

## Instrumentální analytické metody

**B. Optické analytické metody** – využívají jevů spojených se vznikem elektromagnetického záření, jakož i různé jevy spojené se vzájemnou interakcí záření s analyzovanou látkou. Pomocí různých zařízení a přístrojů měříme optické veličiny, které jsou v nějakém matematicky definovaném vztahu s měřenou veličinou.

Optické analytické metody dělíme na :

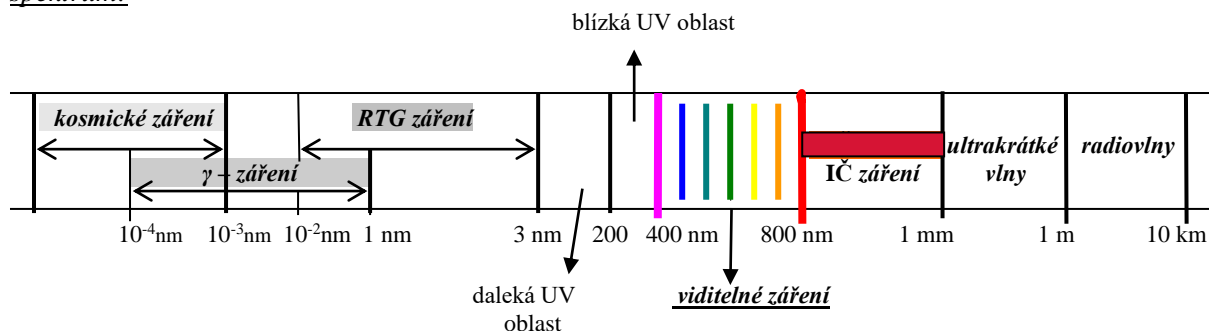
- 1) emisní spektrální metody, např. spektrální analýza a plamenová fotometrie, plamenová spektrofotometrie,
- 2) absorpční spektrální metody, např. spektrofotometrie, fotometrie, kolorimetrie,
- 3) jiné optické metody, např. refraktometrie, polarimetrie.

### Některé základní fyzikální pojmy používané v popisu optických analytických metod

Mezi obecné základní optické pojmy patří:

- a) **elektromagnetické záření** je druh záření (vlnění) tvořený elektrickou a magnetickou složkou, jejichž vektory jsou v rovinách na sebe kolmých a jejich kmity mají různý směr,
- b) **vlnová délka  $\lambda$**  elmag. záření je vzdálenost mezi vrcholy dvou sousedních maxim; udává se v nm ( $10^{-9}$  m). Vlnová délka rozděluje elmag. záření na **záření viditelné** – **světelné záření** neboli **světlo** ( $\lambda$  je v rozsahu 380 – 760 nm), záření **ultrafialové** – UV ( $\lambda$  je kratší než 380 nm) a záření **infračervené** – IČ ( $\lambda$  je delší než 760 nm). Podle stoupajících vlnových délek se mění **zbarvení** elmag. záření – fialová, modrá, modrozelená, zelená, žlutá, oranžová, červená. Z toho plyne, že každé barvě světla odpovídá určitá vlnová délka.

Uspořádání elektromagnetických vln podle stoupající vlnové délky nazýváme elektromagnetické spektrum:



- c) **kmitočet (frekvence)  $f$**  elmag. záření udává počet kmitů za sekundu; udává se v  $s^{-1}$  a jednotkou je hertz (Hz), který odpovídá jednomu kmitu za sekundu.
- d) **rychlost šíření elmag. záření  $c$**  je pro všechny druhy záření přibližně stejná; ve vakuu činí asi 300 000 km/s.
- e) **energie elmag. záření  $E$**  ( $J \cdot mol^{-1}$ ) – přísluší jednotlivým typům záření a je charakteristická pro určitou vlnovou délku. Platí vztah:

$$E = h \cdot f = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

z něhož je patrné, že energie záření je nepřímou úměrná vlnové délce. Pro oblast viditelného světla je energetické rozmezí 30 až  $15 \cdot 10^4 J \cdot mol^{-1}$ .

$h$  ..... je tzv. Planckova konstanta;  $h = 6,625 \cdot 10^{-34} J \cdot s$

f) **druhy záření:**

- **polychromatické záření** – obsahuje různé vlnové délky; např. bílé světlo obsahuje všechny vlnové délky z viditelné oblasti spektra,
- **monochromatické záření** – obsahuje jen jednu vlnovou délku (lépe velmi blízké vlnové délky); lze je získat z bílého světla pomocí různých monochromátorů (např. filtrů, hranolů nebo mřížek).
- **polarizované světlo** – je záření, jehož kmity jsou pouze v jedné rovině kolmé na směr šíření záření. Lze je získat různými způsoby (lomem, odrazem, dvojlomem). Nejčastěji používáme tzv. Nikolův hranol, který je z islandského vápence.

