



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 650 863 A5

⑤① Int. Cl.4: G 01 N 27/26

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 3798/82

㉔ Date de dépôt: 21.06.1982

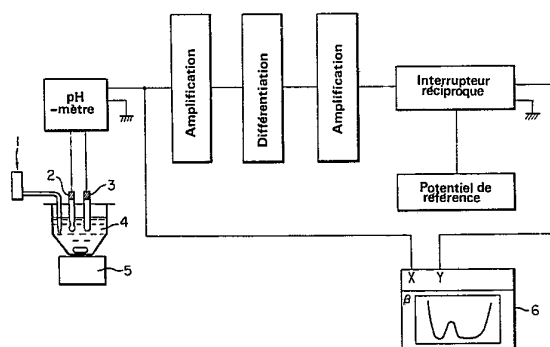
㉓ Priorité(s): 19.06.1981 JP 56-94879

㉒ Brevet délivré le: 15.08.1985

㉑ Fascicule du brevet
publié le: 15.08.1985㉒ Titulaire(s):
Rikagaku Kenkyusho, Wako-shi/Saitama-ken
(JP)㉒ Inventeur(s):
Tsuji, Keiichi, Toshima-ku/Tokyo (JP)㉒ Mandataire:
Kirker & Cie SA, Genève

⑤④ Procédé et appareil pour enregistrer des courbes de pouvoir tampon.

⑤⑦ Le procédé consiste à titrer la solution contenant de l'ionogène avec un acide ou une base forte (1), à obtenir par différenciation à partir du pH (2, 3) le pouvoir tampon β et à enregistrer β (6) en fonction du pH de la solution de manière à obtenir la courbe $\beta = f(\text{pH})$ de la solution.



REVENDECATIONS

1. Procédé pour obtenir une courbe de pouvoir tampon d'une solution échantillon contenant de l'ionogène, caractérisé en ce qu'il comprend

– la titration de la solution au moyen d'un acide fort ou d'une base forte qui est ajoutée avec un débit constant à la solution remuée,

– le traitement électrique du signal de sortie d'une électrode pH placée dans la solution au travers d'un circuit différenciateur pour obtenir un signal proportionnel à $d\text{pH}/dt$ et le traitement de ce dernier signal au travers d'un circuit formant la réciproque $dt/d\text{pH}$, et

– l'enregistrement automatique graphique du signal $dt/d\text{pH}$ par rapport au Ph de la solution pour obtenir la courbe de pouvoir tampon.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution est titrée après que son pH ait été ajusté à la valeur à partir de laquelle on souhaite enregistrer la courbe de pouvoir tampon prévue.

3. Appareil pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens contenant une solution échantillon contenant de l'ionogène, une électrode pH destinée à être introduite dans la solution échantillon et associée avec un dispositif de mesure de pH, des moyens pour introduire dans la solution échantillon un acide fort ou une base forte dans des conditions contrôlées, des moyens pour agiter la solution échantillon, des moyens pour traiter électriquement le changement continu du signal de sortie de cette électrode pH, signal créé lorsque ledit acide ou ladite base est introduite dans la solution échantillon, ces moyens de traitement comprenant un circuit différenciateur suivi d'un circuit formant la réciproque et étant adaptés à convertir le signal de sortie d'électrode en un signal proportionnel à $d\text{pH}/dt$, puis de convertir ce dernier signal en un signal proportionnel à $dt/d\text{pH}$; et des moyens pour enregistrer automatiquement graphiquement sur une surface le signal résultant proportionnel à $dt/d\text{pH}$ par rapport au pH de la solution échantillon, ce qui enregistre une courbe de pouvoir tampon de la solution échantillon.

La présente invention concerne un procédé de détermination du pouvoir tampon d'une solution contenant un ionogène et plus particulièrement pour enregistrer une courbe $\beta = f(\text{pH})$ d'une solution ionogène consistant à titrer cette solution avec un acide ou une base forte, à mesurer le pH, à convertir ce pH en pouvoir tampon (β) et à enregistrer ce pouvoir tampon en fonction du pH de la solution, ainsi qu'un appareillage qui permet de mettre en œuvre ce procédé.

Le terme ionogène décrit un électrolyte faible dont le pKa est situé entre 0 et 14 lorsque l'eau est utilisée comme solvant. Un ionogène est une substance susceptible de se dissocier en donnant des ions. Parmi les ionogènes citons: acides faibles, bases faibles, ampholytes (acides aminés, peptides, protéines), ainsi que certaines substances insolubles pouvant s'ioniser. Presque tous les matériaux de notre environnement, comme les fluides biologique et les aliments, contiennent des ionogènes.

D'un point de vue physico-chimique, un ionogène se dissocie par exemple comme suit:



La constante de dissociation à l'équilibre est désignée par le symbole K_a ,

$$K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-] / [\text{HA}] \quad (2)$$

2

les parenthèses signifiant que les composés sont donnés en concentration ou en activité. La grandeur pKa est définie comme suit:

$$pK_a = -\log K_a \quad (3)$$

Dans le cas d'une base, la dissociation s'écrit:



Les pKa des ionogènes se situent dans un intervalle de 0 à 14. Les valeurs de pKa de composés appartiennent à une classe spécifique de composés, par exemple les composés carboxylés, se situent dans un intervalle plus ou moins large suivant leur nature.

Une des caractéristiques d'un ionogène en solution est sa tendance à contrecarrer le changement de pH lorsqu'une base forte ou un acide fort est ajouté, cette tendance étant plus particulièrement marquée lorsque le pH se situe entre la valeur $pK_a - 1$ et la valeur $pK_a + 1$. Par exemple, lorsque 1 ml de NaOH 1N est ajouté à 1 L d'eau pure ($\text{pH} = 7$) le pH augmente immédiatement à 11. Par contre, si la même quantité de NaOH est ajoutée à 1 L d'imidazole ($pK_a = 6,95$) 0,1 M dont environ la moitié a été neutralisée avec HCl ($\text{pH} = 7$), l'augmentation de pH est seulement de 0,02 environ. Le phénomène est dénommé «effet tampon» et une solution exhibant cet effet tampon est une «solution tampon». Ces solutions ont de très nombreux usages.

Le mécanisme par lequel s'exerce l'effet tampon est bien établi et l'on peut calculer le pouvoir tampon à partir des valeurs pKa, des concentrations et d'autres paramètres. Ce pouvoir tampon est défini comme suit:

$$\beta = dB/d\text{pH} \quad (5)$$

où B est la concentration de base forte ajoutée (ég. -gr/L).

Lorsque le pH est égal au pKa, β est à son maximum.

Pour un monoacide, ce maximum est donné par la relation:

$$\beta = 0,576 C_A \quad (6)$$

où C_A est la concentration de l'acide. Lorsque le pH de la solution s'éloigne de la valeur du pKa, β diminue. Par exemple β sera égal au dixième de sa valeur maxima lorsque $\text{pH} = pK_a \pm 1$, et au centième de sa valeur maxima lorsque $\text{pH} = pK_a \pm 2$. Dans le cas d'un polyacide, la situation est similaire, toutefois les calculs sont plus compliqués.

La valeur β est proportionnelle à C_A et la courbe $\beta = f(\text{pH})$ présente un maximum dont la position dépend du pKa de l'ionogène. Les figures 1 (a) – (g) montrent des exemples de courbes $\beta = f(\text{pH})$ de divers acides (0,05 M). Ces courbes ont été établies par calcul. Les figures montrent que les valeurs de β augmentent considérablement lorsque le pH est inférieur à 2 ou supérieur à 12. Ceci est dû au pouvoir tampon du solvant eau qui est un ampholyte. Pour cette raison, il est généralement difficile de déterminer le pouvoir tampon β d'un soluté aux valeurs extrêmes de pH et l'on se limite généralement à la mesure du pouvoir tampon de solutions ionogènes de concentration moyenne au domaine de pH situé approximativement entre 2 et 12. Ce pouvoir tampon est non seulement proportionnel à C , mais présente aussi un caractère additif lorsque la solution est un mélange. La loi $\beta = f(\text{pH})$ présente une certaine similarité avec le spectre d'absorption pour lesquels s'applique la loi de BEER-LAMBERT. Le pH correspondrait à la longueur d'onde et β à l'absorption.

En dépit de ces caractéristiques, l'utilisation des courbes $\beta = f(\text{pH})$ dans un but analytique a été peu fréquente, une des raisons en est l'absence d'une technique simple et commode

permettant de mesurer la valeur β d'une solution. Naturellement, il est possible de déduire la valeur β de la courbe conventionnelle représentant le pH en fonction du volume d'acide ou de base ajouté, puisque β est l'inverse de la pente de la courbe de titration. Cependant le travail serait tel, qu'il est impossible d'utiliser ce procédé pour des analyses de routine. Les calculatrices modernes pourraient faciliter ce travail, mais ceci demande beaucoup de préparation et un équipement important.

L'auteur de la présente invention avait entrepris des recherches pour obtenir des courbes $\beta = f(\text{pH})$ avec un équipement aussi simple que celui utilisé pour les titrations automatiques et il y est parvenu. Dans la présente description, l'expression «titration du pouvoir tampon» s'applique à la titration d'une solution contenant un ionogène avec un acide ou une base forte avec enregistrement simultané d'une courbe $\beta = f(\text{pH})$.

On peut imaginer diverses méthodes pour enregistrer des courbes $\beta = f(\text{pH})$, la plus simple en théorie consisterait à enregistrer sous forme de données numériques le pH en fonction du volume de réactif ajouté, puis à calculer la courbe $\beta = f(\text{pH})$ à partir de ces données. Cette méthode peu originale dans son principe requiert beaucoup de préparation et un équipement important, du moins actuellement.

Au lieu de procéder ainsi, nous avons développé une autre méthode qui permet d'obtenir aisément la courbe $\beta = f(\text{pH})$. Ce procédé consiste à titrer la solution par addition d'acide fort ou de base forte avec un débit constant la solution étant remuée et à détecter le changement de pH comme changement de signal électrique; un circuit de différenciation et un circuit d'inversion permettent d'obtenir l'inverse de la vitesse de changement du signal. Cette grandeur $dt/d\text{pH}$, donc proportionnelle à $\beta = dB/d\text{pH}$ lorsque ledit débit est constant, est enregistrée en fonction du pH. Les bases théoriques de la présente invention sont les suivantes:

Lorsqu'une solution d'acide faible (ou une base faible sous sa forme protonique) de concentration C_A est titrée par une solution d'une base de concentration C_B , nous pouvons écrire:

$$C_a = [\text{HA}] + [\text{A}^-] = C_A V / (V + v) \quad (1)$$

$$C_b = [\text{M}^+] = C_B v / (V + v) \quad (2)$$

$$[\text{M}^+] + [\text{H}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{A}^-] \quad (3)$$

$$\frac{dt}{d\text{pH}} = \frac{2,303V}{C_B r} \left\{ \frac{C_A K_a [\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} + \frac{V + v}{V} ([\text{H}^+] + [\text{OH}^-]) \right\} \quad (11)$$

Le pouvoir tampon de la solution β i avant titration est donné par la relation théorique suivante:

$$\beta_i = 2,303 \left\{ \frac{C_A K_a [\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} + [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] \right\} \quad (12)$$

donc:

$$\frac{dt}{d\text{pH}} = \frac{V}{C_B r} \left\{ \beta_i + 2,303 \times \frac{v}{V} ([\text{H}^+] + [\text{OH}^-]) \right\} \quad (13)$$

Ainsi, la quantité $dt/d\text{pH}$ est proportionnelle d'une part au pouvoir tampon initial β_i et d'autre part au volume de ba-

où C_a et C_b sont les concentrations de l'acide et de la base ajoutée à la solution. V est le volume initial de la solution et v le volume de base ajouté. Des relations précédentes il résulte que:

$$[\text{A}^-] = C_B v / (V + v) + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \quad (4)$$

Si nous introduisons le coefficient de dissociation $\alpha = [\text{A}^-] / ([\text{HA}] + [\text{A}^-])$ nous obtenons la relation suivante, dans laquelle n_A et n_B sont les quantités d'acide titré et de base ajoutée en moles:

$$n_B = n_A + (V + v) ([\text{OH}^-] - [\text{H}^+]) \quad (5)$$

Etant donné que le coefficient de dissociation est lié à la constante de dissociation par la relation:

$$K_a = [\text{H}^+] \alpha / (1 - \alpha) \quad (6)$$

L'équation 5 devient:

$$n_B = \frac{K_a n_A}{K_a + [\text{H}^+]} + (V + v) ([\text{OH}^-] - [\text{H}^+]) \quad (7)$$

En dérivant par rapport au pH la relation (7) devient:

$$\frac{dn_B}{d\text{pH}} = \frac{dn_B}{d[\text{H}^+]} \times \frac{d[\text{H}^+]}{d\text{pH}} = 2,303 \left\{ \frac{n_A K_a [\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} + (V + v) ([\text{H}^+] + [\text{OH}^-]) \right\} \quad (8)$$

Etant donné que la base est introduite à une vitesse constante r ($\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et que

$$n_B = C_B r t \quad (9)$$

où t est le temps en secondes, on a:

$$\frac{dn_B}{d\text{pH}} = \frac{dn_B}{dt} \times \frac{dt}{d\text{pH}} = C_B r \times \frac{dt}{d\text{pH}} \quad (10)$$

se ajouté. Le deuxième terme n'est important qu'aux valeurs extrêmes de pH et peut être négligé quand une concentration adéquate de soude est utilisée. Si cela est nécessaire, on peut dans une certaine mesure éliminer le second terme en soustrayant les résultats obtenus dans un essai à blanc. En conséquence de ce qui précède, le pH peut être utilisé pour l'obtention d'une courbe $\beta = f(\text{pH})$, courbe qui permet de connaître les ionogènes d'une solution.

Il existe une autre méthode pour connaître les ionogènes d'une solution au moyen d'une courbe $\beta = f(\text{pH})$. Elle consiste à titrer avec une base forte, la quantité ajoutée Δv étant telle que le pH augmente d'une certaine valeur ΔpH , par exemple 0,1. On obtient alors un signal électrique proportionnel à Δv ,

ce qui permet de calculer $\Delta V/\Delta \text{pH}$ et enregistrer cette valeur en fonction du pH. Dans cette méthode, les équations (1) à (8) continuent de s'appliquer. Ensuite, puisque $n_B = C_B v$:

$$\frac{dn_B}{dpH} = \frac{dn_B}{dv} \times \frac{dv}{dpH} = C_B \times \frac{dv}{dpH} \quad (14)$$

par conséquent:

$$\begin{aligned} \frac{dv}{dpH} &= \frac{2,303}{C_B} \left\{ \frac{C_A K_a [H^+]}{(K_a [H^+])^2} + \frac{V + v}{V} ([H^+] + [OH^-]) \right\} \\ &= \frac{V}{C_B} \left\{ \beta i + 2,303 \times \frac{v}{V} ([H^+] + [OH^-]) \right\} \end{aligned} \quad (15)$$

Bien que Δv et ΔpH soient des valeurs finies, si elles sont suffisamment petites, on obtient une courbe β tout à fait correcte. Toutefois, si ces valeurs sont trop faibles des fluctuations peuvent surgir, conduisant à des erreurs. Elles devront être choisies expérimentalement de manière à être aussi petites que possible.

