofdlichaamsdeel van het driewegverbindingsdeel, 10b' een klemschroef voor het bevestigen van het buisdeel 9 aan het hoofdlichaam 10' in de eerste opening, 10c'
 15 een klemschroef voor het eveneens bevestigen van de als een uitstroombuis dienende buisvormige elektrode 11' aan het hoofdlichaam 10' in de tweede opening en 10d' een klemschroef voor het bevestigen van het capillair 1 aan het hoofdlichaam 10' in de derde opening.

De werking van de op deze wijze samengestelde inrichting wordt nu onder verwijzing naar de schematische voorstellingen van fig. 9 beschreven. Fig. 9(a) toont een toestand van de inrichting voordat het monster in het buisdeel 8 wordt geïnjecteerd. In deze toestand is schakelaar 14 uitgeschakeld en stroomt het oplosmiddel binnen het driewegverbindingsdeel 10' in de pijlrichting.

25 Wanneer het monster via de monsterklep S in het buisdeel 8 wordt geïnjecteerd, wordt dit tussen twee delen van het oplosmiddel opgesloten en vormt een band B zoals getoond in fig. 9(b), waarna het zich met de stroom van het oplosmiddel verplaatst. Wanneer de band B bij het inlaateinde van het capillair 1 aankomt, wordt de ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 in trilling gebracht om het monster, door in de richting naar het bovengenoemde inlaateinde uitgezonden ultrasone energie, onder dwang in het capillair 1 te injecteren (fig. 9(c)). Wanneer de hoeveelheid van het via de monsterklep S in het buisdeel 8 geïnjecteerde monster constant is en de snelheid van het zich in het buisdeel 8
 35 verplaatsende monster constant is, is de hoeveelheid van het in het capillair 1 ingebrachte monster evenredig met de grootte of frequentie van de aan de ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 aangelegde wisselspanning van de oscillator 13.

In het voorbeeld, in een toestand waarin de hoeveelheid van het
 40 via de monsterklep S in het buisdeel geïnjecteerde monster constant is

ingesteld en de stroomsnelheid van het door de pomp 7 toegevoerde oplosmiddel constant is ingesteld, wordt de hoeveelheid van het in het capillair 1 ingevoerde monster door het wijzigen van de grootte of frequentie van de aan de ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 aangelegde spanning gestuurd.

Nadat de band B de inlaat van het capillair 1 is gepasseerd (fig. 9(d)) wordt de aandrijving van de ultrasone piezoëlektrische omzetter 12 stop gezet en wordt schakelaar 14 ingeschakeld om aan de beide einden van het capillair een spanning aan te leggen. De rest van het monster dat niet in het capillair 1 is ingevoerd stroomt samen met het oplosmiddel door de uitstroombuis 11 weg.

Het op deze wijze in het capillair 1 ingevoerde monster wordt volgens het bovenbeschreven principe van de solubilisatiechromatografie gescheiden en met de detector 6 wordt een met de mate van oplosbaarheid van de componenten van het monster overeenkomend chromatogram verkregen. In dit uitvoeringsvoorbeeld wordt bovendien een uitwerking gelijk aan die in het voorgaande uitvoeringsvoorbeeld verkregen.

Conclusies

1. Solubilisatiechromatograaf, met het kenmerk, dat in deze solubilisatiechromatograaf een oplosmiddel bestaande uit een buffermengsel en geïoniseerde micellen door een capillair kan stromen waarvan de beide einden respectievelijk met de pluskant van een elektrische gelijkspanningsbron en met de minkant daarvan worden verbonden, waarna een monster in het capillair wordt ingevoerd; de componenten van het ingevoerde monster door een combinatie van het ontledingsverschijnsel van het monster in de bovengenoemde geïoniseerde micellen en capillaire elektroforese werking worden gescheiden, waarbij een kwalitatieve of kwantitatieve analyse van componenten van het monster wordt uitgevoerd, dat een driewegverbindingsdeel is aangebracht waarvan de eerste opening met het bovengenoemde capillair is verbonden, de tweede opening met een buisdeel voor het toevoeren van het bovengenoemde oplosmiddel en het monster is verbonden, en de als een uitstroomopening toegepaste derde opening aan de inlaatzijde van het capillair is aangebracht om de inlaat van het capillair in aanraking te brengen met een stroom van een oplossing bestaande uit het monster en het oplosmiddel en om de niet in het capillair ingevoerde oplossing door de bovengenoemde derde opening te laten uitstromen, waarbij de hoeveelheid van het in het capillair ingevoerde monster door middelen voor het wijzigen van de aanraaktijd van het capillair met het monster of door middelen voor het sturen van een hoeveelheid van het in het capillair gezogen monster wordt gestuurd.

2. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de aanraaktijd van de inlaat van het bovengenoemde capillair met het monster door het wijzigen van de stroomsnelheid van het bovengenoemde oplosmiddel wordt gewijzigd.

3. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de aanraaktijd van de inlaat van het bovengenoemde capillair met het monster door het wijzigen van de hoeveelheid van het in het bovengenoemde buisdeel geïnjecteerde monster wordt gewijzigd.

4. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de hoeveelheid van het in het capillair gezogen monster door het wijzigen van de grootte van de aan de beide einden van het capillair aangelegde spanning wordt gestuurd.

5. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de hoeveelheid van het in het capillair gezogen monster door het wijzigen van de duur van de aan de beide einden van het capillair aangelegde spanning wordt gestuurd.

8602393

6. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het ken-
merk, dat de hoeveelheid van het in het capillair gezogen monster door
het op het bovengenoemde driewegverbindingsdeel aanbrengen van een
ultrasone piezoëlektrische omzetter en door het wijzigen van de grootte
5 van de spanning die de ultrasone piezoëlektrische omzetter aandrijft
wordt gestuurd.

7. Solubilisatiechromatograaf volgens conclusie 1, met het ken-
merk, dat de hoeveelheid van het in het capillair gezogen monster door
het op het bovengenoemde driewegverbindingsdeel aanbrengen van een
10 ultrasone piezoëlektrische omzetter en door het wijzigen van de fre-
quentie van de wisselspanning die de ultrasone piezoëlektrische omzet-
ter aandrijft wordt gestuurd.