- g) **barva předmětu** – je dána jeho schopností absorbovat a odrážet záření některých vlnových délek viditelné oblasti spektra. Barvu předmětu (látky) určují vlnové délky odraženého záření. Jsou to tzv. **doplňkové** vlnové délky (viz níže) k vlnovým délkám pohlceným.

Předmět má barvu bílou tehdy, když odráží záření všech vlnových délek. Předmět má barvu černou tehdy, když pohlcuje (absorbuje) všechny vlnové délky a žádnou neodráží. To platí pro látky neprůhledné.

Průhledné látky (např. barevné roztoky) pohlcují část spektra a vidíme je v té barvě, jejíž vlnové délky propustila.

**Doplňkové čili komplementární barvy jsou dvojice barev, které se navzájem doplňují, tj. jejich spojením vznikne bílá barva.**

Schéma doplňkových barev znázorňuje následující tabulka :

<i>Barva vzorku (doplňkové barvy)</i>	<i>Barva pohlceného záření</i>	<i><math>\lambda</math> max. (nm)</i>
Žlutozelená	fialová	400 - 435
Žlutá	modrá	435 - 480
Oranžová	zelenomodrá	480 - 490
Červená	modrozelená	490 - 500
Červenofialová	zelená	500 - 560
Fialová	žlutozelená	560 - 580
Modrá	žlutá	580 - 595
Zelenomodrá	oranžová	595 - 605
Modrozelená	červená	605 - 750

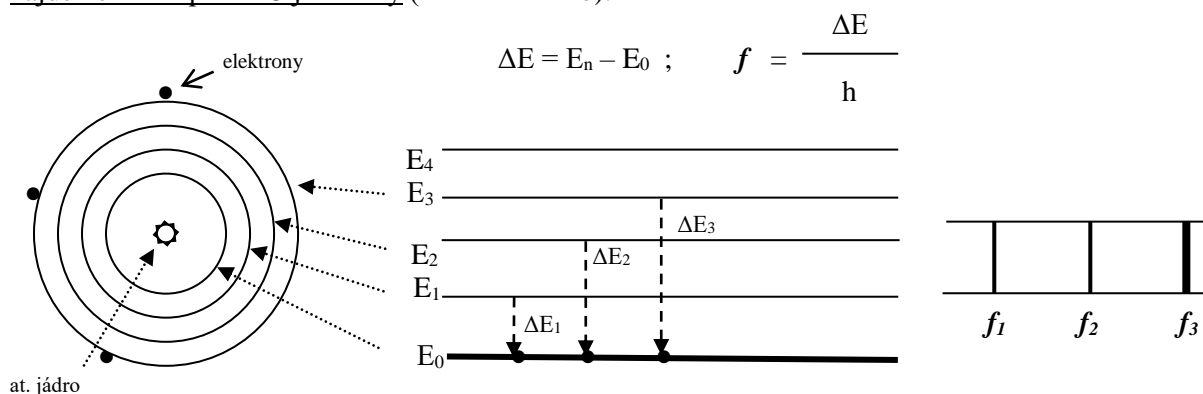
- h) **emise záření** – je vysílání záření nějakou látkou do prostoru. Rozkladem tohoto záření spektrálním zařízením (hranol, mřížka apod.) získáme *emisní spektrum*. Rozborem a interpretací těchto spekter se zabývá *emisní spektrální analýza*.
- ch) **absorpce záření** – je pohlcování elmag. záření při průchodu hmotným prostředím, projevující se zeslabováním intenzity záření. Současně nastává **rozptyl světla**. Velikost obou efektů závisí na charakteru prostředí a vlnové délce záření. V homogenním prostředí je velikost rozptylu zanedbatelná. Velikost absorpce závisí na vlnové délce (absorpční křivka), v homogenním prostředí pak na tloušťce vrstvy a koncentraci roztoku (L. – B. zákon).  
Rozkladem prošlého záření spektrálním zařízením (hranol, mřížka apod.) získáme *absorpční spektrum*. Rozborem a vyhodnocení těchto spekter se zabývá *absorpční spektrální analýza*.
- i) **spektrum** – soubor čar zv. spektrální čáry, uspořádaných podle vlnových délek nebo frekvencí polychromatického záření. Běžně je známé *spojité spektrum* bílého (slunečního) světla, které vzniká průchodem světla hranolem. Jiným a častějším typem spektra je spektrum tvořené samostatnými čarami a nazývá se *spektrum čárové*. Toto spektrum poskytují atomy a molekuly plynů. Čárová spektra mohou být:
- *atomová* – jedná se o soubory izolovaných čar. Jejich polohy v emisním spektru odpovídají záření excitovaných **atomů** v plynném stavu, nebo v absorpčním spektru náleží párám nebo plynům prvků. Každá čára v atomovém spektru zodpovídá přechodu elektronů mezi dvěma energetickými hladinami v atomu. Atomová emisní spektra charakterizují každý prvek. Na tom je založená spektrální emisní analýza.
  - *molekulová* – jsou v emisním i absorpčním spektru tvořena barevnými pásy, které odpovídají přítomným molekulám či radikálům a poskytují je roztoky anorganických i organických látek. Podle vzniku se spektra dělí na spektra *emisní* a spektra *absorpční*. Existují ještě další typy spekter podle charakteru a oblasti vlnových délek záření (např. rentgenová, elektronová, Rammanova, infračervená a další).
  - *emisní spektra* – získáme rozložením emitovaného záření po průchodu spektrálním přístrojem. Jejich rozborem se zabývá emisní spektrální analýza.
  - *absorpční spektra* – vznikají rozložením absorbovaného polychromatického záření po průchodu záření nějakým prostředím. Toto prostředí absorbuje záření o kmitočtech