Les courbes $\beta = f(\text{pH})$ sont tracées en même temps que s'effectue la titration, et ceci au moyen d'un équipement électronique approprié.

Il est à prévoir que la méthode de caractérisation des ionogènes faisant l'objet de la présente invention trouvera de nombreuses applications industrielles et scientifiques. Des modes de mise en œuvre de l'invention seront décrits dans le texte à l'aide des figures de dessin annexées:

La figure 1 représente les courbes calculées $\beta = f(\text{pH})$ d'un certain nombre d'acides,

La figure 2 est une représentation schématique de l'appareillage selon la présente invention permettant d'obtenir des courbes $\beta = f(\text{pH})$,

La figure 3 est une représentation schématique d'un appareillage permettant d'obtenir des courbes $\beta = f(\text{pH})$ au moyen d'une calculatrice,

La figure 4 représente des courbes $\beta = f(\text{pH})$ calculées et obtenues expérimentalement: elles sont très voisines,

Les figures 5 (a) et (b) représentent des courbes de titration et des courbes $\beta = f(\text{pH})$ de jus de chou chinois salé après différents temps de fermentation,

Les figures 6 (a) et (b) représentent des courbes de titration de jus de chou chinois fermenté et d'acide lactique,

Les figures 7 à 19 représentent les courbes $\beta = f(\text{pH})$ de divers produits comestibles: figure 7 (a): thé vert, (b): thé chauffé, (c): thé noir, figure 8 (a): vinaigre, (b): acide acétique et Tris-ClH, figure 9: boisson commerciale à base d'acides aminés, figure 10 (a): assaisonnement d'origine chimique, (b): acide glutamique, figure 11 (a): saké japonais, (b): vin, figure 12 (a): café, (b): café soluble, figure 13: jus de pamplemousse, figure 14: jus de citron, figure 15: jus d'orange, figure 16: jus de pomme, figure 17: jus de raisin, figure 18: jus d'ananas, figure 19 (a): sauce de soja, (b): courbe calculée à partir de la composition en acides aminés de la sauce de soja.

La figure 20 représente la courbe $\beta = f(\text{pH})$ d'un extrait aqueux d'un terreau provenant de la fermentation de paille de riz et les figures 21 (a), (b) et (c) représentent les courbes $\beta = f(\text{pH})$ d'urine.

Dans les figures 2 et 3, les éléments 1 à 6 représentent une burette, une électrode de verre, une électrode de référence, un agitateur, et un enregistreur X-Y.

Comme nous l'avons déjà indiqué, les ionogènes sont largement distribués dans notre environnement. En particulier, la majorité des aliments sont des mélanges où sont présents des acides organiques, des bases organiques, des acides ami-

nés, des protéines etc, dont dépend le goût, la valeur nutritive, la valeur commerciale, etc.

Le procédé fournit une courbe dont le profil dépend des ionogènes présents dans l'échantillon. De ce point de vue, le procédé constitue un nouveau moyen d'identification. Un avantage de procédé est qu'il ne requiert pas, comme c'est le cas dans la majorité des analyses chimiques conventionnelles de traitement préalable pouvant causer une perte de substance ionogène. Bien qu'il soit possible d'utiliser le procédé pour des analyses qualitatives et quantitatives en mesurant la position et la hauteur des pics, le but de ce procédé est plutôt de caractériser un mélange d'ionogènes dans un milieu complexe.

On peut lors de la détermination du pouvoir tampon ajouter un acide fort ou une base forte à un échantillon de la solution de manière à ce que le pH se situe dans la région à partir de laquelle on envisage d'enregistrer les courbes $\beta = f(\text{pH})$. Ainsi, il est possible d'enregistrer les courbes $\beta = f(\text{pH})$ dans le domaine allant de 2 à 12.

Un exemple d'appareillage pour enregistrer les courbes $\beta = f(\text{pH})$ suivant les principes énoncés plus haut sera maintenant décrit de façon détaillée.

Suivant le schéma de fonctionnement représenté sur la figure 2, la différence de potentiel entre l'électrode de verre et l'électrode de référence est amplifiée pour alimenter un circuit de différenciation. Le signal à la sortie de ce circuit est proportionnel à dE/dt . Ce signal est amplifié et converti en un signal proportionnel à dt/dE (i.e. inverse de dE/dt) au moyen d'un circuit diviseur - multiplicateur. Etant donné que dE est proportionnel à dpH , dt/dE est proportionnel à dt/dpH . Ce signal alimente l'entrée Y d'un enregistreur X-Y, l'entrée X est reliée au pH-mètre. L'enregistrement de la courbe $\beta = f(\text{pH})$ commence au moment de la mise en route de la burette. Le pH se trouve en abscisses et le pouvoir tampon en ordonnées.

Cet appareillage peut être constitué de façon économique et sous une forme compacte à partir d'éléments existant dans le commerce. Il peut présenter toutefois les inconvénients suivants: compte tenu de la manière dont la dérivation par rapport au temps s'effectue, l'appareillage peut ne pas convenir dans les cas où le temps de réaction est long, par exemple avec certaines suspensions ou certains milieux non-aqueux. Aussi, le bruit de fond peut être important si la solution titrante n'est pas répartie rapidement de façon homogène dans la solution en faisant évoluer le pH de façon progressive.

Toutefois, les inconvénients énumérés ci-dessus peuvent être considérablement réduits ou éliminés par diverses améliorations techniques, par exemple en améliorant le système de mélange de la solution, en diminuant la vitesse d'introduction du réactif ou enfin en contrôlant l'addition de réactif au moyen d'une calculatrice.

Un générateur de fonctions a été utilisé pour vérifier que l'appareillage fonctionnait normalement. Il a été trouvé que les relations (14) et (15) sont satisfaites, ce qui permet d'enregistrer les courbes $\beta = f(\text{pH})$ d'échantillons de diverses concentrations et volumes.

En outre, il est possible de donner aux courbes un aspect régulier et supprimer le bruit de fond en enregistrant et transformant le signal au moyen d'une calculatrice numérique au lieu d'un circuit analogique. Un appareillage utilisant ce principe est représenté schématiquement sur la figure 3. L'équipement de titration est le même que celui de la figure 2.

Au point (a) de la figure 3, une quantité choisie de solution titrante (par exemple 10 μl) est ajoutée au moyen de la burette. Après une durée de temps t (par exemple 1 s) qui permet à la solution de devenir à nouveau homogène, le signal du pH-mètre est enregistré sous forme numérique dans la mé-

moire 1. Le signal suivant est enregistré dans la mémoire II. La valeur

$$\frac{\text{volume de solution titrante}}{(\text{mémoire II}) - (\text{mémoire I})}$$

est alors calculée et enregistrée sous forme numérique dans la mémoire A. Dans la phase suivante, la troisième valeur de pH est enregistrée dans la mémoire II, tandis que le second pH est transféré de la mémoire II à la mémoire I. Le résultat du calcul est enregistré dans la mémoire B. L'opération se trouve ainsi répétée. Les valeurs enregistrées dans les mémoires A, B, etc, sont converties en signal électrique. Ce signal est envoyé sur l'entrée Y de l'enregistreur X-Y. Le signal électrique du pH-mètre est envoyé sur l'entrée X.

Dans la méthode analogique on enregistre la valeur dt/d pH, tandis que dans la méthode numérique on enregistre la valeur dv/d pH. La méthode numérique permet donc de tracer les courbes $\beta = f(\text{pH})$ lorsque la réponse du système est lente. On peut par ailleurs arrondir la forme des courbes par un traitement des données enregistrées dans les mémoires A, B, ... On peut enfin élargir le domaine de mesure aux valeurs extrêmes de pH par soustraction des valeurs β obtenues dans un essai à blanc (i.e. sans ionogène). Il est préférable d'asservir le temps t à la valeur dv/d pH afin de ne pas allonger inutilement la durée d'enregistrement. Ceci ne présente pas de difficulté technique particulière.

Toutefois, il est inévitable que de tels appareillages ne deviennent encombrants et coûteux.

Les appareillages que nous avons décrits sont surtout destinés à la mesure de pouvoir tampon. Ils peuvent cependant avoir d'autres applications. La mesure du pouvoir tampon est basée sur l'équation d'Henderson:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{sel}]}{[\text{acide}]}$$

et sur la conversion du pH en potentiel électrique au moyen de l'électrode de verre. Dans le cas d'un système redox, où l'électrode de mesure est constituée d'un matériau inerte comme le platine, le potentiel est donné par l'équation:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{[\text{forme oxydée}]}{[\text{forme réduite}]}$$

$$= E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{forme oxydée}]}{[\text{forme réduite}]}$$

où n est le nombre d'électrons. Le pH et le potentiel redox sont donnés par des relations similaires. En d'autres termes, il est possible de définir un pouvoir tampon redox comme il a été possible de définir un pouvoir tampon pH. Il convient donc de noter que l'appareillage peut aussi être utilisé pour des investigations sur des systèmes redox complexes, par exemple sur des matériaux biologiques.

La présente invention sera rendue plus explicite par des exemples concrets d'utilisation, exemples qui ne limitent nullement le champ d'application de l'invention.

L'appareillage utilisé est celui représenté schématiquement sur la figure 2.

pH-mètre utilisé: modèle HM-5A, fabriqué par Toa Electric Wave Co., Ltd.

Enregistreur utilisé: modèle D8-CP, fabriqué par Riken Electronics.

La titration était faite au moyen de soude 1,00 N intro-

duite à une vitesse constante, voisine de 10 $\mu\text{l/sec}$. La solution était agitée au moyen d'un barreau magnétique (tournant à 1300 tours/min environ) et elle était maintenue dans un bain-marie à 25 °C.

La figure 4 représente les courbes $\beta = f(\text{pH})$ (théorique (i.e. calculée) et mesurée d'une solution connue. La solution contenait 0,053 M/L de chlorure de Tris (i.e. tri(hydroxyméthyl)-aminométhane) dont le pKa est 8,06 et 0,053 M/L d'acide acétique (pKa = 4,76). Une petite quantité d'acide chlorhydrique était ajoutée à la solution de manière à ce que le pH fût inférieur à 2, ce qui permet d'obtenir la courbe dans la région de bas pH. La figure 4 montre que les deux courbes sont tout à fait analogues.

Maintenant nous allons montrer par des exemples comment les courbes $\beta = f(\text{pH})$ peuvent être utilisées pour juger de la qualité de produits alimentaires et similaires.

Processus de vieillissement de chou chinois conservé dans de la saumure

Dans ce premier exemple, nous examinons l'évolution des composantes et du goût d'un légume conservé dans de la saumure en fonction de l'évolution des courbes $\beta = f(\text{pH})$ déterminées suivant le procédé de la présente invention. Nous examinons aussi les différences qui existent entre cette méthode et les méthodes conventionnelles de mesure de pH et d'acidité actuellement utilisées pour les contrôles de qualité et nous comparons les avantages respectifs.

500 g de chou chinois ont été découpés en lamelles de 7 mm de diamètre et mélangés avec 20 g de chlorure de sodium. Le mélange a été tassé dans un récipient prévu pour cet usage et acheté dans le commerce. Le récipient et son contenu ont été ensuite laissés à température ambiante. La concentration saline était celle utilisée pour mariner le chou chinois en une nuit. Selon la littérature, les changements qui s'opèrent en cours de fermentation d'un légume en milieu salin sont complexes. On peut les résumer comme suit: dans un premier temps, ce sont des bactéries aérobies (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Escherichia coli* et divers *Bacillus*) qui se développent. Au bout de quelques jours, ce sont des bactéries productrices d'acide lactique (*Leuc. mesenteroides*, *Sc. faecalis*, *Pediococcus*) qui commencent à se propager. La croissance des bactéries aérobies est ralentie par la diminution du pH. Elle cesse complètement lorsqu'un certain niveau d'acide lactique est atteint. Finalement, la flore lactique se modifie avec la prolifération de *L. plantarum* ou *L. brevis* (voir «Shokuhin Biseibutsugaku (microbiologie alimentaire)» écrit par Yoshii, Kaneko et Yamaguchi, publié par Gihodo en 1980). Naturellement, des acides autres que l'acide lactique peuvent se former aussi pendant la fermentation: c'est ainsi que divers acides gras ont été mis en évidence dans des légumes salés. (Takanami et col., Bull. Foods Industry, Japan, 25, 9 (1978)). Lorsqu'un légume est tassé avec du sel, l'eau suinte. La quantité de liquide produite est approximativement égale à la quantité d'eau qui reste à l'intérieur du légume. 20 ml de liquide ont été prélevés après 3, 5, 6 et 8 jours de fermentation et soumis à une titration de pouvoir tampon selon le procédé de la présente invention. Nous avons aussi mesuré le pH et titré l'acidité.

Les courbes $\beta = f(\text{pH})$ obtenues sont représentées sur la figure 5 (b). Elles présentent les caractéristiques suivantes:

- (1) Une région à fort pouvoir tampon à un pH voisin de 3,8
- (2) Une région à fort pouvoir tampon à un pH voisin de 9,5
- (3) Une région à faible pouvoir tampon à un pH voisin de 7.

Le pouvoir tampon dans ces trois régions augmente considérablement avec le temps.

On peut calculer le pouvoir tampon à partir de la courbe obtenue avec la solution étalon Tris – acide acétique. On obtient pour valeur de β dans les régions (1) et (2) après 8 jours environ 0,032. Si on admet que le pouvoir tampon dans chacune de ces deux régions est dû à un seul ionogène, la quantité de chacun des deux ionogènes serait de 0,056 M/L. Si on admet en outre que le pouvoir tampon de la région (1) est dû à l'acide lactique, sa concentration est d'environ 0,5% (poids moléculaire de l'acide lactique, 90,1). Par contre, aucune mention n'est faite dans la littérature d'un produit qui pourrait être responsable du pouvoir tampon dans la région (2).

