

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **88111565.3**

51 Int. Cl.4: **H05H 3/02**

22 Anmeldetag: **19.07.88**

30 Priorität: **22.03.88 DE 3809504**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
27.09.89 Patentblatt 89/39

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **Bruker-Franzen Analytik GmbH**
Kattenturmer Heerstrasse 122
D-2800 Bremen 61(DE)

72 Erfinder: **Schlag, Edward, Prof. Dr.**
Lichtenbergstrasse 4
D-8046 Garching(DE)
Erfinder: **Lindner, Josef**
Hohenzollernstrasse 113
D-8000 München 40(DE)
Erfinder: **Beavis, Ronald C., Dr.**
Pettenkoferstrasse 9
D-8300 Landshut(DE)
Erfinder: **Grotemeyer, J., Dr.**
Kleiberweg 5
D-8050 Freising(DE)

74 Vertreter: **Patentanwälte Kohler - Schwindling**
- Späth
Hohentwielstrasse 41
D-7000 Stuttgart 1(DE)

54 **Verfahren zum Verdampfen einer Probensubstanz.**

57 Beim Verdampfen einer aus großen Molekülen bestehenden probensubstanz, insbesondere zum Zweck massenspektroskopischer Untersuchungen, kann die zum Verdampfen zugeführte Energie eine thermolytische Zersetzung der Probensubstanz bewirken. Um eine solche Zersetzung zu verhindern, wird nach der Erfindung die Probensubstanz vor dem Bestrahlen mit einem Matrixmaterial vermischt, das aus einer unter der Wirkung des Laserstrahles leicht in gasförmige Moleküle zerfallenden Verbindung besteht. Dabei kann es sich um ein die Strahlung absorbierendes, thermolytisch leicht zerfallendes oder aber ein für die Laserstrahlung durchlässiges, aber mit einem Metallpulver versetztes Material handeln. Wird das Gemisch Laserstrahlimpulsen ausgesetzt, zerfällt zunächst das instabile Matrixmaterial und setzt dadurch die eingebetteten Moleküle der Probensubstanz frei. Insbesondere in Verbin-

dung mit einem kühlenden Gasstrahl läßt sich so eine Zerstörung der Moleküle der Probensubstanz praktisch vollständig vermeiden. Geeignete Verbindungen für die Matrix sind insbesondere Zucker, Cellulose und NH_4NO_3 sowie Polyethylen mit einer Beimengung an Gold-oder Silberstaub.

EP 0 333 912 A2

Verfahren zum Verdampfen einer Probensubstanz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Verdampfen einer aus großen Molekülen bestehenden Probensubstanz, bei dem die Probensubstanz Laserstrahlimpulsen hoher Energie ausgesetzt wird, so daß die sich an der Oberfläche der Probensubstanz befindenden Moleküle durch die Energie der Laserstrahlimpulse desorbiert werden.

Für die massenspektroskopische Untersuchung ist es erforderlich, feste Probensubstanzen in einen gasförmigen Zustand zu überführen. Ein solcher Vorgang ist dann mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, wenn die Probensubstanz aus sehr großen Molekülen besteht, die durch die Zufuhr der zum Verdampfen erforderlichen Energie leicht zersetzt werden können. Aus der DE-OS 32 24 801 ist ein Verfahren zum Verdampfen einer aus großen Molekülen bestehenden Probensubstanz bekannt, bei dem die Probensubstanz Laserstrahlimpulsen ausgesetzt wird, deren Energie und Dauer so bemessen ist, daß die Probensubstanz schneller verdunstet als sie sich zersetzt. Die dabei entstehenden neutralen Moleküle werden dem Strahl eines Trägergases beigegeben, der durch Expansion adiabatisch gekühlt wird. Indem die neutralen Moleküle in einen Bereich des Strahles eingeführt werden, in dem dieser zu expandieren beginnt, und dieser Bereich auf einer Temperatur gehalten wird, die wesentlich geringer ist als die Zersetzungstemperatur der Probensubstanz, erfolgt eine effektive Kühlung der Moleküle der Probensubstanz, durch die deren Zersetzung weitgehend ausgeschlossen werden soll. Die zur massenspektroskopischen Untersuchung erforderliche Ionisierung der Probenmoleküle erfolgt innerhalb des Strahles des Trägergases zu einem späteren Zeitpunkt.

Obwohl das bekannte Verfahren bei vielen Substanzen mit Erfolg angewendet werden kann, haben die massenspektroskopischen Untersuchungen solcher Substanzen gezeigt, daß sich im Spektrum Linien befinden, die als Zerfallsprodukte der Probensubstanz betrachtet werden können. Eingehende Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Zerfallsprodukte beim Verdampfen der Probensubstanz und nicht bei der späteren Ionisierung entstehen. Diese Zerfallsprodukte verhindern zwar nicht die spektrometrische Feststellung der Probensubstanz, vermindern jedoch die Ausbeute an unveränderten Molekülen und führen zu störenden Linien im Spektrum.

Demgemäß liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Verdampfen von großen Molekülen zur Verfügung zu stellen, bei dem

die Gefahr einer Zerstörung der Moleküle durch die zum Verdampfen zugeführte Energie stark reduziert, wenn nicht sogar gänzlich ausgeschaltet ist.

Diese Aufgabe wird nach der Erfindung dadurch gelöst, daß die Probensubstanz vor dem Bestrahlen mit einem unter dem Einfluß der Laserstrahlimpulse leicht zerfallenden Matrixmaterial vermischt und das aus der Probensubstanz und dem Matrixmaterial bestehende Gemisch den Laserstrahlimpulsen ausgesetzt wird.

Durch das Einbetten der Probensubstanz in ein leicht zerfallendes Matrixmaterial wird die mittels der Laserstrahlimpulse zugeführte Energie auf die Probensubstanz und das Matrixmaterial verteilt und in erster Linie dazu verbraucht, einen Zerfall der Matrix zu bewirken. Durch diesen Zerfall des Matrixmaterials in Gasmoleküle findet in der Umgebung der in die Matrixsubstanz eingebetteten Probenmoleküle eine effektvolle Zerstörung des Materials mit dem Ergebnis statt, daß die Probenmoleküle die Verbindung zur Oberfläche und damit auch zu anderen Molekülen verlieren und dadurch von der Oberfläche der Probensubstanz weggeschleudert werden. Diesen Vorgang könnte man als "lokale Explosion" bezeichnen. Daher werden bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens die empfindlichen Moleküle der Probensubstanz von der Probenoberfläche gelöst, ohne daß sie selbst eine sehr hohe Energie aufnehmen müßten. Zugleich entsteht durch den Zerfall des Matrixmaterials eine Art "Eigenjet", der von der Probenoberfläche weggerichtet ist und dessen Gasteilchen die desorbierten Probenmoleküle schon wirksam abkühlen, bevor sie beispielsweise einen Überschallstrahl erreichen, in dem in der oben beschriebenen Weise eine weitere Abkühlung stattfindet.