odpovídajících kmitočtům pohybu molekul, atomů a atomových skupin v molekule (molekulová absorpční spektra, používaná v analytické chemii a strukturální analýze). Poloha jednotlivých pásů ve spektru charakterizuje jednotlivé skupiny atomů v molekule, resp. samotné molekuly (kvalitativní faktor). Intenzita absorpčních pásů je pak úměrná množství příslušné látky (kvantitativní faktor). Rozbore a hodnocení těchto spekter je předmětem absorpční spektrální analýzy.

## 1. Emisní spektrální analýza

Zakladateli těchto metod jsou G. Kirchhoff a R.W. Bunsen v polovině 19. století. Podstata této metody spočívá v tom, že zkoumaná látka se vkládá do zdroje záření (el. jiskra nebo el. oblouk, plamen apod.), a tato látka sama vydává záření, které po průchodu spektrálním zařízením (spektrograf) poskytuje *čárové emisní* spektrum. Podle polohy čár ve spektru (vlnové délky) se určuje kvalita obsažených prvků a podle intenzity spektrálních čár je možné určit jejich obsah (kvantita).

Důkaz prvků provádíme metodou tzv. *posledních, zbytkových čili rezonančních čár*, které odpovídají přeskokům excitovaných elektronů z energeticky nejbližších hladin na hladinu základní. Tyto čáry jsou nejintenzivnější a charakteristické pro jednotlivé prvky. Poloha čáry udává zároveň vlnovou délku příslušného záření. Hodnoty  $\lambda$  spektrálních čár v získaném emisním spektru zjišťujeme porovnáním polohy těchto čár s normálem, tj. s *čárovým spektrem železa*. Toto spektrum je velmi bohaté na spektrální čáry a jím odpovídající  $\lambda$ . resp.  $f$ . Prvek považujeme za prokázáný teprve tehdy, najdeme-li ve spektru 3 jeho čáry (viz Obr. č.1.1b).



Obr. č.1.1a přeskoky elektronů po excitaci z energeticky nejbližších hladin

Obr. č.1.1b čárové spektrum

Emisní spektrální analýza má značný význam v anorganické analýze, zejména ve strojírenském a hutnickém průmyslu pro stanovení kovů. Používá se rovněž při stanovení stopových množství biogenních prvků v popelu zkoumaného vzorku.

Mezi používané metody emisní spektrální analýzy patří *plamenová fotometrie, plamenová spektrofotometrie a plamenová spektrografie*.

**Plamenová fotometrie** je založená na principu emisní spektrální analýzy. Jako budící (excitací vyvolávající) zdroj je nejčastěji používán plamen směsi acetylen – vzduch (teplota plamene je okolo 2100°C) nebo acetylen - kyslík (3100°C). Pro vzniklé záření může být charakteristické zbarvení plamene (sodík zbarvuje plamen žlutě, lithium karmínově červeně, draslík fialově atd.). Spektrálním přístrojem – spektrografem, který rozloží procházející záření na jednotlivé spektrální čáry, se vytvoří na zobrazovací ploše *spektrum*.