Etant donné l'emplacement de ce pic (pH 9,5), le composé qui est à son origine pourrait être (a) un acide aminé (groupe NH_2), (b) un composé aromatique hétérocyclique (groupe OH), (c) un phénol, (d) une purine, (e) un composé hétérocyclique saturé renfermant de l'azote, ou (f) une amine à chaîne longue. Compte tenu de la composition de légume et de son évolution pendant la fermentation, c'est le composé (a) qui est le plus probablement responsable du pic à pH 9,5. Puisque le pouvoir tampon à pH 3 n'est pas plus élevé qu'à pH 9,5, on peut en déduire que les groupements carbocycliques appartiennent à des acides organiques sont moins nombreux que ceux appartenant à des acides aminés. Ce type d'information ne peut être fourni par les mesures acidimétriques conventionnelles: il faut avoir recours à des méthodes plus longues et plus complexes comme la séparation par chromatographie. La chromatographie ne permet toutefois pas d'obtenir un profil de distribution des ionogènes comme celui fourni par la titration du pouvoir tampon. Il faut noter que cette information n'a jamais été obtenue par une méthode conventionnelle (i.e. mesure de pH, acidimétrie); c'est le procédé de la présente invention qui a permis de l'obtenir pour la première fois.

En outre, aucune mention n'est faite dans la littérature du composé présentant un effet tampon modéré dans la région (3) i.e. voisine de 7. Il est possible que ce composé soit l'histidine ou un autre dérivé de l'imidazole, ou enfin un ester de l'acide phosphorique.

La caractéristique essentielle du procédé de la présente invention est qu'elle permet de voir d'un coup d'œil la distribution des ionogènes d'une solution en fonction de leur pKa, bien qu'il faille recourir aux techniques chimiques pour identifier les composés responsables des différents pics.

Pour ce qui est de la relation entre le goût et le profil des courbes $\beta = f(\text{pH})$, on constate qu'après 3 à 5 jours, le chou a un goût frais agréable. Ensuite son acidité augmente, et le goût se détériore. Cela signifie que le goût est optimum lorsque les valeurs de β dans la région (1) et (2) sont comprises entre 0,01 et 0,02. Les courbes $\beta = f(\text{pH})$ pourraient aussi servir à détecter aisément l'apparition de fermentations anormales.

Lorsqu'on se contente de suivre l'évolution du pH en fonction du temps, on constate qu'il baisse rapidement pendant les 3 à 5 premiers jours, ensuite il change relativement peu. Ce pH est représenté sur la figure 5 (b) par des cercles pleins. On pourrait en déduire que la production d'acides organiques cesse au bout de quelques jours. C'est à cette conclusion que sont arrivés quelques auteurs. En fait, elle est éronnée. En réalité, les courbes $\beta = f(\text{pH})$ prouvent que la quantité d'ionogènes (et en particulier d'acides) continue à augmenter, même après 8 jours. Le fait que le pH se maintienne constant est dû à la production simultanée de composés acides et basiques.

La mesure de l'acidité se fait habituellement en ajoutant une base à la solution jusqu'à ce qu'un certain pH soit atteint et en mesurant le volume de base ainsi ajouté. Cette méthode, qui est largement utilisée est dénommée «détermination quantitative des acides organiques» (voir par exemple le «Traité de chimie alimentaire et de nutrition» édité par Obara et publié par Kenpakusha en 1980). Cette méthode de détermination

des acides organiques ne rend pas compte de la quantité réelle d'acide lactique présent. Pour que le résultat du dosage soit en accord avec la quantité d'acide présente, il faut que:

(1) tous les acides organiques soient présents sous la forme d'acides libres, et

(2) que la dissociation de ces acides en ions soit complète au pH de virage de l'indicateur.

Ces deux conditions sont satisfaites, lorsque par exemple de l'acide lactique seul est présent dans la solution. La courbe de neutralisation de la figure 6 (b) montre que les deux indicateurs mentionnés sur cette figure peuvent être utilisés pour déterminer le point de neutralisation. Par contre, les courbes de neutralisation obtenues avec le liquide fermenté (voir figures 5 (a) et 6 (a)), montrent que les deux conditions énoncées plus haut ne sont pas satisfaites. Une petite quantité d'acide chlorhydrique avait été ajoutée aux échantillons dont les courbes de neutralisation sont représentées sur la figure 5 (a) et 6 (a) pour que ces courbes débutent à un pH plus bas. La courbe $\beta = f(\text{pH})$ montre qu'un ionogène est présent (vraisemblablement un composé carboxylé) dont le pKa est d'environ 3,5. Or, après 8 jours, le pH de la solution est 4,1: environ 60% du composé carboxylé est donc déjà neutralisé. En outre, si on dose l'acidité en utilisant l'indicateur mixte, le virage devient imprécis à cause du pouvoir tampon de la solution dans la région voisine de pH 7. Si on utilise comme indicateur la phénolphthaléine, le virage reste tout aussi imprécis, et en plus environ la moitié de l'ionogène dont le pKa est 9,5 se trouvera inclus dans le résultat du dosage. Dans ces conditions, le dosage des acides organiques par alcalimétrie n'a pas beaucoup de signification.

Par contre, l'examen de la courbe $\beta = f(\text{pH})$ fournit les renseignements suivants: la solution contient deux ionogènes principaux, dont les pKa respectifs sont d'environ 3,5 et 9,5; la quantité de chacun de ces deux ionogènes peut être estimée à 0,056 M environ après 8 jours; un troisième ionogène est présent en petites quantités et son pKa est d'environ 7. Par conséquent, le procédé de la présente invention fournit un ensemble d'informations qui ne peuvent être obtenues par les méthodes conventionnelles. Bien qu'il soit nécessaire de recourir aux méthodes chimiques pour identifier les différents ionogènes, cette invention présente le grand avantage de permettre de déterminer la distribution des ionogènes dans des mélanges complexes comme par exemple des produits alimentaires, avec une technique aussi aisée à mettre en œuvre qu'une titration.

Les résultats obtenus avec d'autres produits alimentaires sont brièvement examinés ci-dessous.

La titration a été faite au moyen de soude 1 N ajoutée à la vitesse de $2 \times 9,74 \mu \text{l/sec}$. La valeur E_{ref} était de 1,0 V.

E_{ref} représente le signal à l'entrée X du diviseur dont le signal à la sortie peut être modifié suivant le changement de pH.

Thé vert de qualité intermédiaire (fig. 7 (a))

Le thé a été extrait par 20 volumes d'eau chaude pH 6,0.

Prise d'essai	20 ml
HCl 1 N	1,5 ml

La courbe obtenue correspond vraisemblablement à un mélange d'acide aminés. Toutefois, une certaine quantité d'acides aminés aurait pu être ajoutée au thé avant son conditionnement.

Thé grillé (chauffé) (fig. 7 (b))

Le thé a été extrait par 10 volumes d'eau chaude de pH 5,43.

Prise d'essai	20 ml
HCl 1 N	1,0 ml

La quantité d'acides aminés du thé grillé est nettement plus faible que celle trouvée dans le thé vert.

Thé noir

Le sachet (10 g) provenait de la société «Lipton». Le thé a été extrait par 20 volumes d'eau chaude.

Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 1 ml

La courbe obtenue montre un profil d'acides aminés similaire à celui observé avec le thé grillé. Toutefois, la proportion de groupements -COOH par rapport aux groupements -NH₂ est différente.

Vinaigre (fig. 8 (a))

Vinaigre de fermentation «Summit» ayant une acidité de 4,2% et un pH de 2,75.

Prise d'essai (après dilution au 1/20) 2 ml
HCl 1 N 1 ml
Eau 18 ml

La courbe obtenue est identique à celle de l'acide acétique pur (fig. 8 (b)).

Boisson à base d'acides aminés (fig. 9)

«Algin Z» est fabriqué par Ajinomoto Co., Inc. Son pH est 3,80. Il contient: L-arginine, L-aspartate de sodium, fructose, glucose, acide citrique, acide D et L-malique, miel, vitamine C, niacine, caramel et parfum.

Prise d'essai (après dilution au 1/4) 5 ml
HCl 1 N 1 ml
Eau 15 ml

Le pic situé dans le voisinage de pH 9 (il est dû aux groupements -NH₂) est plus faible que le pic situé dans la région de bas pH. Ceci est dû à la présence d'acides organiques (acide citrique, malique, ascorbique).

Assaisonnement chimique (fig. 10 (a))

«Hondashi» est fabriqué par Ajinomoto Co., Inc. Une solution à 2% a été centrifugée. Son pH était de 6,02.

Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 2 ml

La courbe obtenue est identique à celle de l'acide glutamique 0,05 M (fig. 10 (b))

Saké japonais (fig. 11 (a))

Un saké «Ozeki une tasse» provenant de Ozeki Shuzo K.K. a été examiné. Le produit avait un pH de 4,30.

A Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 1 ml
pH 1,60

B Prise d'essai, après concentration de 100 ml à 20 ml 20 ml
HCl 1 N 3 ml
pH 1,45

La courbe obtenue correspond à un mélange d'acides aminés.

Vin (fig. 11 (b))

Vin rouge «Delica» provenant de Suntory Limited. Son pH était de 3,30.

Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 1 ml

La courbe obtenue est similaire à celle de l'acide tartrique. Le pouvoir tampon existant dans la région de pH voisine de 11 pourrait être dû à un acide - phénol ou à un groupement amine.

Café moulu (fig. 12 (a))

L'extrait a été préparé par percolation à partir de 10 g de

café finement moulu provenant de Hills Brothers Med. et de 250 ml d'eau chaude. Le pH l'extrait était 5,13.

Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 1,5 ml

Café soluble (fig. 12 (b))

Nous avons utilisé le café soluble MJB à la concentration de 2%. Le pH du café reconstitué était 5,00.

Prise d'essai 20 ml
HCl 1 N 1 ml

Les deux produits présentent un pouvoir tampon dans la région voisine de pH 4, qui pourrait être dû à la présence d'un ou plusieurs acides organiques. Le produit responsable du pouvoir tampon dans la région voisine de pH 9 n'a pas été identifié. Il est possible qu'il s'agisse d'un produit phénolique ou d'un composé aminé.

Jus de pamplemousse (fig. 13)

Nous avons utilisé le jus de pamplemousses provenant de Floride et dilué au 1/4. Le pH du jus dilué était 3,07.

Prise d'essai 5 ml
HCl 1 N 1 ml
Eau 15 ml

On observe la présence d'un pic provenant de l'acide citrique. On notera aussi l'existence d'un pouvoir tampon dans le voisinage de pH 10.

Le pic correspondant à l'acide citrique se trouve légèrement décalé par rapport à sa position théorique (Fig. 1 (f)). Ceci est à attribuer à la forte activité ionique des ions citrate tribasiques et peut être corrigé par calcul.

Jus de citron (fig. 14)

Jus de citron (dilué au 1/10^e) 2 ml
HCl 1 N 1 ml
Eau 17 ml

Le pic observé est probablement dû à l'acide citrique. Le pic au voisinage de pH 10 a disparu, mais ceci peut être dû à la dilution.

Jus d'orange (fig. 15)

Jus d'orange (dilué au 1/3) 10 ml
HCl 1 N 2 ml
Eau 18 ml

Des acides autres que l'acide citrique semblent être présents. On observe à nouveau un pic dans la région de pH voisine de 10.

Jus de pomme (fig. 16)

Nous avons utilisé du jus de pomme pur provenant de Kage Co., Inc. Son pH était 3,76.

Prise d'essai (après dilution à 2/3) 5 ml (A)
20 ml (B)
HCl 1 N 1 ml
Eau 10 ml

Il est clair que la composante principale est l'acide malique. On notera aussi la présence d'un composé ayant un fort pouvoir tampon à un pH supérieur à 10. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des boissons à base de jus de pomme.

Jus de raisin (fig. 17)

Nous avons utilisé le jus de raisin pur provenant de Kage Co., Inc. Son pH était 3,73.

Prise d'essai (après dilution à 1/2) 10 ml
HCl 1 N 1 ml
Eau 10 ml

La courbe correspond à l'acide tartrique.

Jus d'ananas (fig. 18)

Jus d'ananas (pH 3,10) 10 ml
HCl 1 N 1 ml

Nous avons utilisé le jus d'ananas pur et fraîchement préparé. Selon la littérature, les deux acides organiques principaux sont l'acide citrique et l'acide malique. Dans l'échantillon examiné, le profil de l'acide citrique apparaît plus fortement que celui de l'acide malique.

Sauce de soja (fig. 19 (a))

Nous avons utilisé la sauce de soja fabriquée par Kikkoman Co., Ltd. Son pH était 4,72.

Prise d'essai 2 ml
HCl 1 N 2 ml
Eau 17 ml

La sauce de soja contient un mélange d'acides aminés. La courbe obtenue expérimentalement devrait résulter de la superposition des profils individuels des acides aminés présents. Effectivement, la courbe expérimentale est identique à celle calculée à partir des teneurs en acides aminés de la sauce de soja et à partir des pKa des 18 acides aminés (voir «Composition des aliments japonais» édité par la Société de publication d'ouvrages médicaux, dentaire et pharmacologiques en 1976).

Les courbes $\beta = f(\text{pH})$ obtenues sur des produits alimentaires mettent en évidence non seulement les composantes connues, mais aussi des ionogènes mineurs probablement importants. L'importance de la présente invention va croître à mesure que vont s'accumuler les observations pratiques découlant de son utilisation.

Il est à prévoir que la présente invention trouvera des applications dans le contrôle de qualité de nombreux produits.

Par ailleurs, on sait que les composantes organiques du sol sont très importantes en agriculture. On recommande d'enrichir le sol régulièrement avec des composés organiques et de grandes quantités de compost sont fabriquées à cet effet. On a cependant fait peu de progrès dans la connaissance des composés dits humiques, surtout à cause de la complexité de leur structure et de leur composition. Il est très difficile de suivre la formation d'humus dans la fabrication de compost. L'acide humique est un matériau polymérique de couleur foncée dont l'acidité provient surtout de la présence de groupements carboxylés. Par conséquent, la présente invention pourrait être utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative de l'humus. Un exemple d'analyse est représenté sur la figure 20. La figure 20 représente la courbe $\beta = f(\text{pH})$ obtenue avec un extrait aqueux (pH = 8,60) d'un compost de paille de riz fortement décomposé. 40 g de compost étaient extraits par 100 ml d'eau et les particules insolubles étaient éliminées avant l'analyse. Comme on pouvait s'y attendre, la solution contient un mélange d'ionogènes. La courbe obtenue présente un maximum dans la région de pH de 4 à 6 est dans la région de pH de 9 à 11. Bien que l'usage que l'on peut faire de cette courbe n'apparaisse pas clairement à l'heure actuelle, cela sera possible ultérieurement, en accumulant les résultats expérimentaux sur un grand nombre d'échantillons.