FIG.1

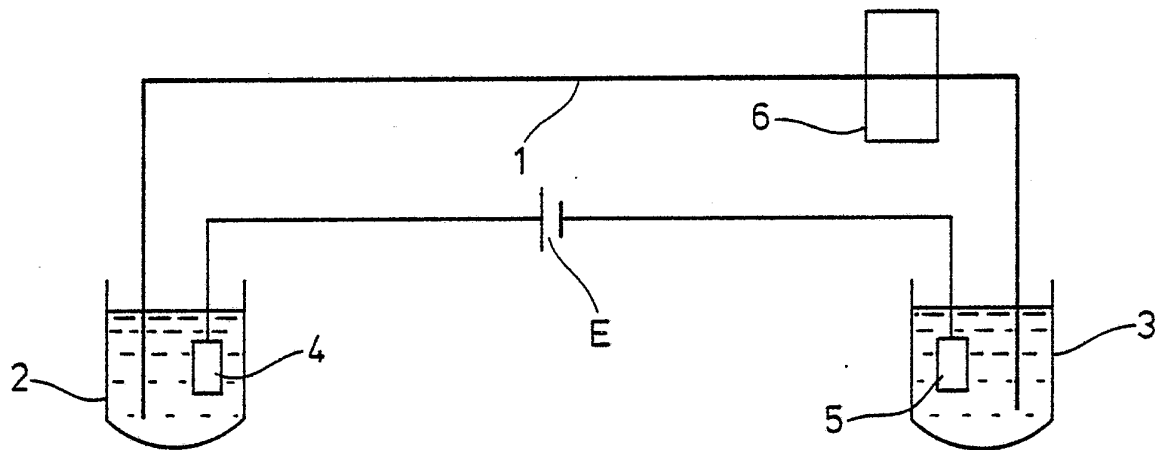


FIG.2

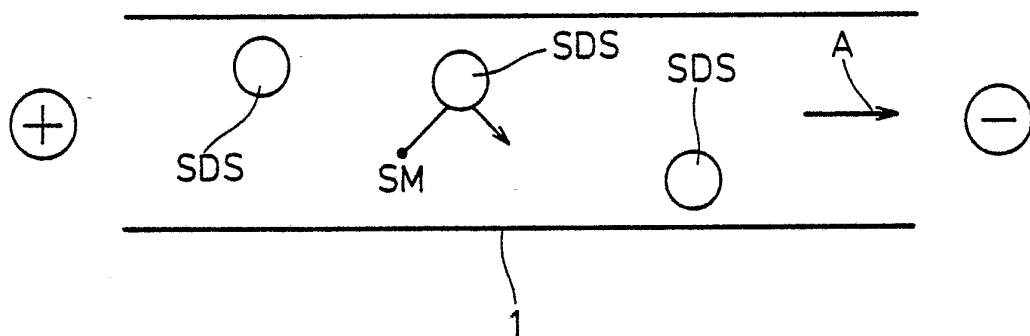


FIG. 3

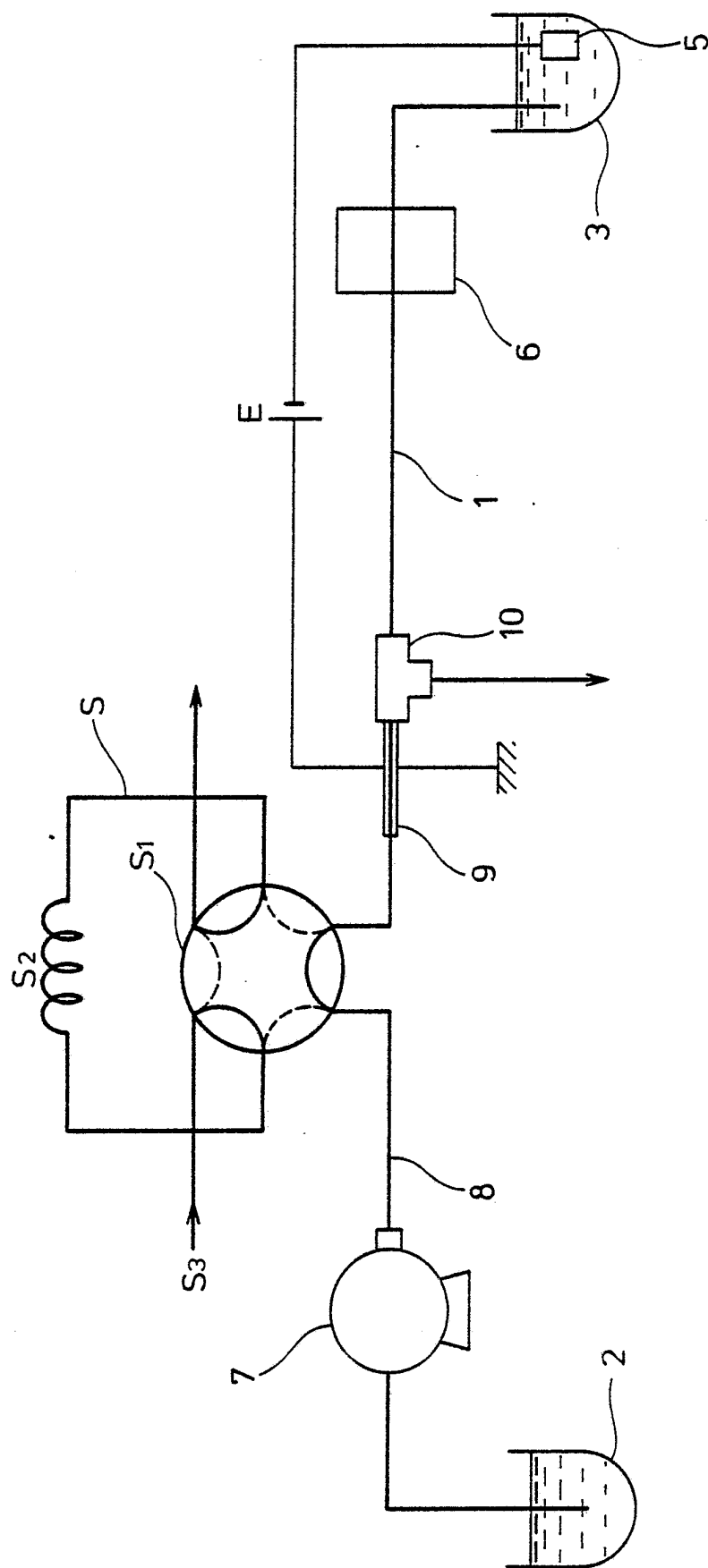