Bei einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Matrixmaterial verwendet, das aus mindestens einer thermolytisch leicht in Gasmoleküle zerfallenden Verbindung besteht. Hierbei ist es für einen wirksamen Schutz der Probensubstanz vorteilhaft, wenn ein Gemisch verwendet wird, in dem die Anzahl der Moleküle des Matrixmaterials größer ist als die Anzahl der Moleküle der Probensubstanz. Dabei kann der Anteil der Probensubstanz im Gemisch, je nach Art der Probensubstanz einerseits und der Art der für die Matrix verwendeten Verbindungen andererseits, 10 bis 40 Gew. % betragen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dann besonders wirksam, wenn ein Matrixmaterial verwendet wird, das mindestens eine Verbindung enthält, die Licht mit der Wellenlänge der Laserstrahlimpulse

se absorbiert. In diesem Fall ist besonders gut gewährleistet, daß der wesentliche Teil der durch die Laserstrahlimpulse zugeführten Energie von dem Matrixmaterial absorbiert wird und die Moleküle der Probensubstanz durch die in ihrer Umgebung in gasförmige Moleküle zerfallenden Verbindungen des Matrixmaterials freigesetzt werden.

Die oben genannte Bedingung, daß die das Matrixmaterial bildenden Verbindungen thermolytisch leicht in gasförmige Moleküle zerfallen, wird sowohl von organischen als auch anorganischen Verbindungen erfüllt. Besonders geeignete organische Verbindungen sind Zucker, insbesondere Pentose oder Hexose, aber auch Polysaccharide wie Cellulose. Diese Verbindungen zerfallen thermolytisch zu CO_2 und H_2O , so daß sie keine Rückstände bilden, die zu chemischen Reaktionen führen könnten. An anorganischen Verbindungen ist insbesondere Ammoniumnitrat zu nennen, das praktisch rückstandsfrei zerfällt.

Bei einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in das Matrixmaterial Metallstaub, vorzugsweise Gold- oder Silberstaub mit einer Korngröße von weniger als $40\text{ }\mu\text{m}$, eingebettet. In diesem Fall können auch Matrixmaterialien verwendet werden, die nicht infolge der Absorption der Laserstrahlung thermolytisch zersetzt werden. Obwohl diese Theorie nicht vollständig gesichert ist, kann angenommen werden, daß an der Oberfläche der Metallteilchen Plasmawellen entstehen, die sich als Schockwellen ausbreiten und an der Oberfläche des Matrixmaterials ein Zerreißen der Matrix und damit wiederum ein Freisetzen der eingebetteten Moleküle bewirken. Als besonders geeignet hat sich für diese Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verwendung eines Polyethylens als Matrixmaterial erwiesen. Die Verwendung von Polyethylen hat den besonderen Vorteil, daß dieses Material bereits in der Infrarot-Spektroskopie als Matrixmaterial verwendet wird und daher erprobte Materialien und Geräte zur Einbettung der Probensubstanz in solches Polyethylen zur Verfügung stehen.

So können insbesondere aus dem Matrixmaterial und der Probensubstanz Pellets geformt und den Laserstrahlimpulsen ausgesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wurde zur Verdampfung von organischen Verbindungen angewendet, die in ihrer chemischen Zusammensetzung stark variieren. So läßt es sich ohne weiteres bei Molekülen, die stark polare Gruppen haben, als auch bei unpolaren Molekülen anwenden. Zu den ersten gehören Verbindungen mit acidischem und/oder basischem Charakter, wie z.B. Peptide, Aminosäuren und Farbstoffe, während zu den letzten aromatische und nicht aromatische Kohlenwasserstoffe zählen. Dabei hat sich als besonders vorteilhaft herausgestellt, daß die Totalausbeute an

desorbierten Probenmolekülen gegenüber der Verdampfung ohne die Vermischung mit einem Matrixmaterial, je nach der Art der Probensubstanz, um einen Faktor 4 bis 10 erhöht werden konnte.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Pellets aus einem spektroskopischen Polyethylen, das für Strahlung im Bereich von $10\text{ }\mu\text{m}$ Wellenlänge durchlässig ist, mit einem Anteil von etwa 10^{-1} bis 10^{-2} Gew.T. der Probensubstanz und etwa 10^{-1} bis 10^{-2} Gew.T. an Gold- oder Silberstaub hergestellt und der Strahlung eines CO_2 -Lasers ausgesetzt. Auf diese Weise ist es gelungen, nicht nur die Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens erheblich zu steigern, sondern auch Moleküle der Massenspektroskopie zuzuführen, deren massenspektroskopische Untersuchung bisher unmöglich schien, nämlich Nukleotide.

Die Erfindung wird im folgenden anhand einiger Beispiele näher beschrieben und erläutert, deren Ergebnisse durch die in den Fig. 1 bis 9 der Zeichnung dargestellten Diagramme wiedergegeben werden.

Bei den durch die Fig. 1 bis 4 veranschaulichten Beispielen wurde zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Probe, die sich auf einem wenige Millimeter unterhalb einer Überschall-Strahldüse angeordneten Probenträger befand, mit einem IR-Laserstrahlimpuls bestrahlt, dessen Energie 50 mJ und dessen Dauer $20\text{ }\mu\text{s}$ betrug. Der Überschall-Gasstrahl wurde jeweils nach einem IR-Laserstrahlimpuls eingeschaltet, so daß die durch den Laserstrahlimpuls erzeugten gasförmigen Produkte von dem Überschall-Gasstrahl mitgenommen und bei der Expansion des Gasstrahles gekühlt wurden. Der Gasstrahl wurde dann durch Einrichtungen zum Entfernen jeglicher Kationen geführt, so daß in einen folgenden Ionisationsbereich nur neutrale Moleküle eintreten, in dem ein UV-Laserstrahl den Gasstrahl schneidet. Von dem UV-Laser wurden Laserstrahlimpulse von 5 ns Dauer mit einer Energie von $300\text{ }\mu\text{J}$ erzeugt. Die dadurch erzeugten Kationen wurden einem Flugzeit-Massenspektrometer zugeführt und mit einer Mehrkanal-Plattenanordnung detektiert. Das verwendete Flugzeit-Massenspektrometer war von der in Anal. Instrum., 16, 151 (1986) beschriebenen Art. Die typische Massenauflösung liegt im Bereich von 6000 bis 10000 nach der FWHM-Definition.