Utilisation du procédé pour l'examen de l'urine humaine

La composition de l'urine varie considérablement suivant

les conditions de vie. Bien que de nombreuses recherches et analyses soient faites sur l'urine pour établir un diagnostic, il est pratiquement impossible d'obtenir une image globale des diverses composantes de l'urine. Cela serait trop compliqué à réaliser. La plupart, sinon la totalité des composantes organiques de l'urine sont des ionogènes comme les acides organiques, les acides aminés, les composés hétérocycliques, les peptides et les protéines. La courbe $\beta = f(\text{pH})$ sera donc un reflet des composantes présentes et de leurs proportions respectives. Les résultats obtenus avec des échantillons d'urine provenant de trois hommes adultes en bonne santé de 40 à 60 ans sont examinés en détail

Sujet A (fig. 21 (a)) 10 ml
Urine (pH 6,7)
HCl 1 N 1 ml
Sujet B (fig. 21 (b))
Urine (pH 5,37) 10 ml
HCl 0,5 ml
Sujet C (fig. 21 (c))
Urine (pH 6,0) 10 ml
HCl 1,5 ml

Lorsqu'on compare les courbes obtenues avec l'urine des trois sujets, on constate qu'elles présentent des différences notables. Les courbes obtenues avec l'urine du sujet A et B sont similaires, avec de légères différences dans la hauteur relative des pics situés à pH 4,9, 6,3 à 6,7 et 9,3. Il est probable que deux des pics (4,9 et 6,3 à 6,7) sont dus à des acides organiques, le troisième (9,3) à de l'ammoniaque ou à une amine organique. Les courbes montrent que l'urine des trois sujets est riche en ionogène, et en particulier l'un d'eux, qui a un pKa de 9,3. On note aussi la présence d'ionogène(s) ayant un pKa de 2 à 3; c'est l'urine du sujet C qui en contient le plus. On constate sur la courbe C la présence d'un bruit de fond au niveau du pic situé à pH 9,7. Ce bruit de fond provient de la dissolution de petites quantités de particules solides qui étaient présentes dans l'urine. Il est possible de calculer la concentration molaire des composés correspondant aux différents pics à partir des valeurs de β . Dans le cas de l'échantillon C, le composé ayant un pKa de 6,3 est présent à la concentration de 0,06 M, tandis que le composé ayant un pKa de 9,3 est présent à la concentration de 0,12 M environ.

L'interprétation des courbes présentées sera rendu plus aisée dans le futur par l'accumulation de résultats expérimentaux sur un grand nombre d'échantillon. Le fait que les courbes obtenues avec l'urine de sujets sains menant un mode de vie similaire présentent des différences importantes, laisse penser que le procédé pourra trouver des applications cliniques.

Il est aussi à prévoir que le procédé de la présente invention trouvera des applications dans d'autres domaines, comme la recherche sur les protéines et les peptides.

Pendant longtemps, la titration de protéines par des acides ou des bases a constitué une technique d'investigation très efficace (voir par exemple «Les propriétés électriques des protéines» de Katsushige Hayashi, édité par le service des publications de l'Université de Tokyo en 1971). Il est à prévoir, que la détermination de courbes $\beta = f(\text{pH})$ pour les protéines deviendra aussi une technique d'investigation très efficace.

FIG. 1 (a)

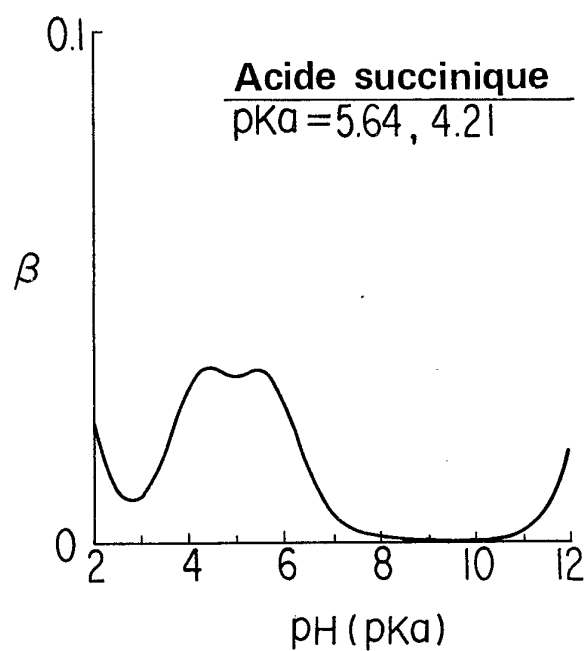


FIG. 1 (b)

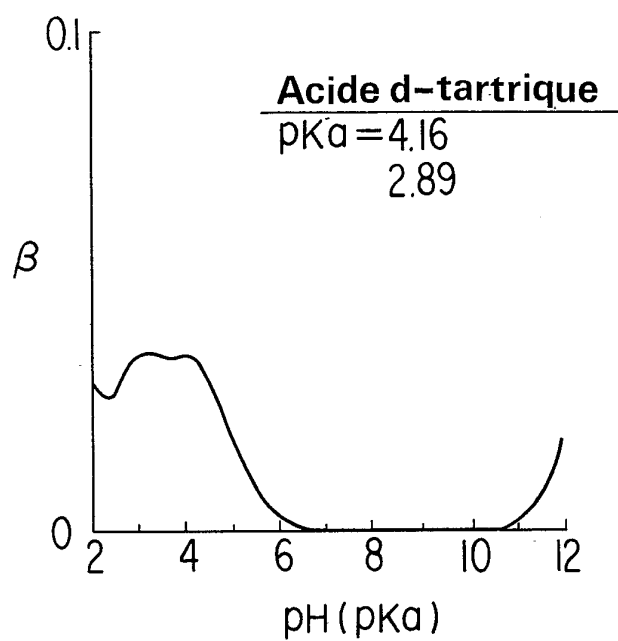


FIG. 1(c)

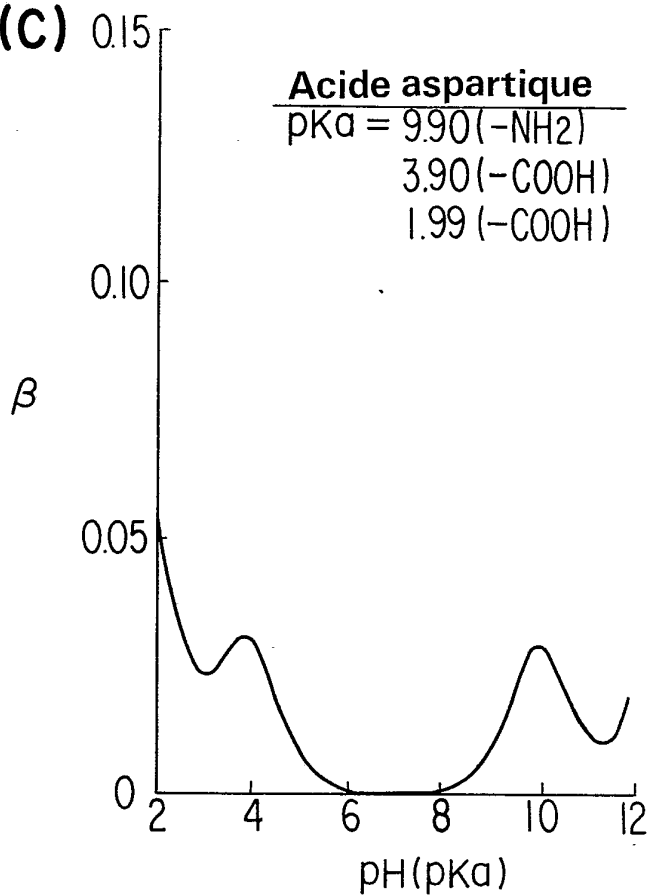


FIG. 1(d)

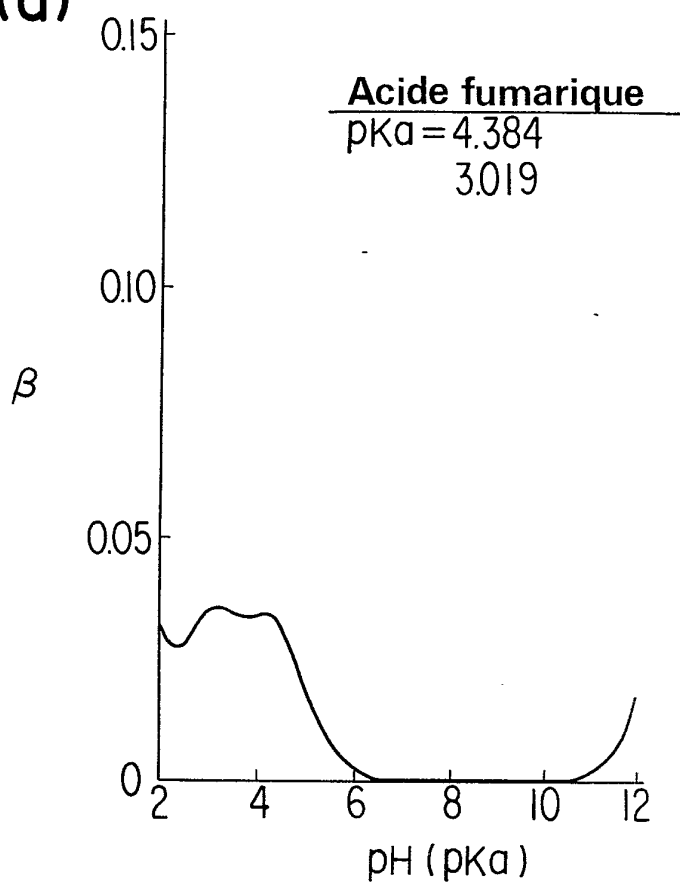


FIG. 1 (e)

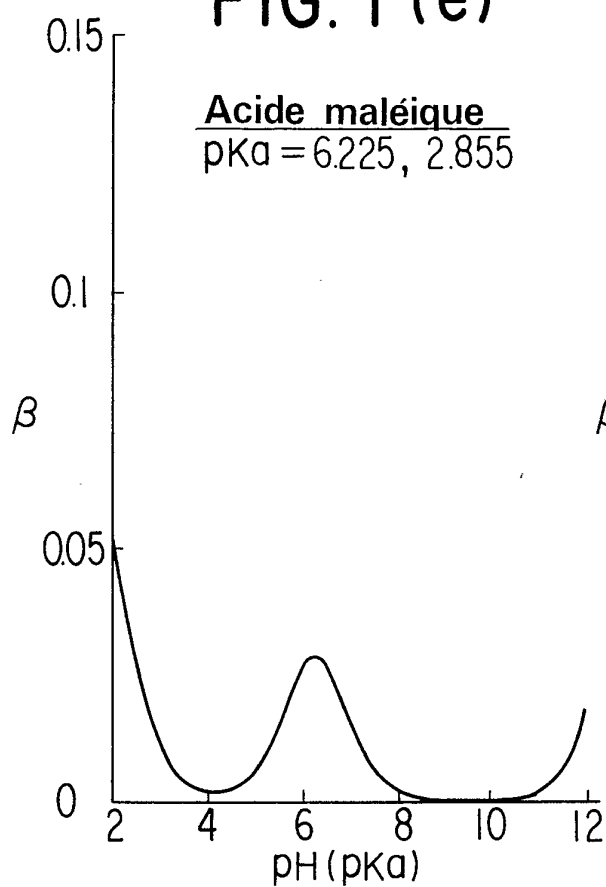


FIG. 1 (f)

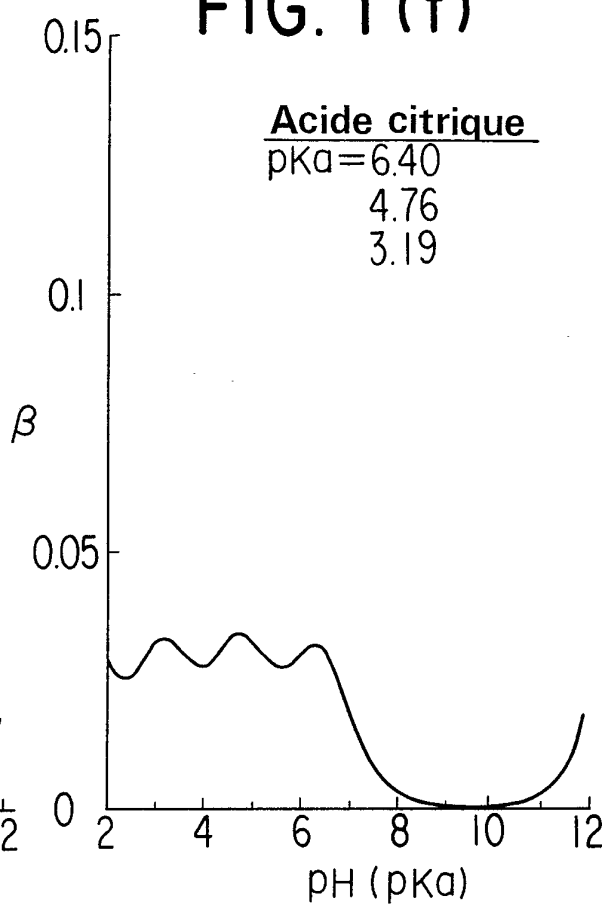


FIG. 1 (g)