FIG. 4

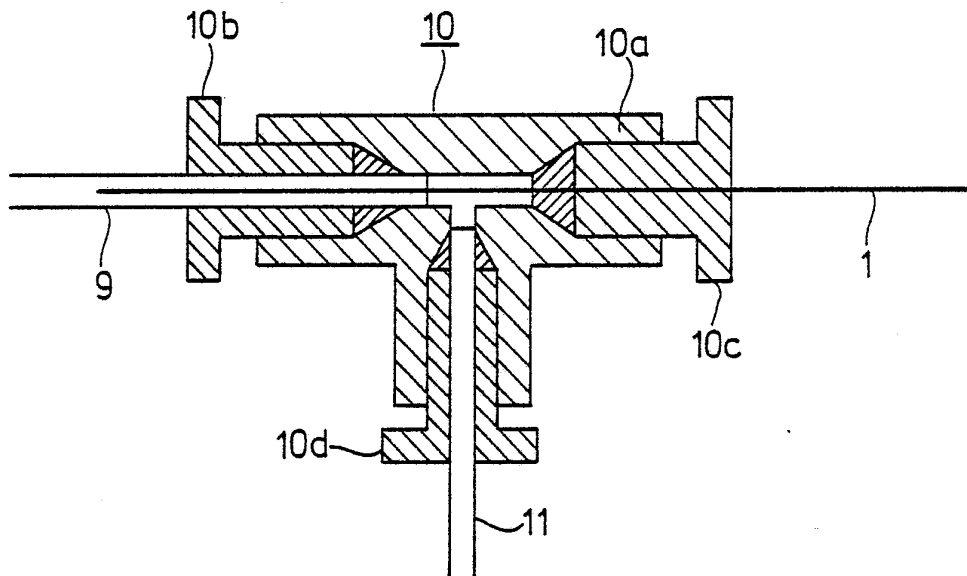


FIG. 8

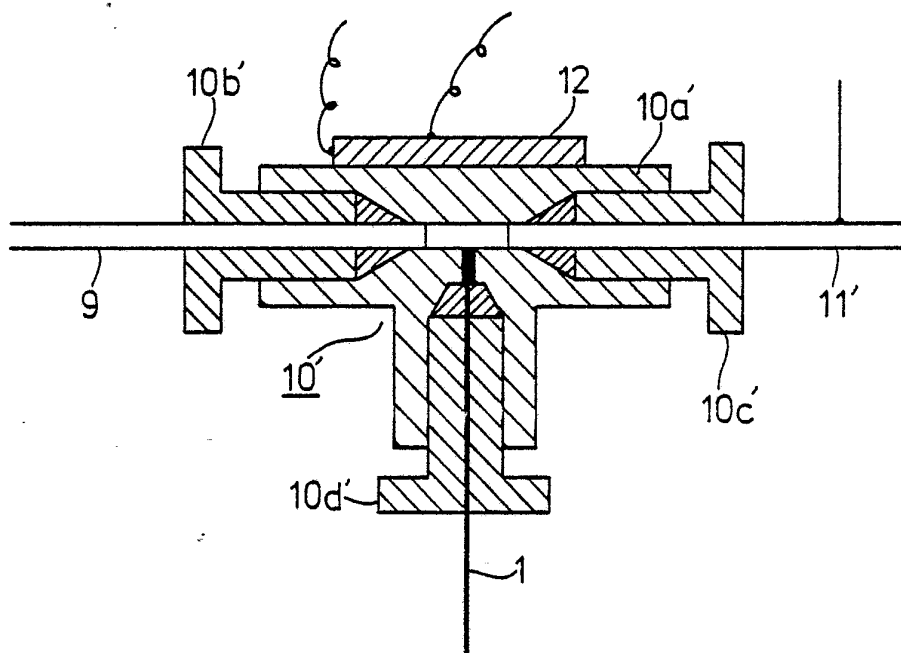


FIG.5(a)