Bei den mit der beschriebenen Einrichtung untersuchten Probensubstanzen handelte es sich um Dipeptide. Es wurden etwa 1 mg des Peptids in $50\text{ }\mu\text{l}$ Wasser aufgeschlämmt und es wurden dann $20\text{ }\mu\text{l}$ dieser Aufschlämmung auf den Probenträger aufgebracht. Bei den meisten der erhaltenen Spektren wurden etwa 10% der auf den Probenträger aufgetragenen Substanz zur Erzeugung des Spektrums verbraucht.

In gleicher Weise wurden Mischungen von Di-peptiden und Matrixmaterialien hergestellt. Es wurde 1 mg des Peptids in 50 ml einer wässrigen Lösung der gewünschten Matrixverbindung aufgeschlämmt und es wurden dann 20 ml der resultierenden Aufschlämmung auf dem Probenträger aufgebracht. In beiden Fällen wurde das Wasser einfach durch Trocknen an der Luft entfernt. Als Matrixverbindungen wurden Sucrose und Glucose verwendet. Das verwendete Wasser war dreifach deionisiert.

Fig. 1 zeigt das auf die vorstehend beschriebene Weise erhaltene Massenspektrum des reinen Peptids Leucin-Tryptophan. Neben der Linie 1 für das reine Peptid mit der sich aus der auf der Abszisse aufgetragenen Flugzeit ergebenden Masse M zeigt das Spektrum eine weitere Linie 2 einer Substanz der Masse $M - 18$. Fig. 2 zeigt das Spektrum des gleichen Peptids Leucin-Tryptophan, jedoch nach Einbetten des Peptids in eine Glucosematrix im Verhältnis 1 mg Glucose pro 1 mg Peptid. Die Vermischung mit der Glucose hat eine fast vollständige Unterdrückung der Linie $M - 18$ zur Folge, die auf eine Zerstörung eines Teiles der Peptid-Moleküle bei der Verdampfung zurückzuführen ist.

Ähnlich wie die Fig. 1 und 2 zeigen auch die Fig. 3 und 4 das Spektrum eines reinen Peptids bzw. eines in eine Sucrose-Matrix eingebetteten Peptids. Als Peptid findet diesmal Methionin-Tyrosin Verwendung. Auf der Abszisse der Diagramme nach den Fig. 3 und 4 ist diesmal das Massen/Ladungs-verhältnis M/Z aufgetragen, während die Koordinate wiederum die Intensität der Linien wiedergibt. Bei der Ionisation der Substanz entstand nur das A_1 Fragment mit $M/Z = 104$. Die Bezeichnung A-Fragment beruht auf der Roepstroff-Fohlman-Nomenklatur [Biodmed. Mass Spectrom. 11,601 (1984)].

Ähnlich wie bei dem durch die Fig. 1 und 2 veranschaulichten Versuch tritt auch hier bei der Verdampfung des reinen Peptids eine Fragmentation des Peptids ein, die zu der Linie mit der Massenzahl $M - 18$ führt. Dagegen verschwindet diese Linie vollkommen, wie aus Fig. 4 ersichtlich, wenn das Peptid in eine Sucrosematrix eingebettet wird. Es ist ohne weiteres verständlich, daß das erst nach der Verdampfung der Peptidmoleküle bei der Ionisation entstehende A_1 -Fragment auch bei dem Verdampfen des Peptids in einer Sucrosematrix erhalten bleibt.

Es sei noch erwähnt, daß an den Proben, die zu den vorstehend behandelten Spektren geführt haben, die Pyrolyse der Zuckermatrix als Schwärzung der Probe durch die Einwirkung der wiederholten Laserstrahlimpulse erkennbar war. Eine solche Schwärzung trat bei den Proben, welche die reinen Peptide enthielten, nicht ein. Es ist anzuneh-

men, daß die Zersetzung der Zucker eine pyrolytische Dehydratation der Peptide verhindert, weil die Pyrolyse des Zuckers zu einem Überschuß an Wasser in der Umgebung der Peptid-Moleküle führt, wodurch die Dehydratations-Reaktion der Peptide in die andere Richtung getrieben wird.

Für die durch die Diagramme nach den Fig. 5 bis 9 veranschaulichten Beispiele wurden, soweit nichts anderes angegeben, aus 5 mg pulverförmigem Polyethylen, etwa 0,1 mg pulverförmigem Silber oder Gold und der angegebenen Menge der Probensubstanz Pellets hergestellt. Diese Pellets wurden der Strahlung eines getasteten TEA-Lasers mit einer Wellenlänge von 10,6 μm und einer Pulsleistung von 10 mJ ausgesetzt. Der von dem Laser erzeugte Puls war bimodal und hatte eine kurze, scharfe Spitze von 2 μs Dauer (d.h. FWHM = 2 μs) und eine breite Rückflanke von 20 μs Dauer (d.h. FWHM = 20 μs). Die Intensität der Rückflanke betrug nur etwa die Hälfte der Intensität der scharfen Spitze. Die durch die Laserstrahlimpulse desorbierten Moleküle der Probensubstanz gelangten in einen von einer Überschall-Düse erzeugten Gasstrahl, die sich in einem Abstand von 1 bis 2 mm von der Desorptionsstelle befand. Der Staudruck des Strahls betrug 1 bis 2 bar. Die Moleküle der Probensubstanz verteilten sich über den Gasstrahl nach einem Flug von 80 mm in Richtung auf den Ionisationsbereich. Das verwendete Massenspektrometer war das gleiche wie bei den vorhergehenden Beispielen.