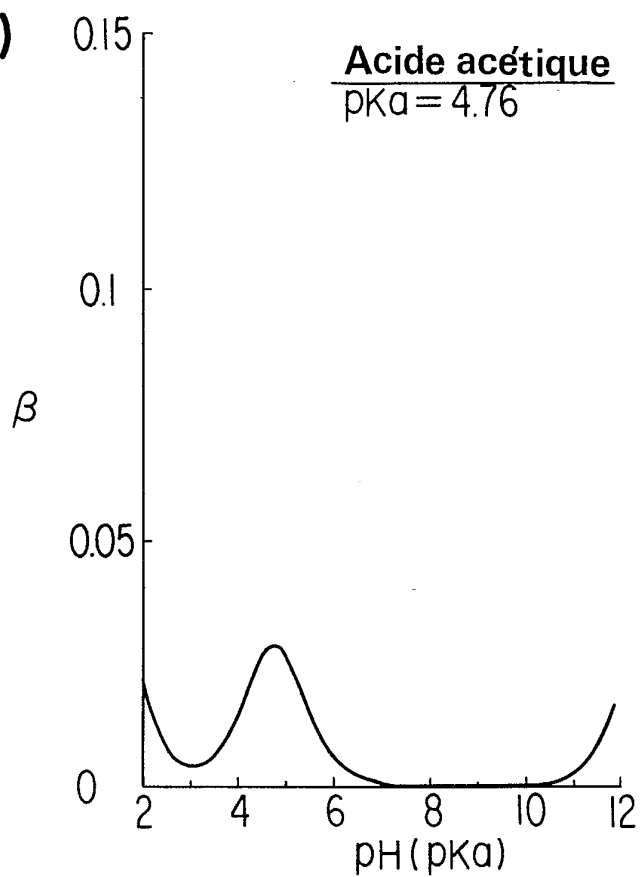


FIG. 2

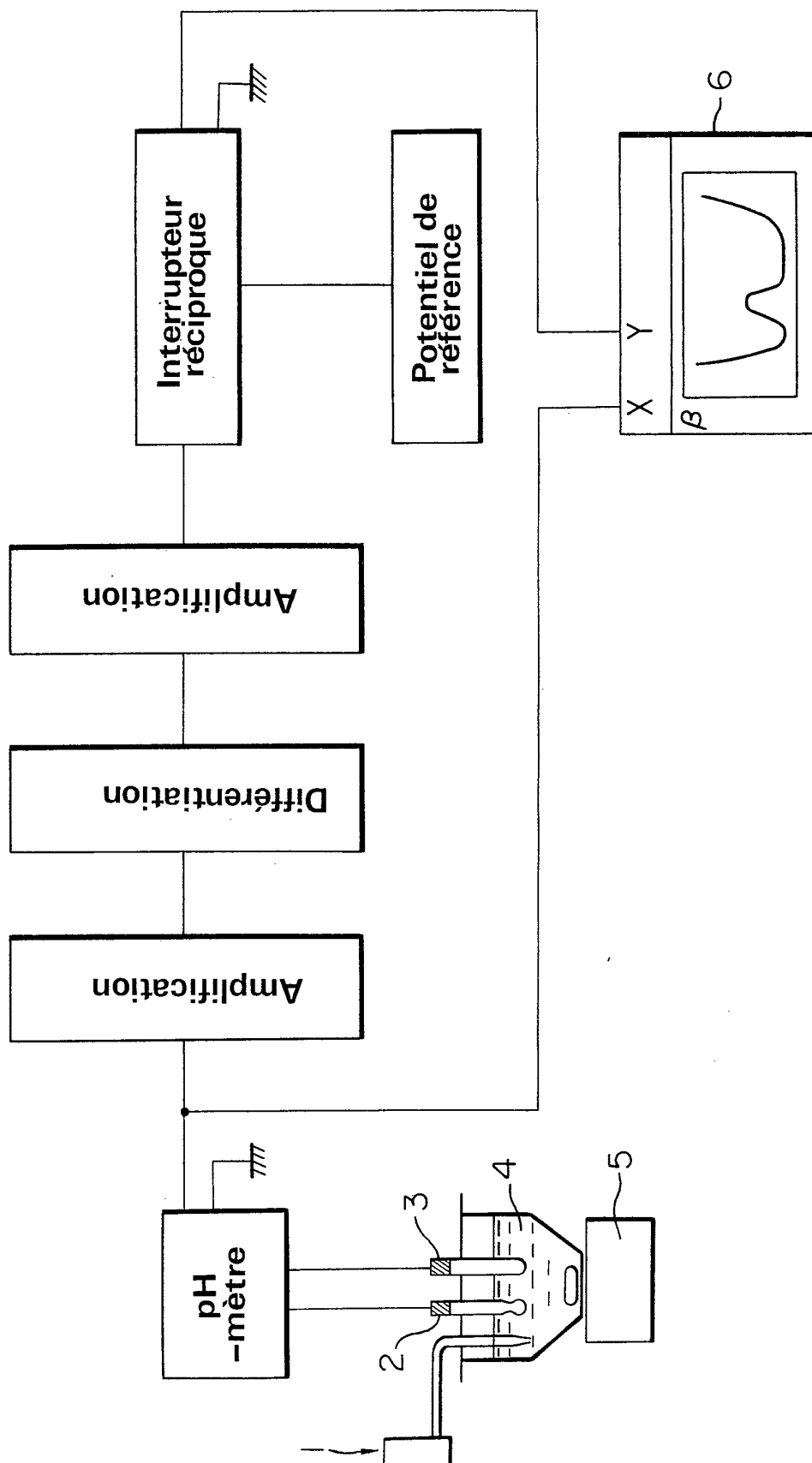


FIG. 4

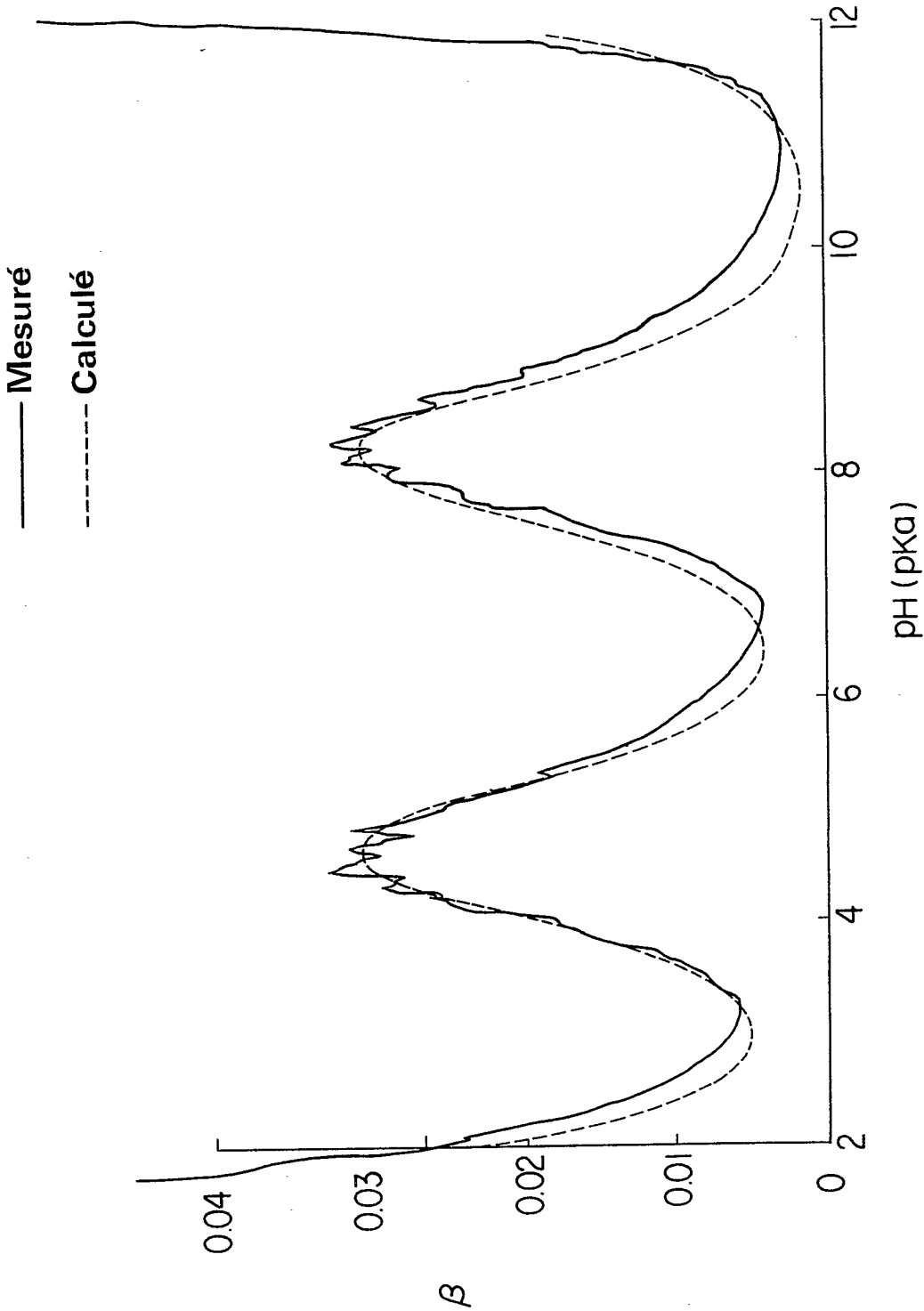


FIG. 5 (a)

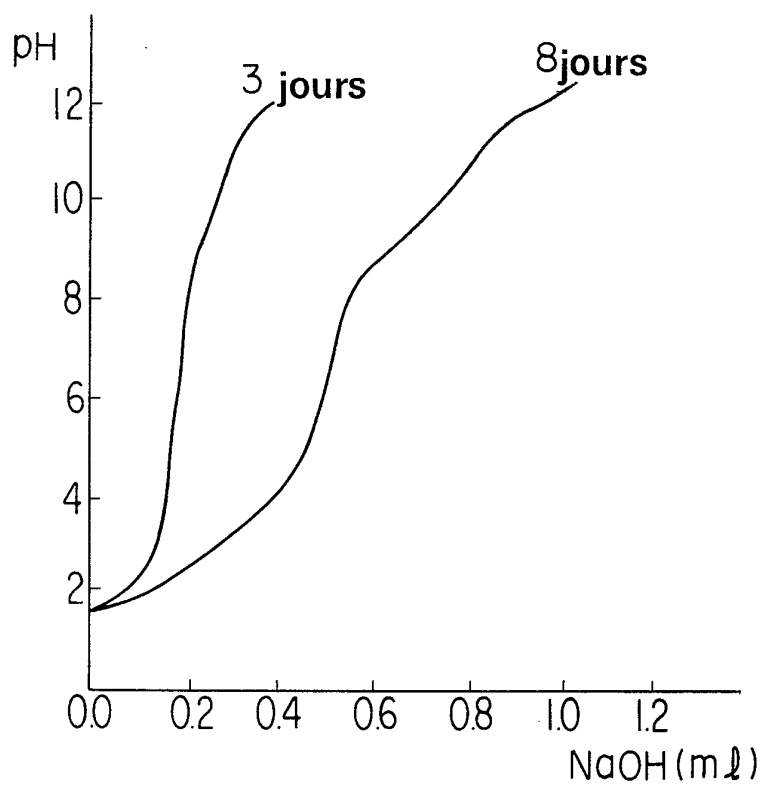


FIG. 5 (b)

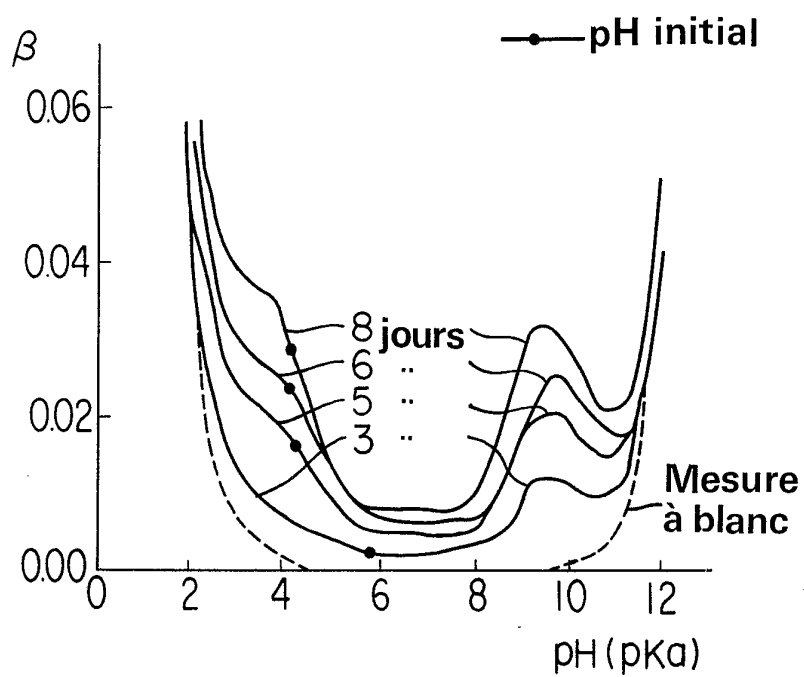


FIG. 6 (a)

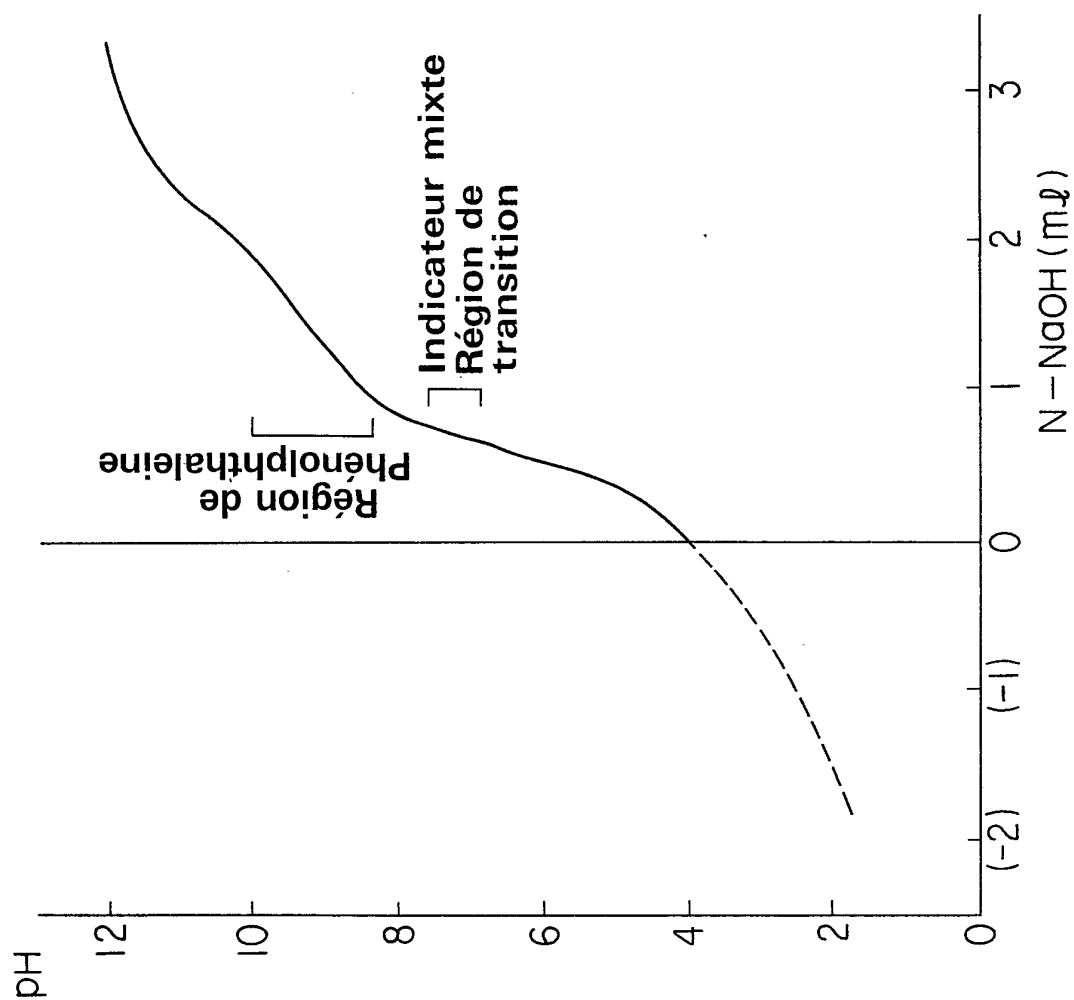


FIG. 6 (b)