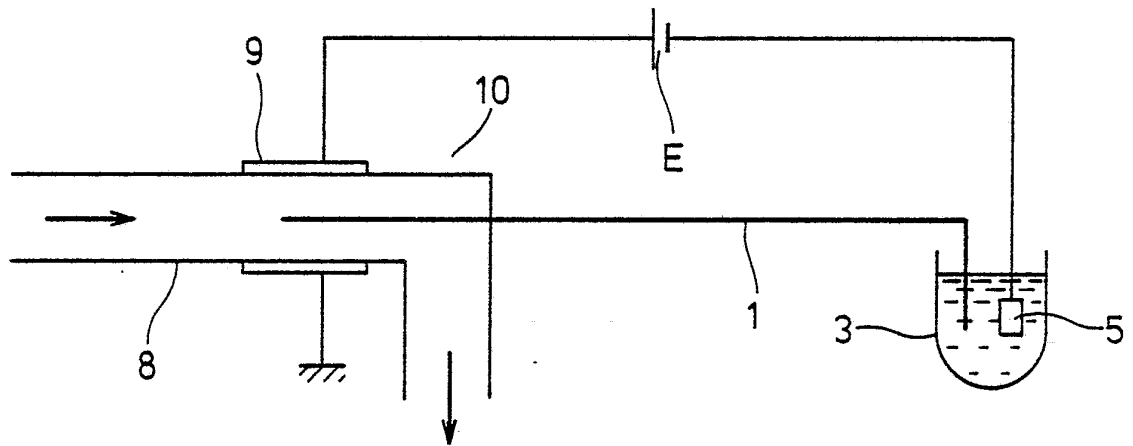


FIG.5(b)

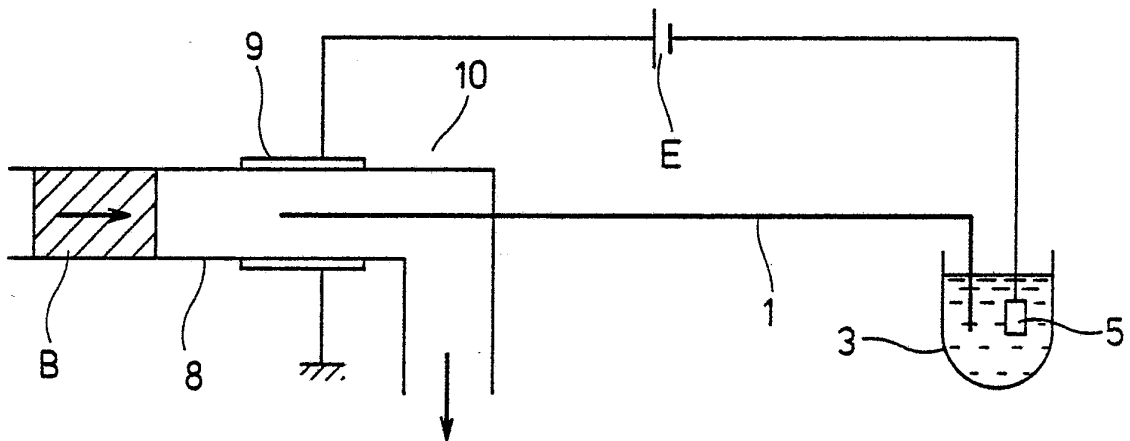


FIG.5(c)