Die Fig. 5 und 6 veranschaulichen die bedeutende Steigerung der Empfindlichkeit, die durch das Einbetten der zu untersuchenden Substanz in eine Matrix aus Polyethylen mit einer Beimengung von Silber erhalten werden kann. So ergeben 10 mg pulverförmiges Leu-Tyr-Leu eine Linie mit einer Intensität, die nur wenig größer ist als die Intensität der Linie, die von nur 100 ng in Polyethylen mit Silber eingebettetes Leu-Tyr-Leu erhalten wird, also von einer um 10^{-5} geringeren Menge. Der Grund dafür besteht darin, daß die Verdampfung des in die Polyethylen-Matrix mit der Beimengung von Silberpulver eingebetteten Leu-Tyr-Leu praktisch ohne jegliche Zerstörung der Moleküle erfolgt, während die Substanz ohne schützende Matrix durch den Beschuß mit dem Laserstrahl in einem hohen Maße zerstört wird.

Die Fig. 7 bis 9 veranschaulichen die Spektren von Substanzen, von denen bisher, d.h. ohne die erfindungsgemäße Einbettung in ein Matrixmaterial, überhaupt kein Signal erhalten werden konnte. Das Spektrum nach Fig. 7 zeigt die Linie von Thymin, die von nur 50 μg der Substanz in einer Matrix aus Polyethylen mit Silber erhalten wurde. Das Spektrum nach Fig. 8 wurde unter Einsatz von sogar nur 10 μg Adenosin in einer Goldstaub enthaltenden Matrix erhalten. Endlich zeigt Fig. 9 das Spektrum

von tris-Ru-Bipyridylacetat. Die eingesetzte Menge betrug nur 20 yg in einer Gold enthaltenden Matrix.

Ansprüche

1. Verfahren zum Verdampfen einer aus großen Molekülen bestehenden Probensubstanz, bei dem die Probensubstanz Laserstrahlimpulsen hoher Energie ausgesetzt wird, so daß die sich an der Oberfläche der Probensubstanz befindenden Moleküle durch die Energie der Laserstrahlimpulse desorbiert werden,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Probensubstanz vor dem Bestrahlen mit einem unter dem Einfluß der Laserstrahlimpulse leicht zerfallenden Matrixmaterial vermischt und das aus der Probensubstanz und dem Matrixmaterial bestehende Gemisch den Laserstrahlimpulsen ausgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Matrixmaterial verwendet wird, das aus mindestens einer thermolytisch leicht in Gasmoleküle zerfallenden Verbindung besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch verwendet wird, in dem die Anzahl der Moleküle des Matrixmaterials größer ist als die Anzahl der Moleküle der Probensubstanz.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil der Probensubstanz im Gemisch 10 bis 40 Gew.% beträgt.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Matrixmaterial verwendet wird, das mindestens eine Verbindung enthält, welche Licht mit der Wellenlänge der Laserstrahlimpulse absorbiert.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als eine das Matrixmaterial bildende Verbindung ein Zucker, insbesondere eine Pentose oder Hexose, verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als eine das Matrixmaterial bildende Verbindung ein Polysaccharid, insbesondere Cellulose, verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als eine das Matrixmaterial bildende Verbindung Ammoniumnitrat verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in das Matrixmaterial Metallstaub, vorzugsweise Gold- oder Silberstaub mit einer Korngröße von weniger als 40 µm, eingebettet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als eine das Matrixmaterial bildende Verbindung ein Polyethylen verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß aus dem Matrixmaterial und der Probensubstanz und ggf. dem Metallstaub Pellets geformt und den Laserstrahlimpulsen ausgesetzt werden.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Pellets aus einem spektroskopischen Polyethylen, das für Strahlung im Bereich von 10 µm Wellenlänge durchlässig ist, mit einem Anteil von etwa 10^{-4} bis 10^{-5} Gew.T. der Probensubstanz und etwa 10^{-4} bis 10^{-5} Gew.T. an Gold- oder Silberstaub hergestellt und der Strahlung eines CO₂-Lasers ausgesetzt werden.