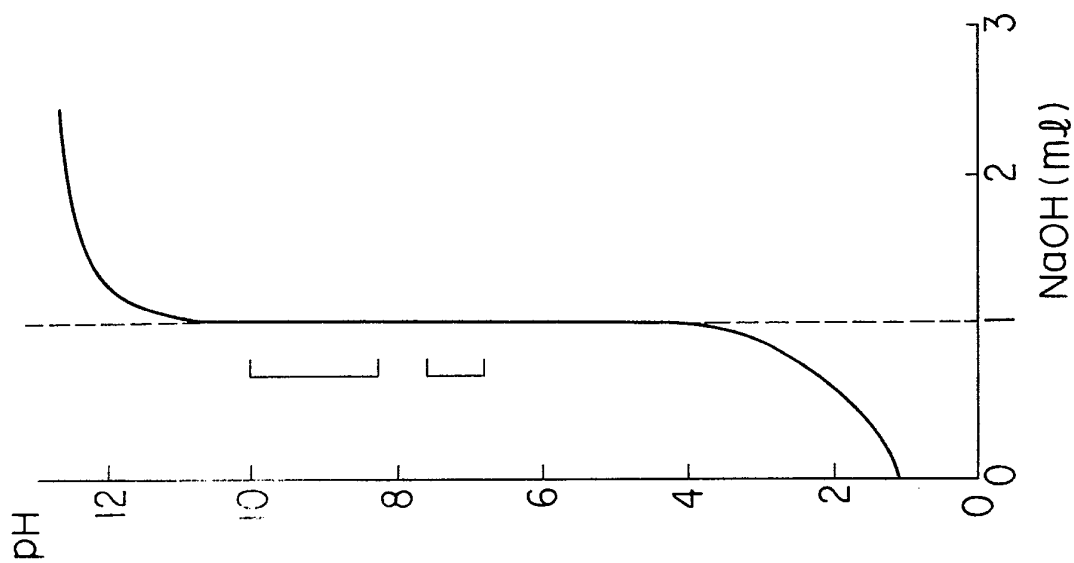


FIG. 7 (a)

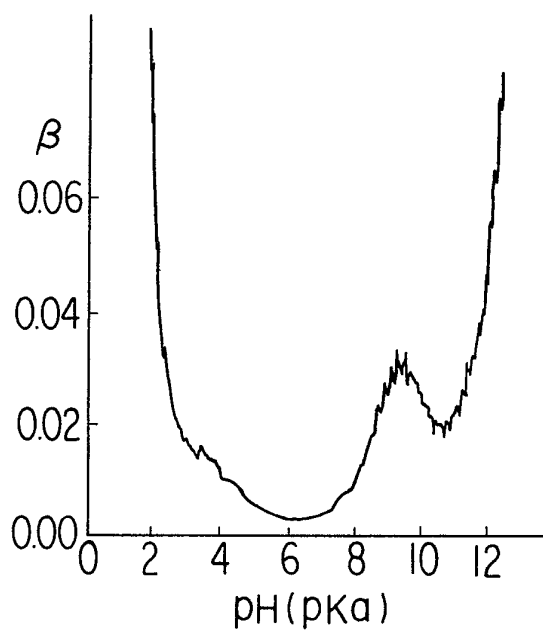


FIG. 7 (b)

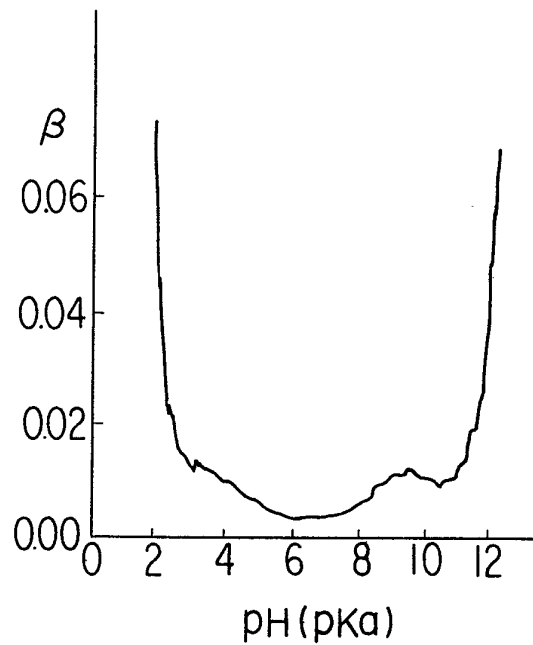


FIG. 7 (c)

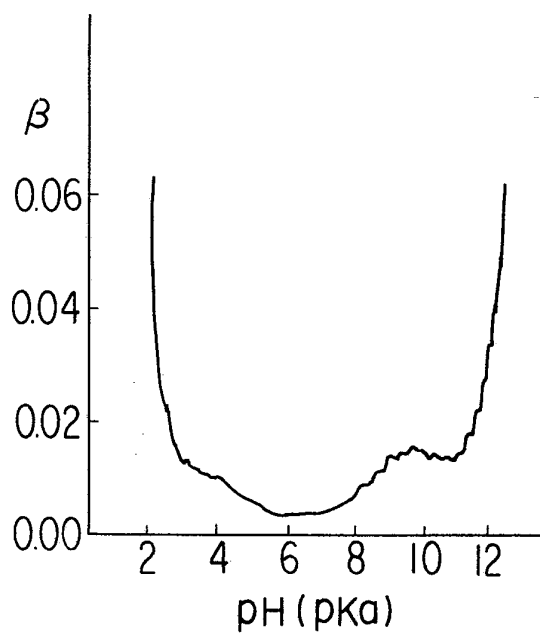


FIG. 8 (a)

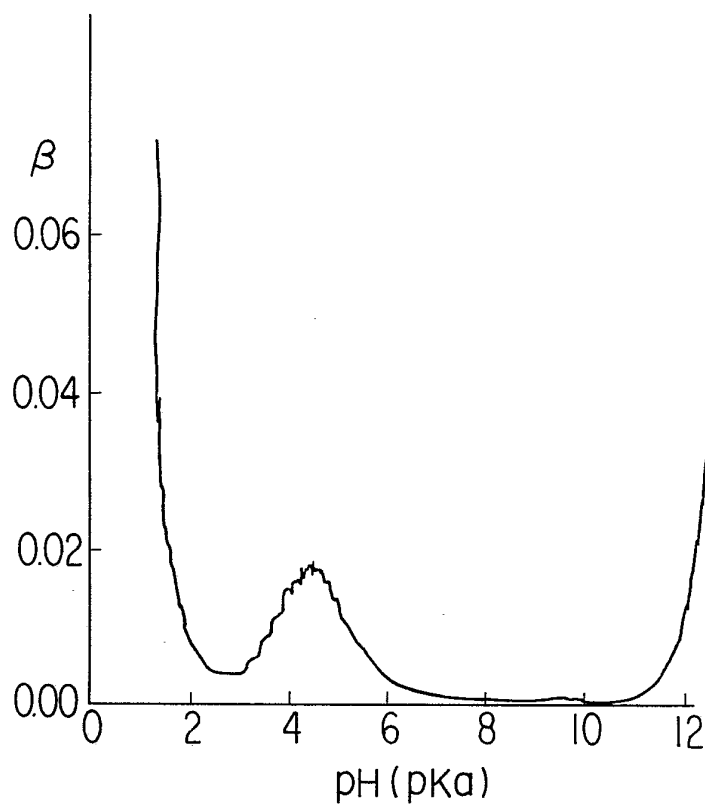


FIG. 8 (b)

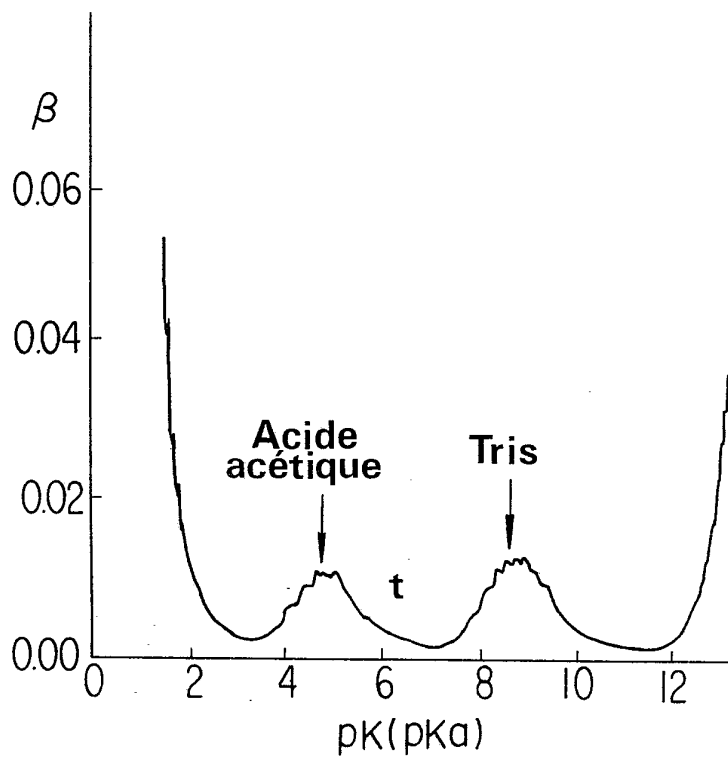


FIG. 9

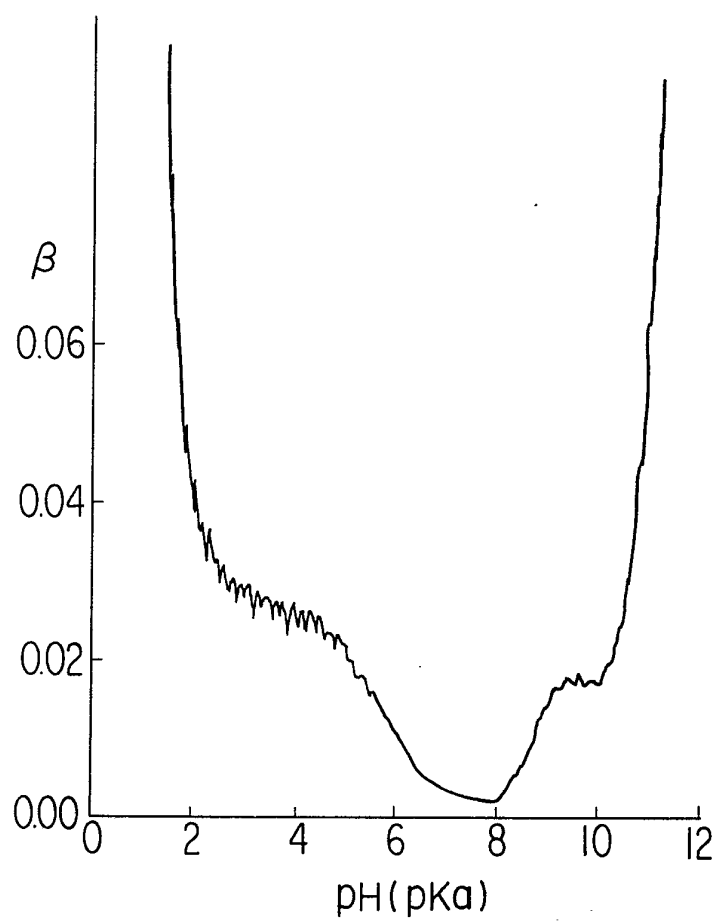


FIG.10 (a)

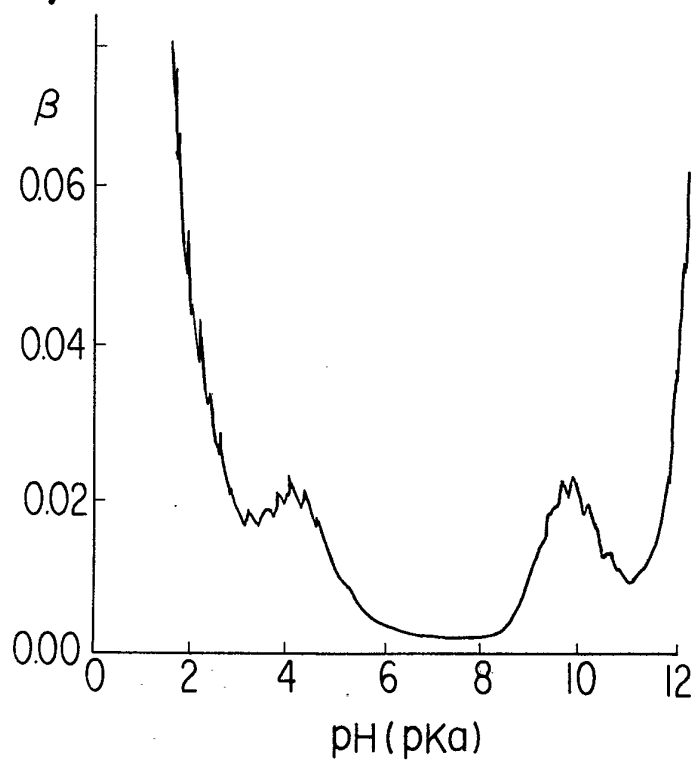


FIG. 10 (b)

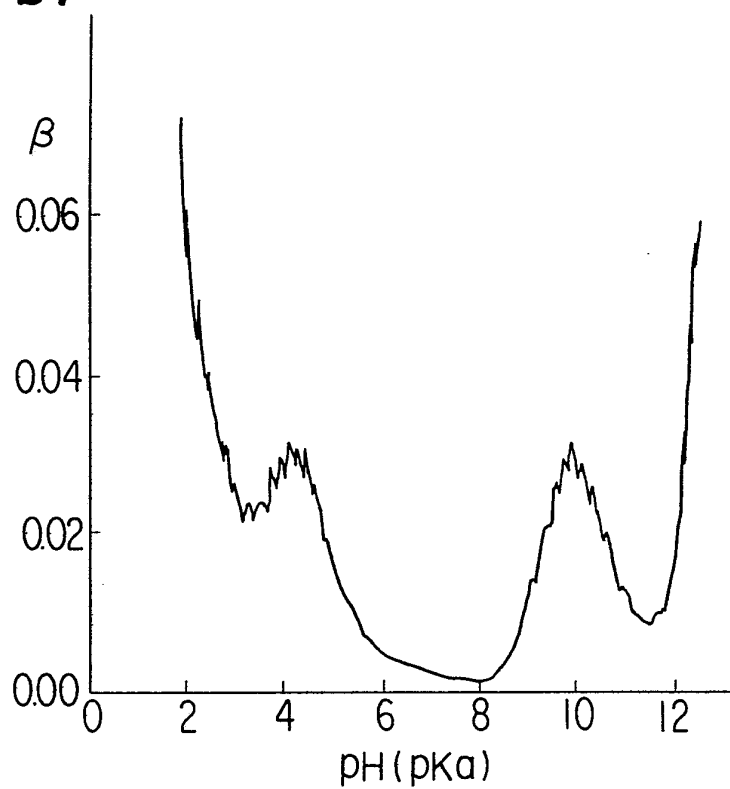


FIG. 11 (a)