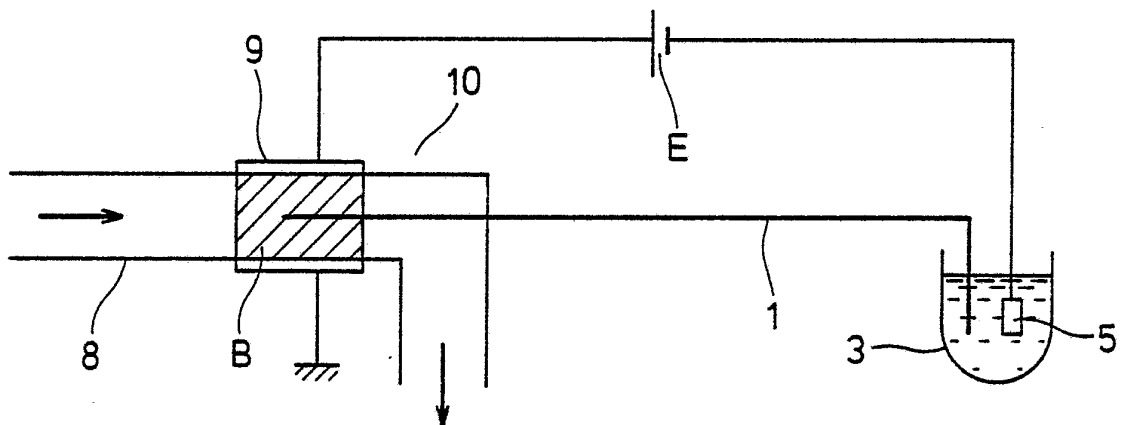


FIG. 6

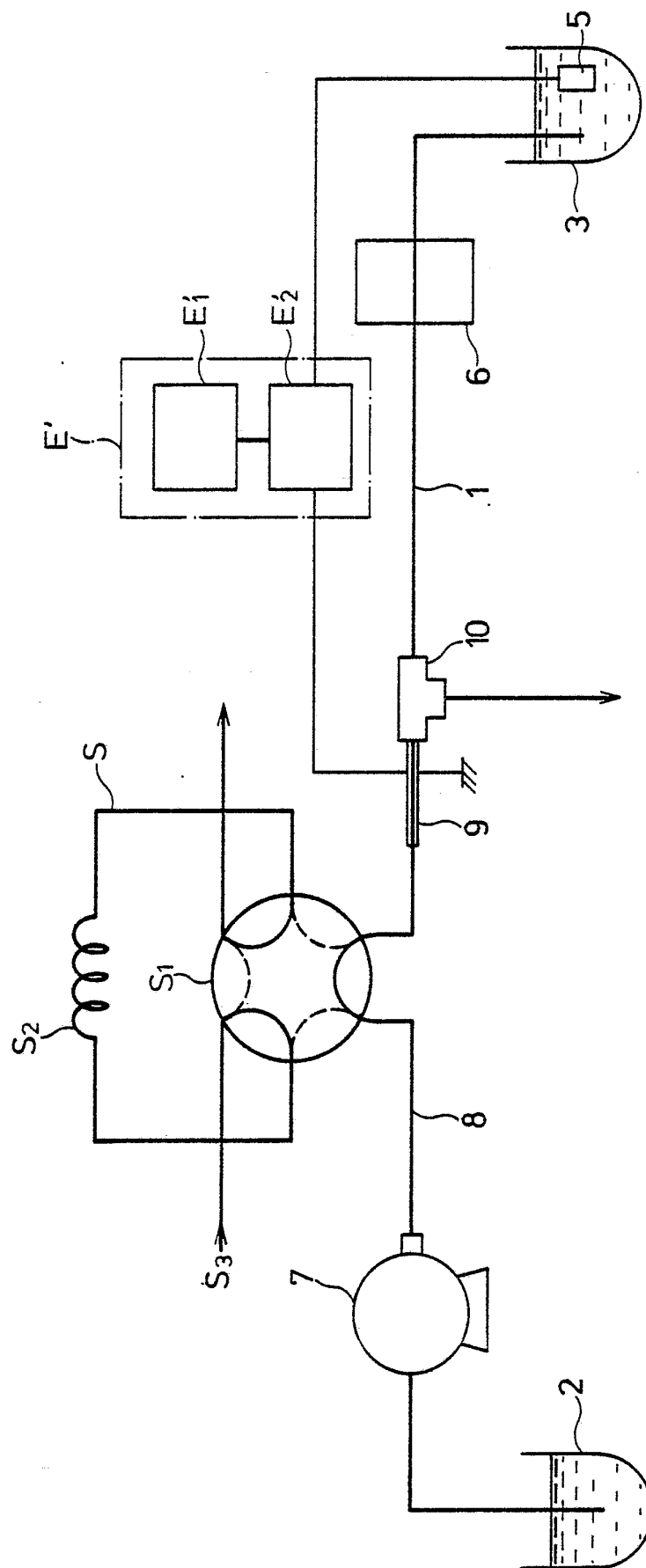