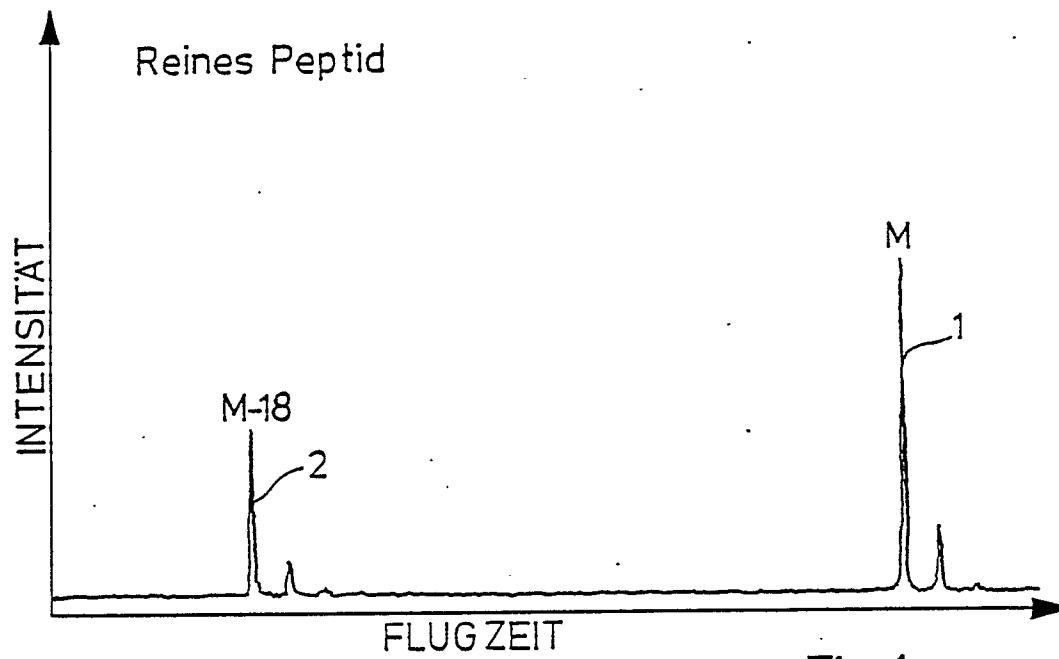


Fig. 1

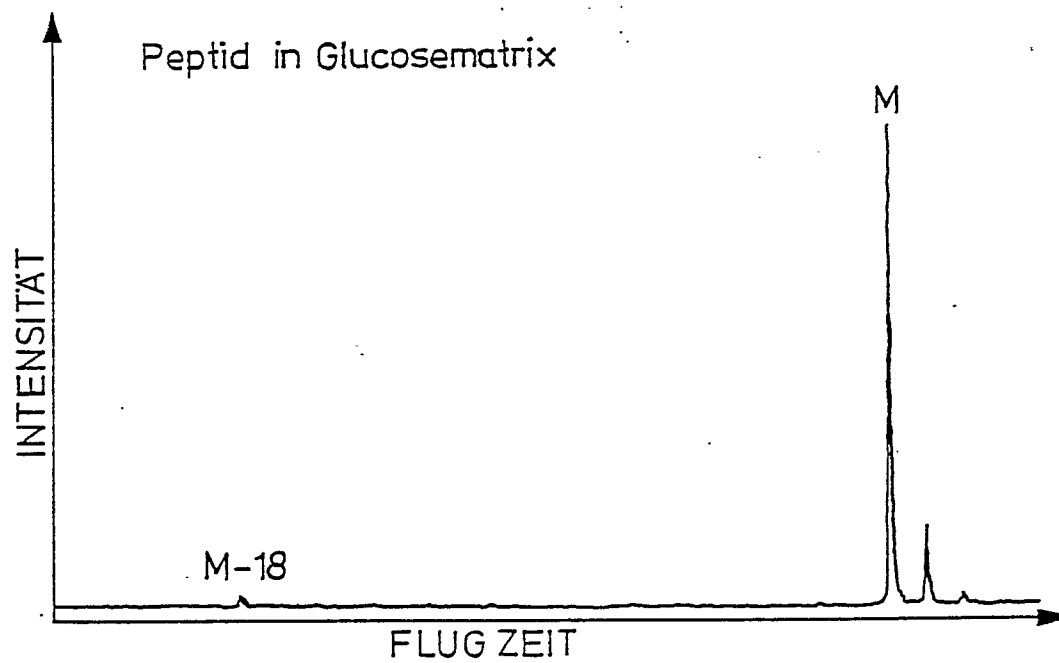
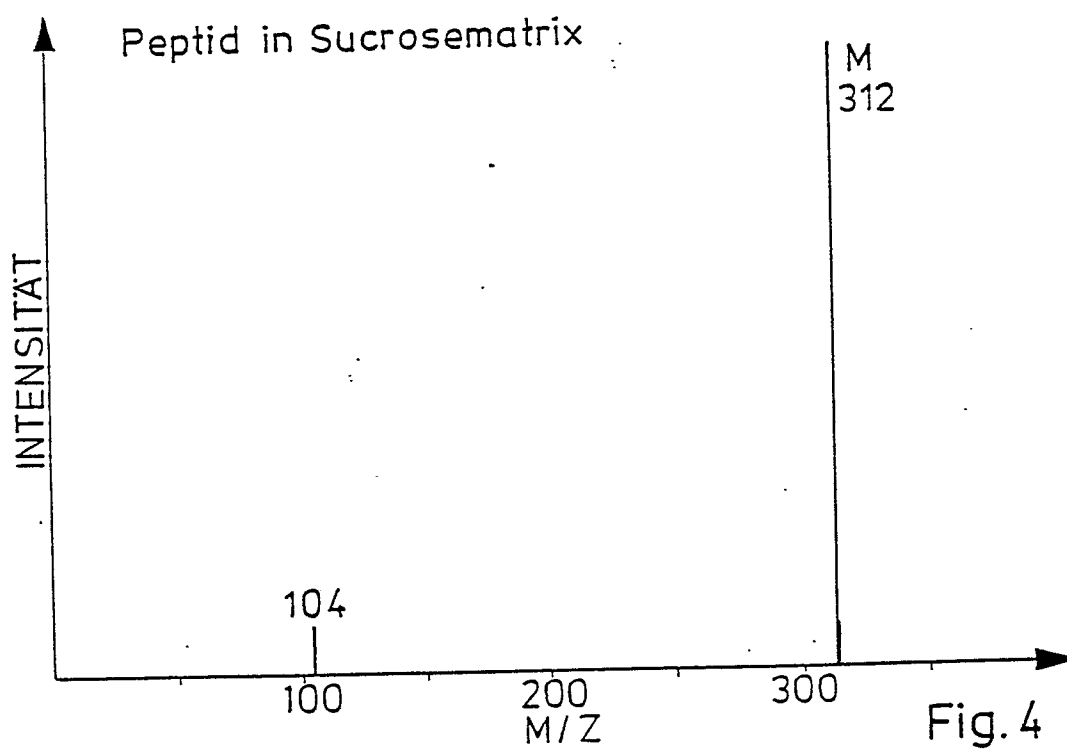
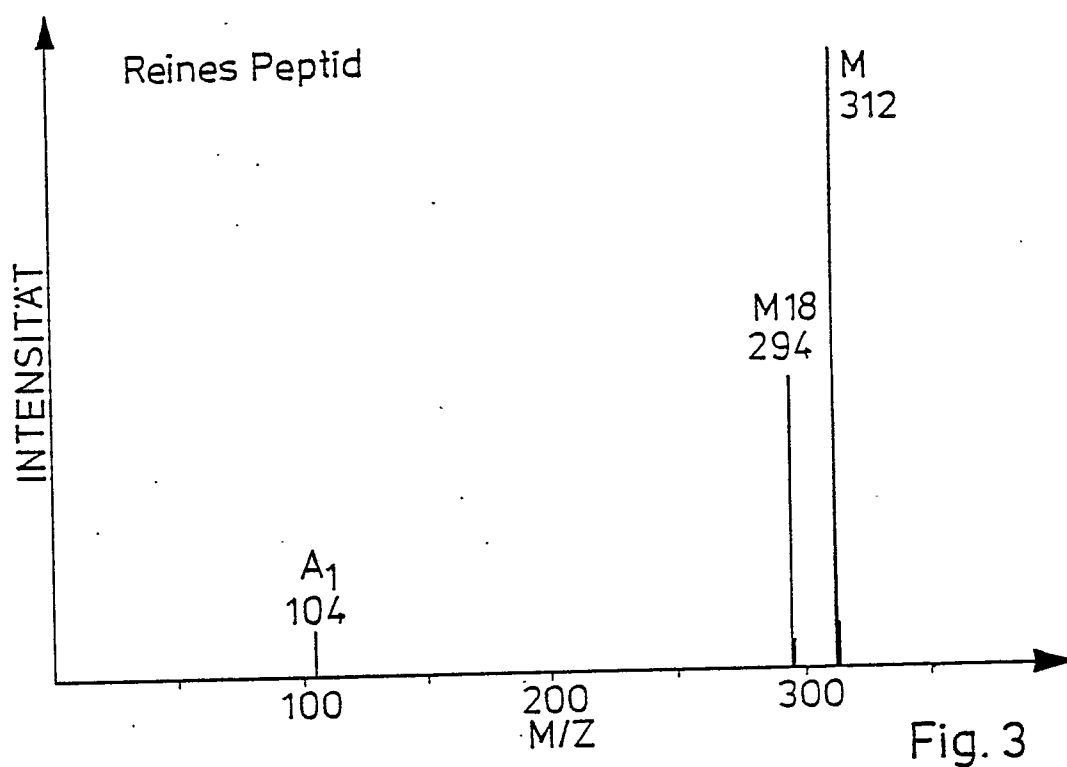