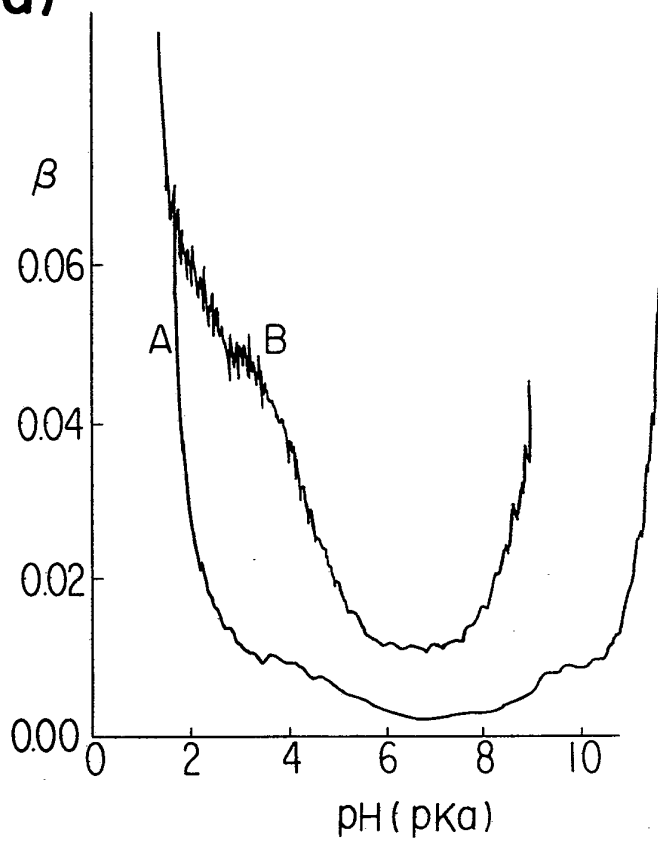


FIG. 11 (b)

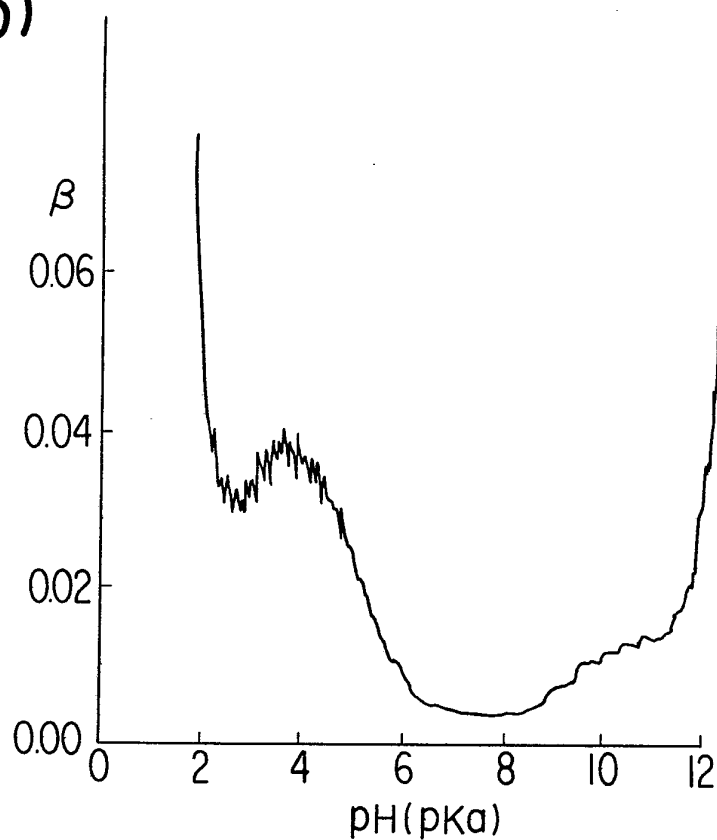


FIG. 12 (a)

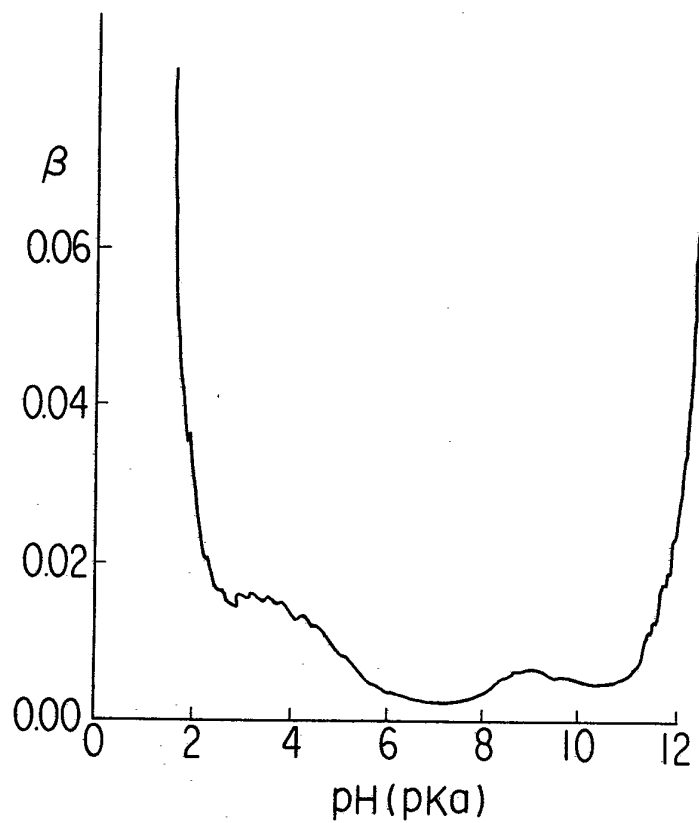


FIG. 12 (b)