FIG. 7

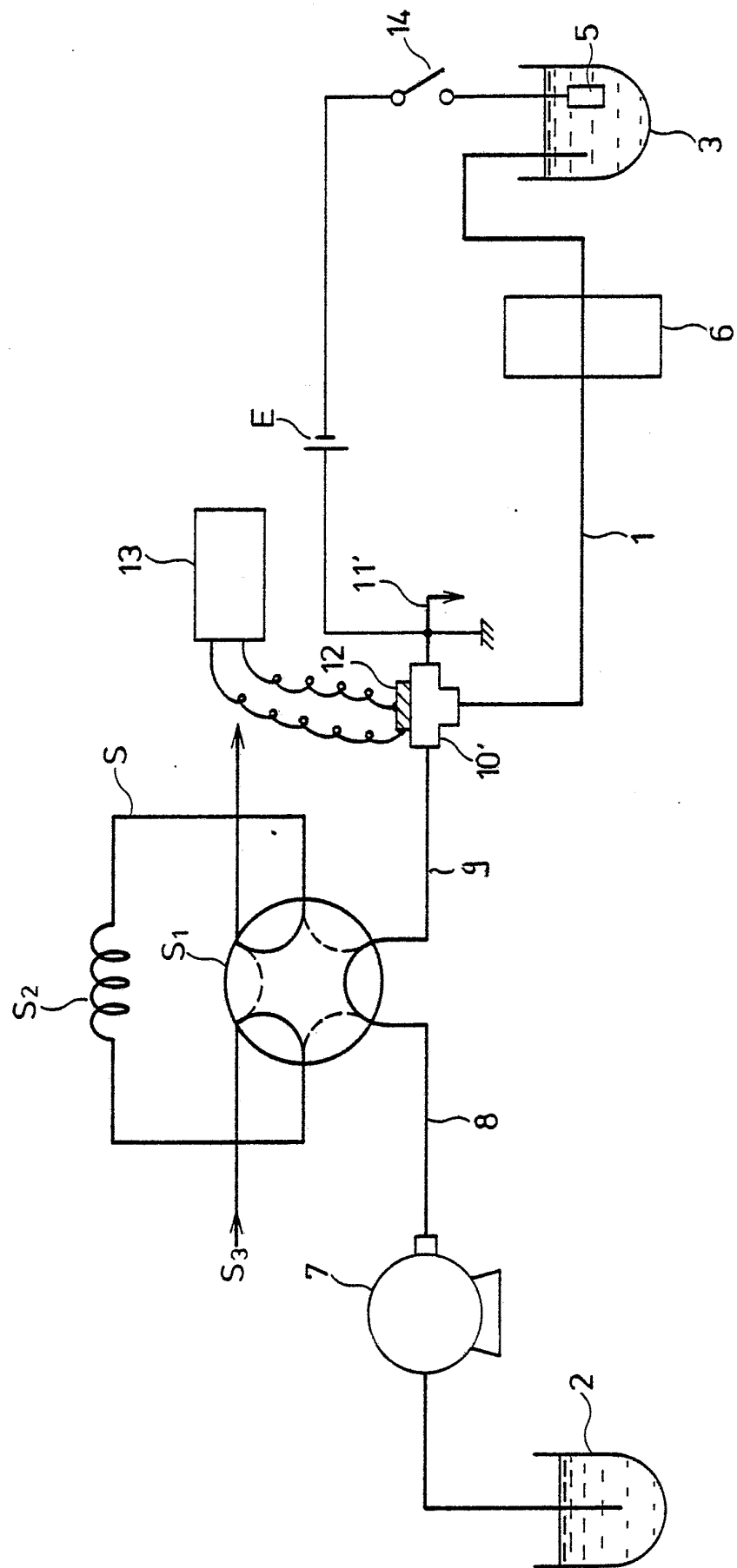


FIG.9 (a)