Fig. 2



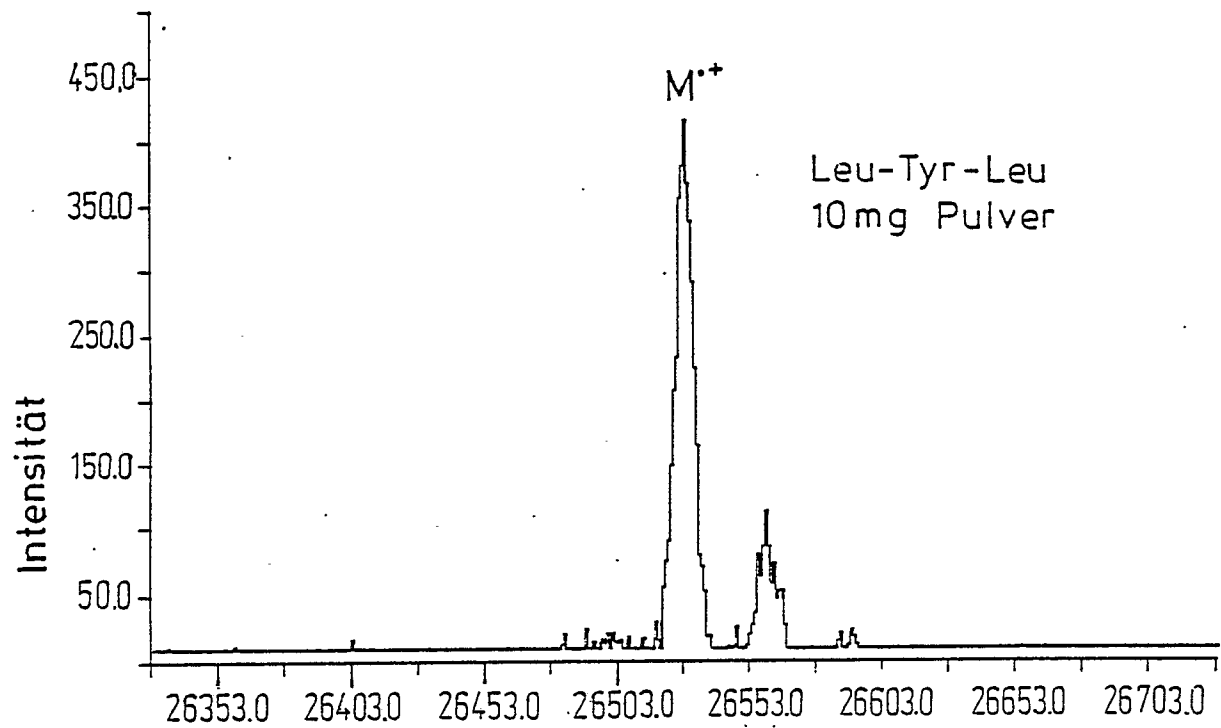


Fig. 5

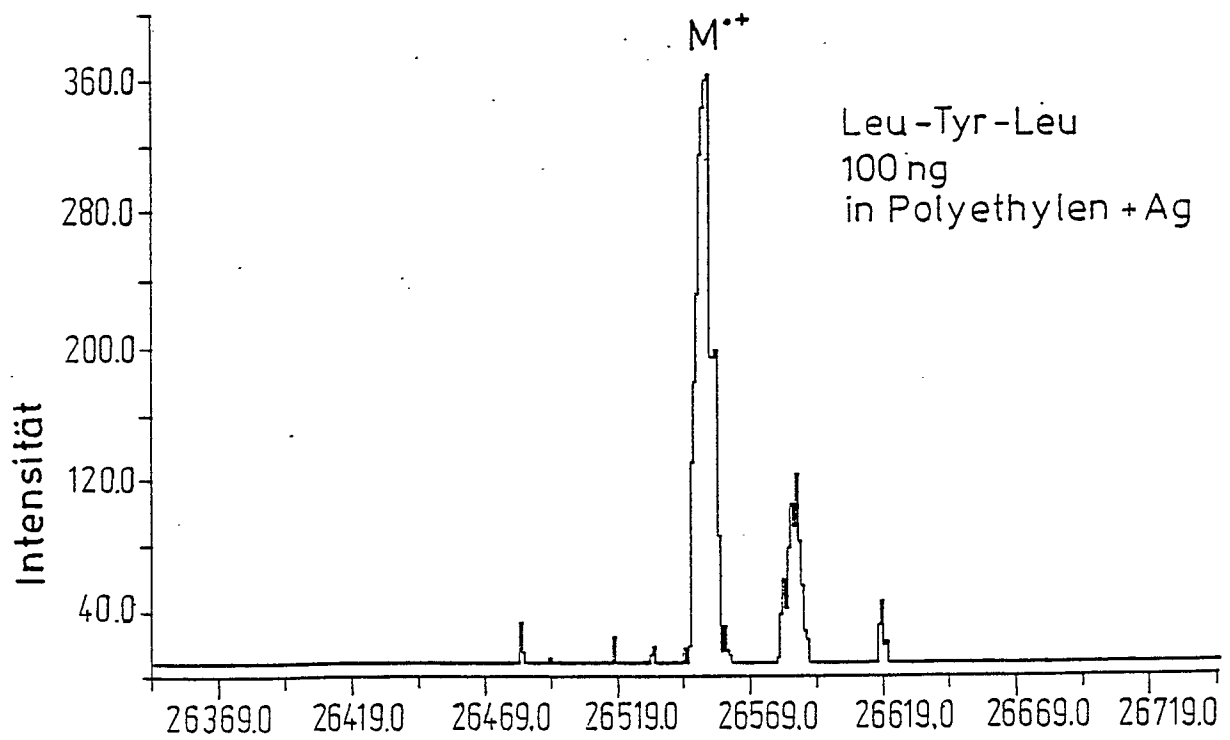


Fig. 6