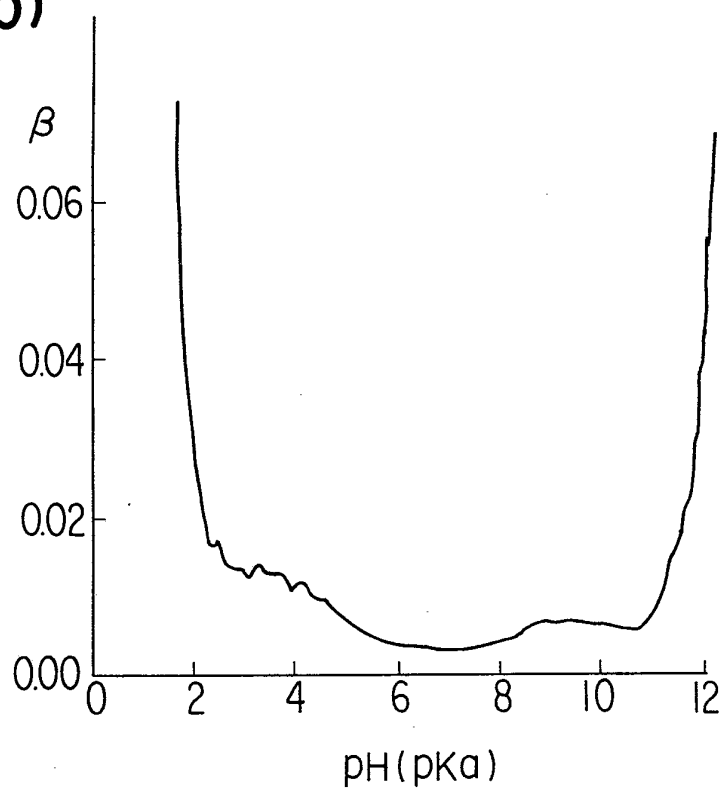


FIG. 13

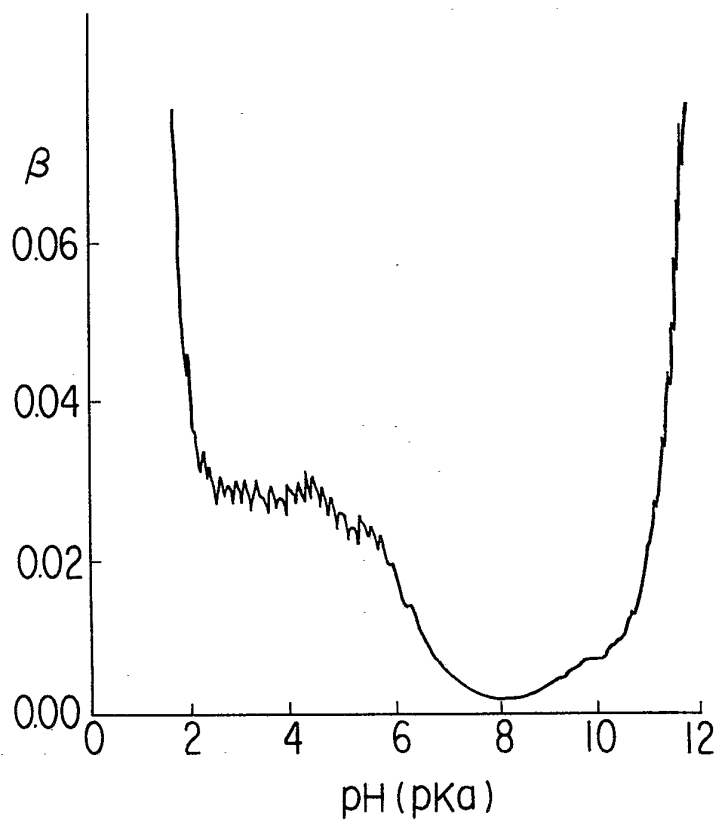


FIG. 14

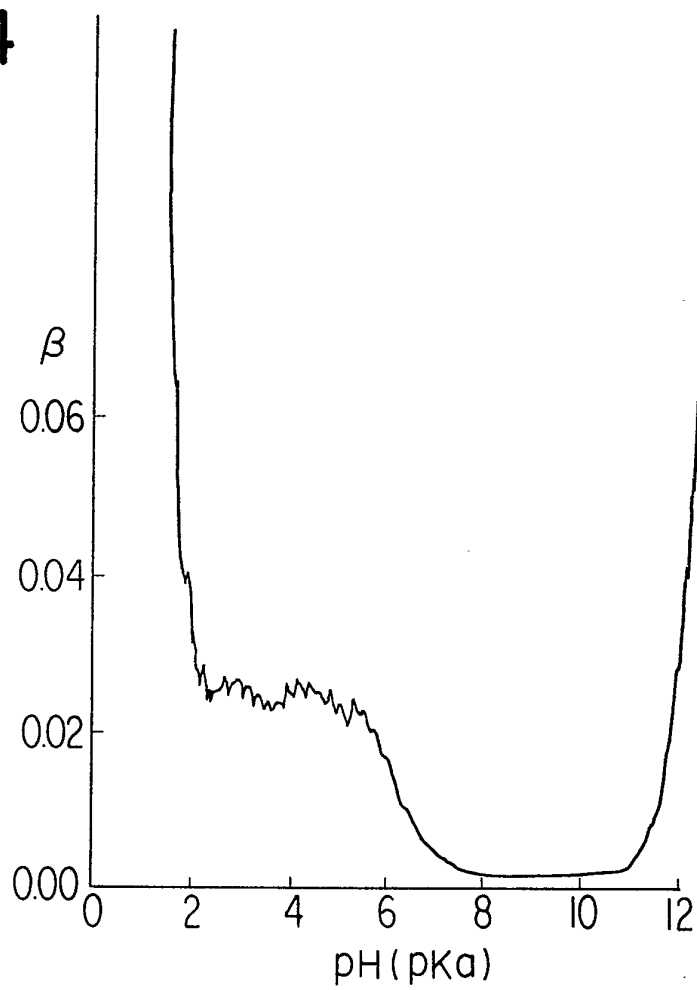


FIG. 15

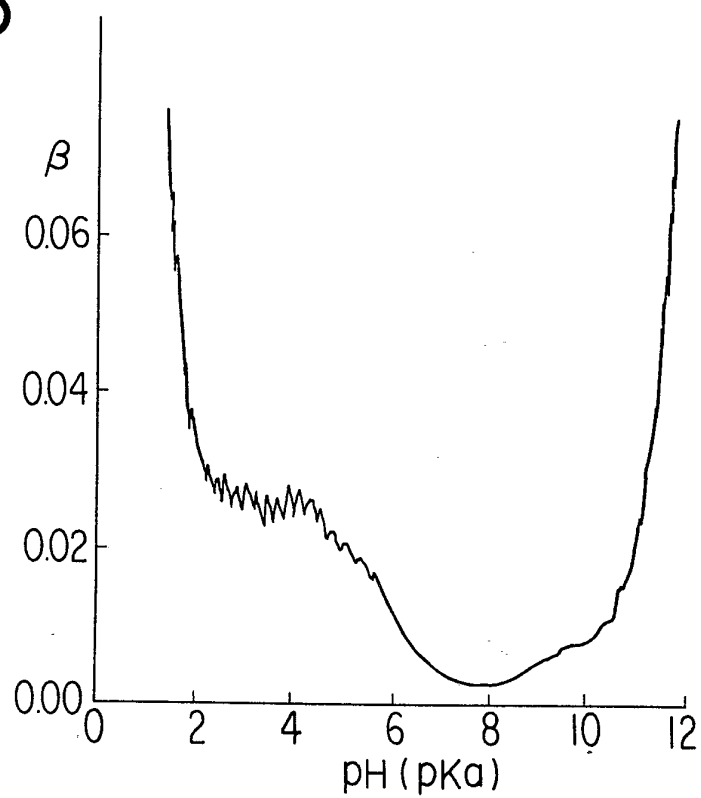


FIG. 16

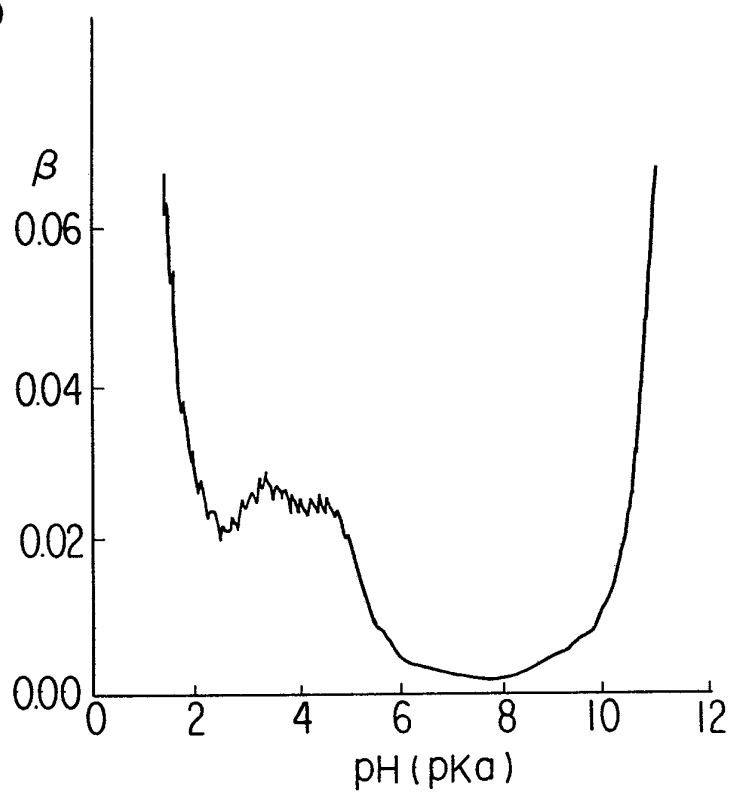


FIG. 17

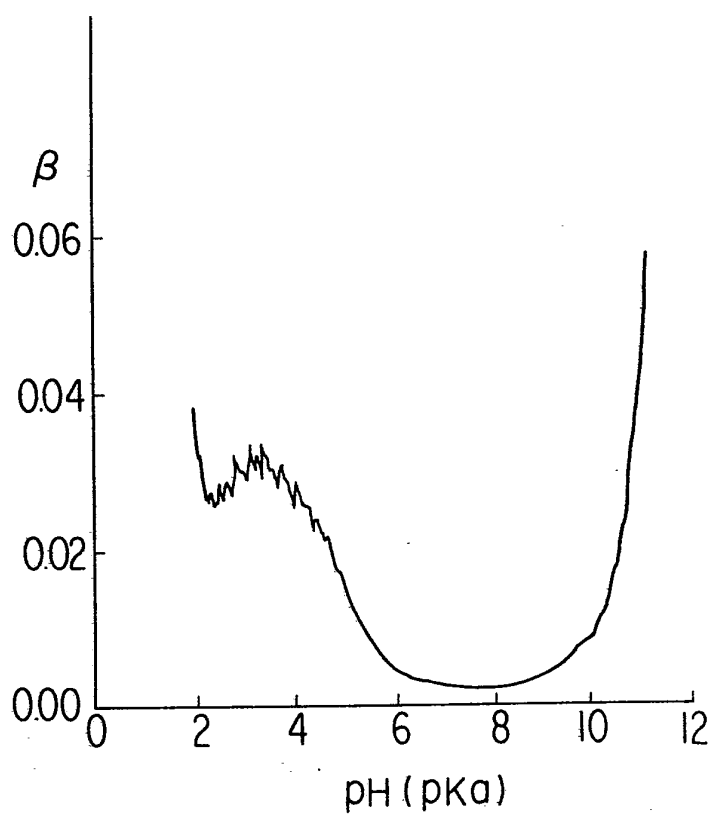


FIG. 18

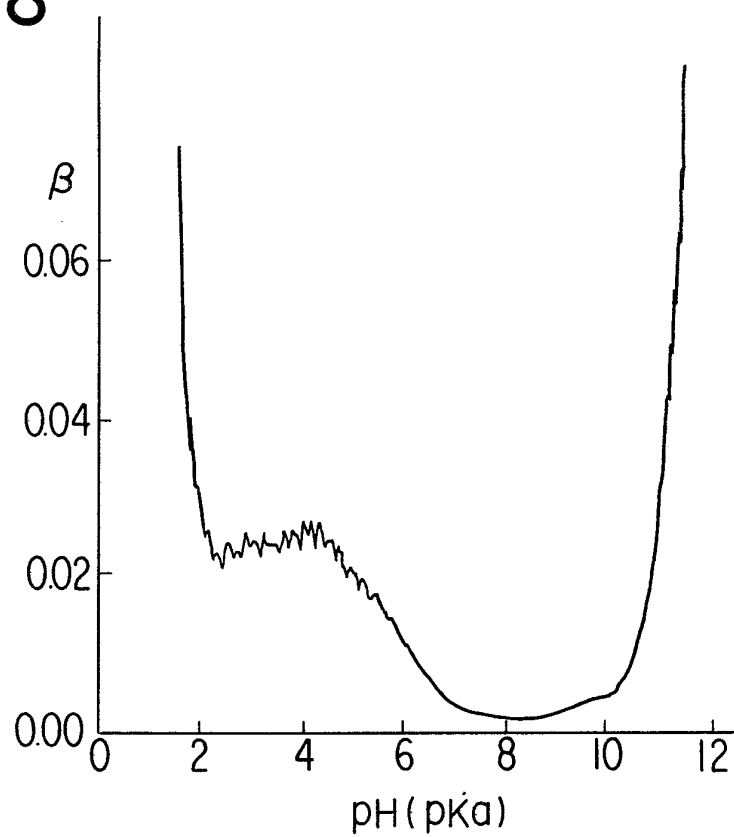


FIG. 19 (a)

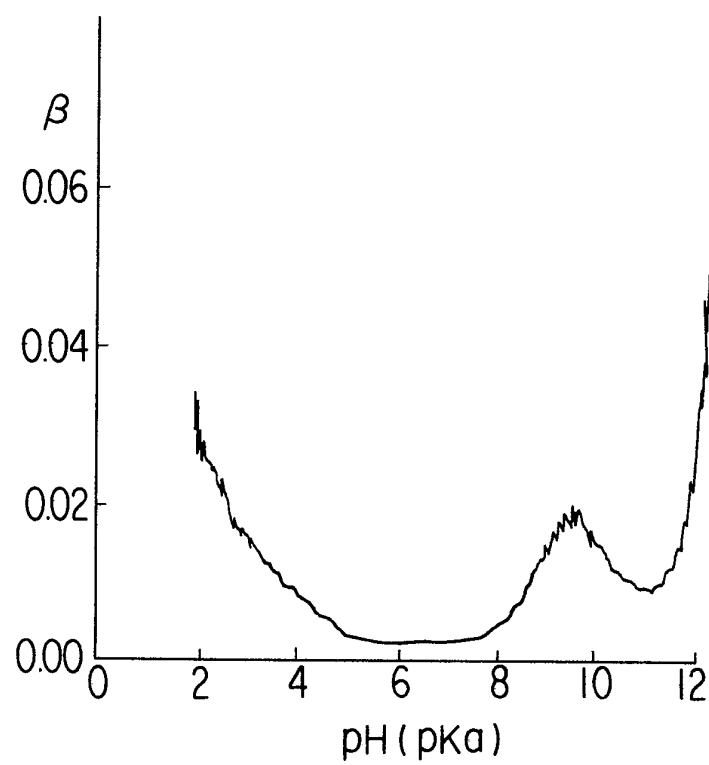


FIG. 19 (b)

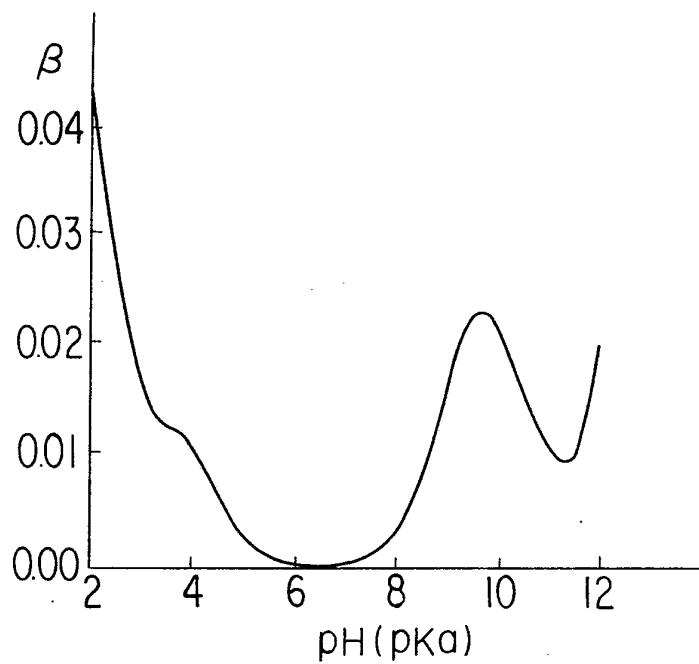


FIG. 20

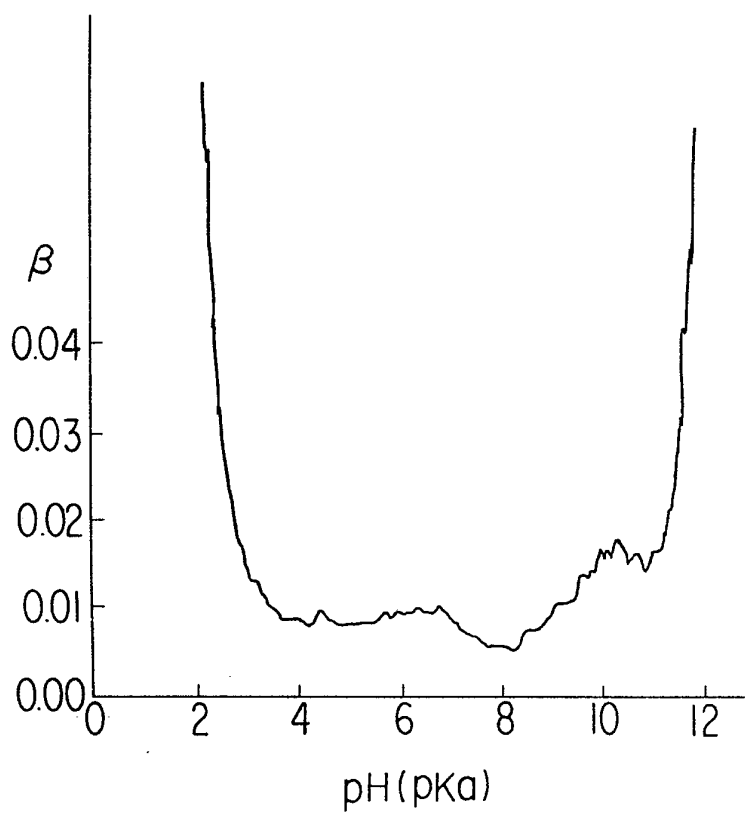


FIG. 21(a)

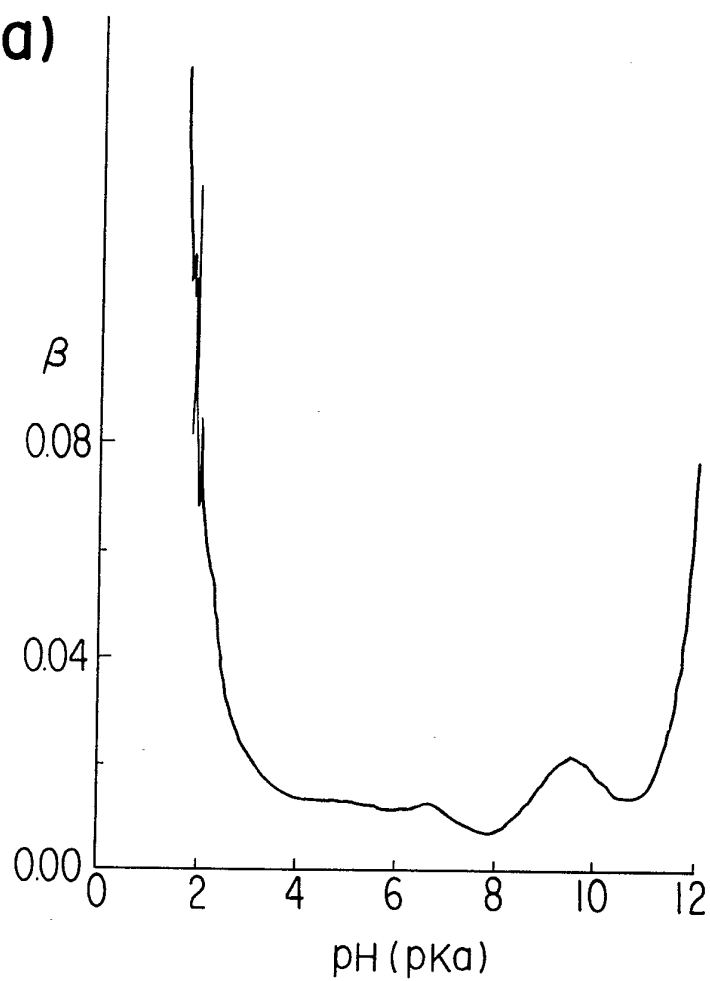


FIG. 21(b)

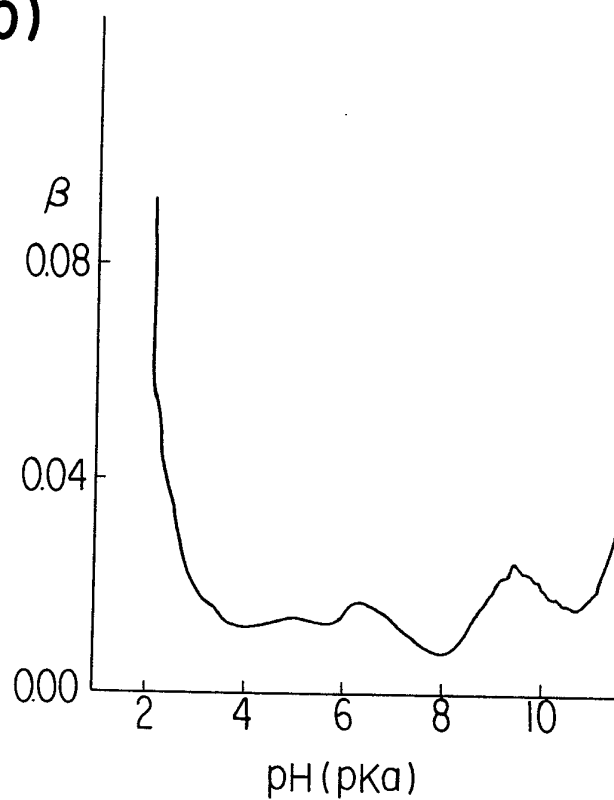


FIG. 21 (c)