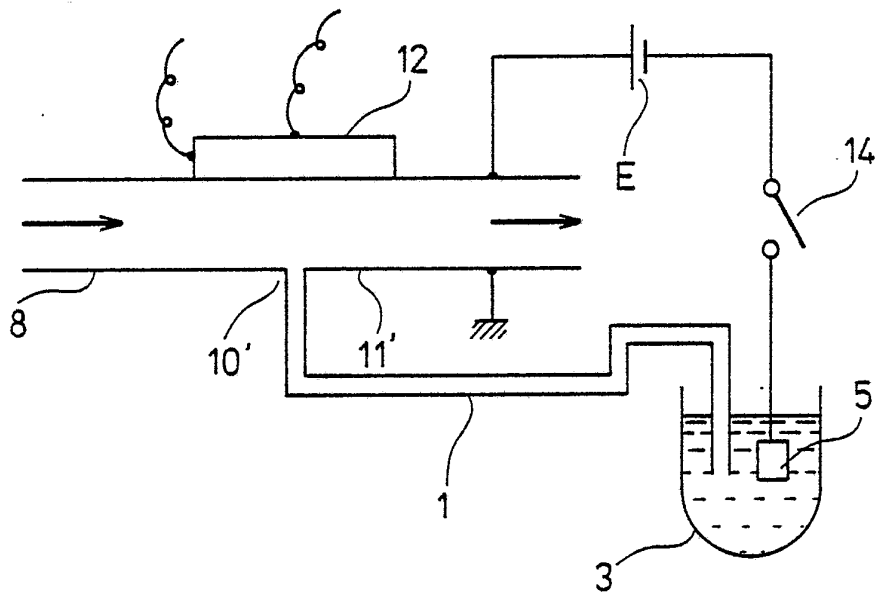


FIG.9 (b)

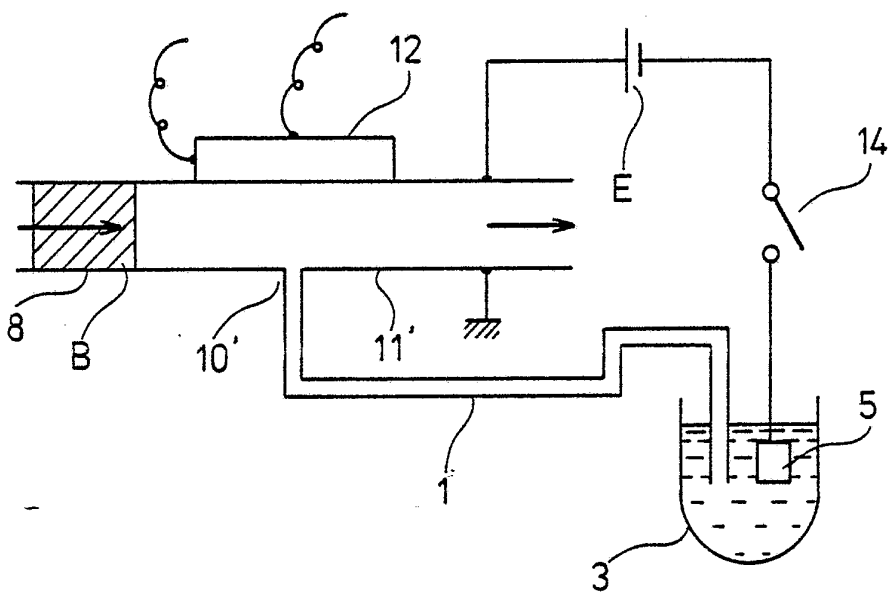


FIG. 9 (c)

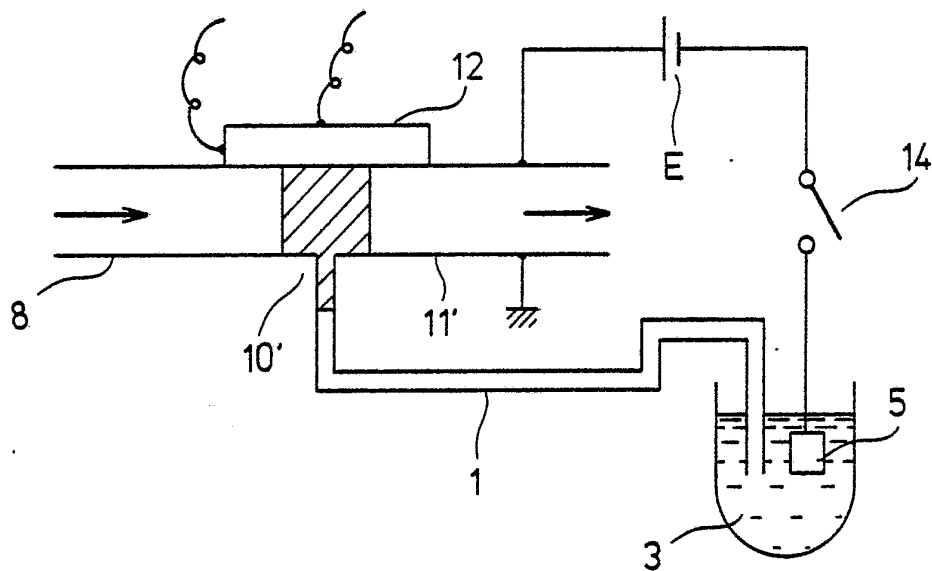


FIG. 9 (d)