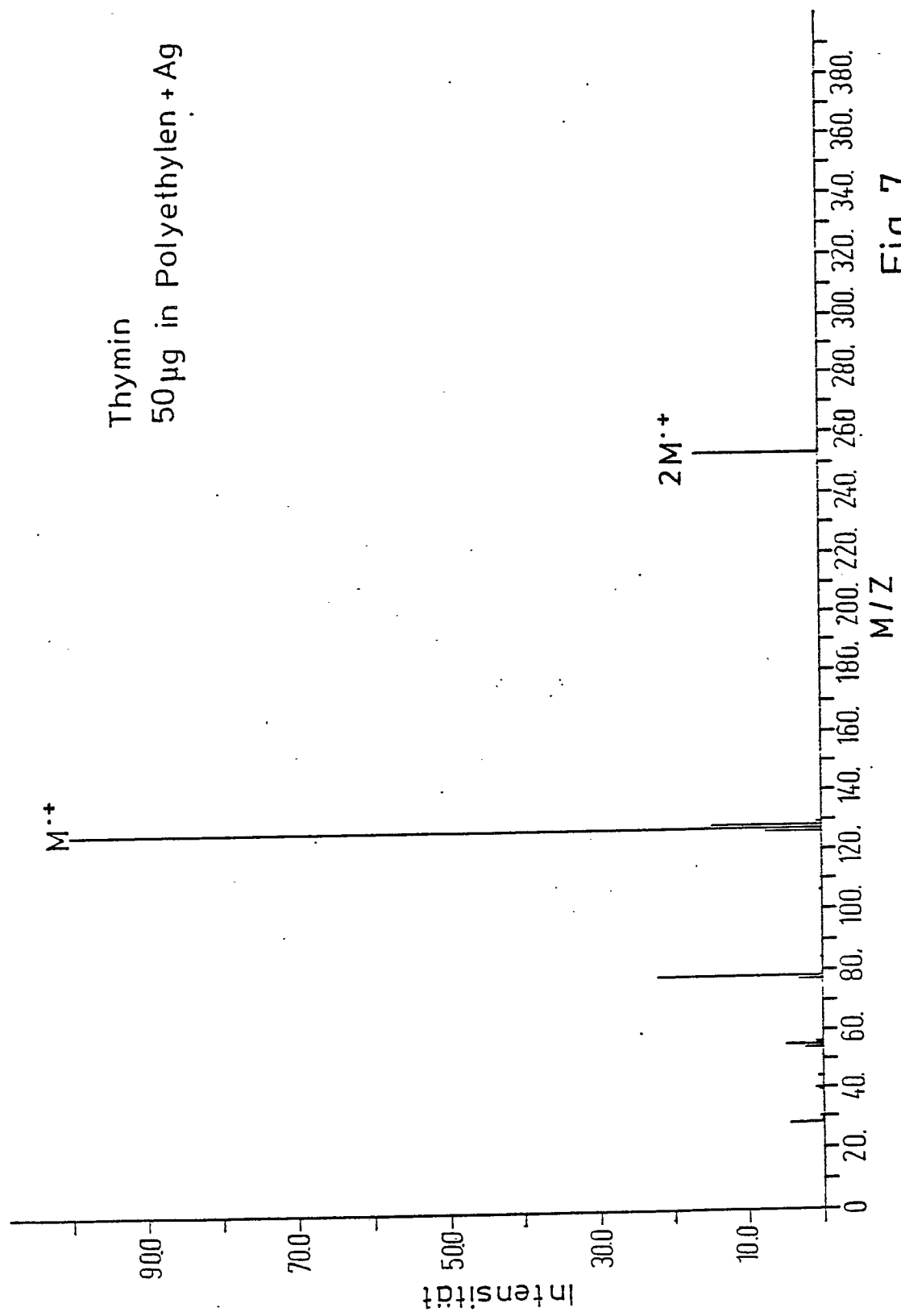


Fig. 7

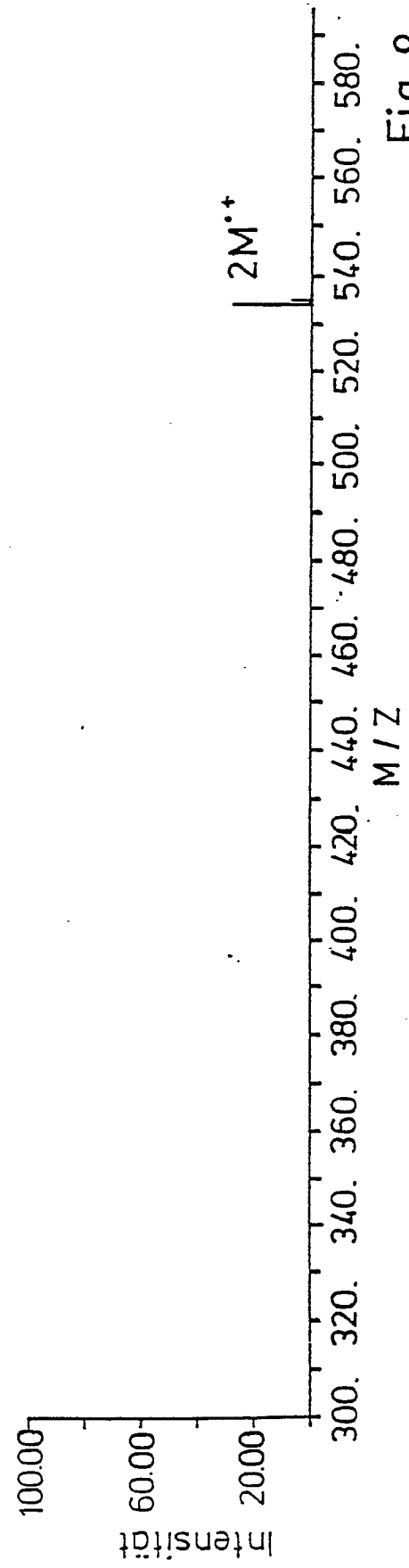
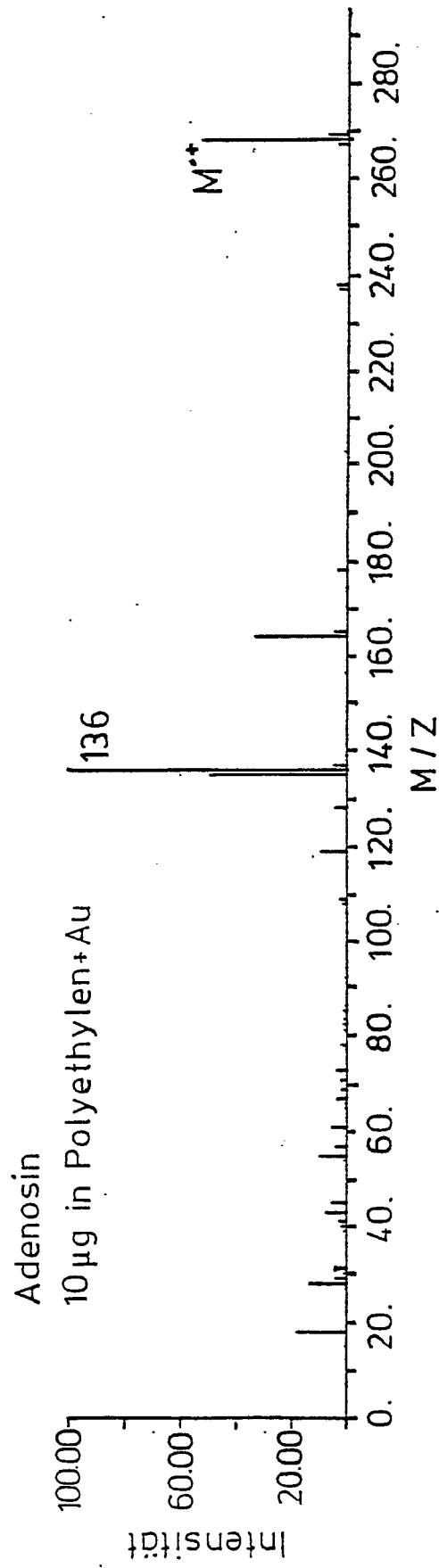


Fig. 8

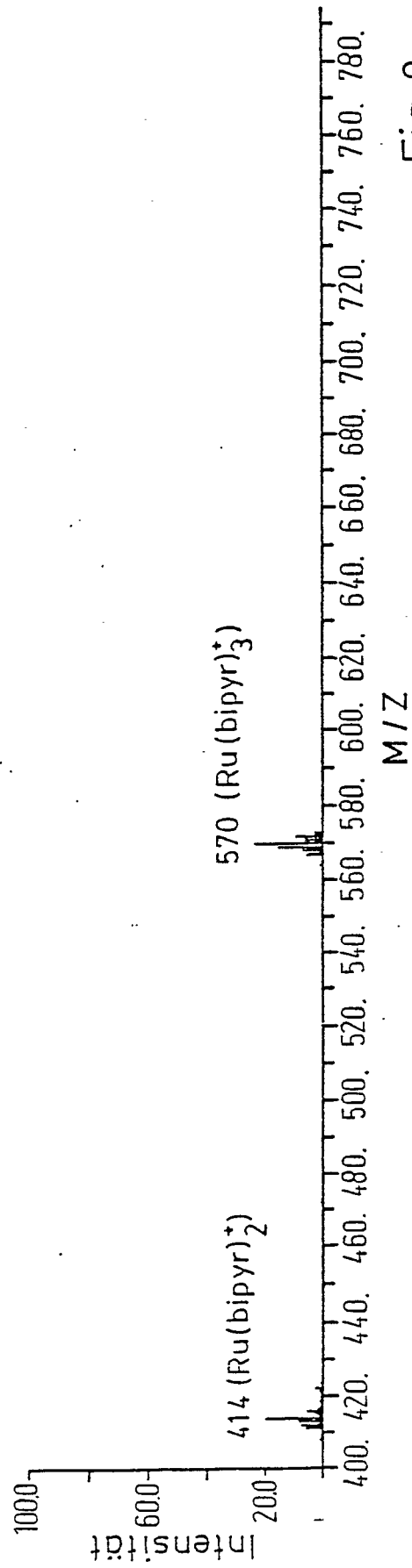
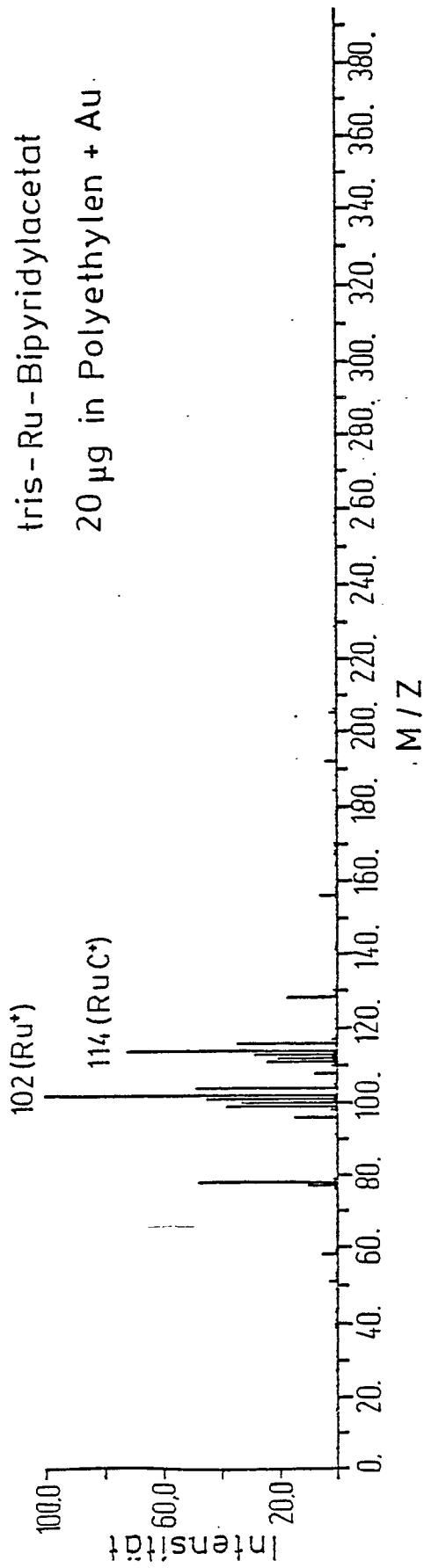


Fig.9