Pro vznik spekter a dělení spektrálních čár používáme buď filtry (filtrovaná plamenová fotometrie), hranoly nebo mřížky (plamenová spektrofotometrie). Provádíme-li záznam spekter na fotografickou desku jedná se o plamenovou spektrografii.

Kvalitativní rozbor provádíme porovnáním získaného spektra s čárovým spektrem normálu, kterým je nejčastěji obloukové nebo jiskrové čárové emisní spektrum železa.

Ke kvantitativnímu posouzení vzorku využíváme intenzity zbarvení spektrálních čár. Existuje řada vyhodnocovacích metod. Nejčastěji se využívá princip fotoelektrické indikace (fotoelektrický proud je úměrný intenzitě čáry a tudíž na koncentraci látky), umožňující zároveň automatizaci celého procesu. Pracujeme metodou analytické, *kalibrační křivky*, kterou získáme tak, že k naměřeným hodnotám

intenzit proudů (svislá osa – y) přiřadíme odpovídající koncentrace látky - standardy (vodorovná osa – x) v mmol/l.

V současné době jsou naměřené údaje automaticky vyhodnocovány a zpracovávány digitálně nebo pomocí výpočetní techniky.

Plamenová fotometrie se používá zejména ke stanovení malých množství alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Koncentrace vzorku jsou v rozmezí 1 – 180 mmol (od 1 µg do 1 g/100 ml).

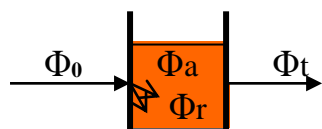
## **2. Absorpční spektrální analýza (v oblasti elektronových spekter)**

Absorpční spektrální analýza, jinak absorpční spektroskopie, studuje absorpční spektra (přesněji elektronová absorpční spektra), vznikající rozkladem záření (viditelného i UV v blízké oblasti), které prošlo nějakým homogenním hmotným prostředím (roztok, plyn). Absorpční spektrální analýza pracuje se zářením v oblasti viditelného a blízké oblasti UV záření, tj. 185 až 700 nm. Když záření, které opouští absorbující látku, rozložíme hranolem nebo mřížkou, pak za předpokladu, že zdroj světla vysílá spojité spektrum, získáme absorpční spektrum přerušované buď tmavými pruhy, nebo čarami při vlnové délce světla charakterizujícího pozorovanou absorpci. *Pruhová* čili *pásová* absorpční spektra odpovídají molekulám látek a poskytují je roztoky anorganických i organických látek. *Čárová* absorpční spektra náleží plynům nebo párám prvků. Dělí se na *atomová* a *molekulová* spektra. Atomová spektra jsou jednodušší než spektra molekulová, jejichž čáry se hustě seskupují a tvoří téměř pásy.

Použití absorpční spektrální analýzy: Rozbor absorpčních spekter umožňuje řešit vztahy mezi konstitucí látek a její charakteristickou absorpcí. Poloha příslušného absorpčního spektra má kvalitativní povahu, intenzita sledované absorpce má charakter kvantitativní. Výhodou absorpčních spektrálních metod je jejich rychlost a spolehlivost. Často se pracuje s malým množstvím látek, lze stanovit nízké koncentrace – desetiny až setiny procenta. Pro koncentrace roztoku jsou to roztoky o  $c < 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>, podle použité metody až  $c = 10^{-3}$  až  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>.

Pro lepší pochopení absorpční spektrální analýzy připomeneme **úvodem několik základních pojmů:**

**a) průchod světla (elmag. záření) homogenním hmotným prostředím** znázorňuje obrázek



$\Phi_0$ ..... dopadající tok elmag. záření

$\Phi_a$  ..... absorbovaný tok elmag. záření

$\Phi_r$ .....rozptýlený tok elmag. záření

$\Phi_t$ ..... propuštěný (transmitovaný) tok elmag. záření

$$\Phi_0 = \Phi_a + \Phi_r + \Phi_t$$

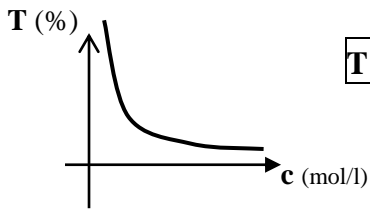
Jelikož  $\Phi_r$  je relativně malé, činí asi 4 %  $\Phi_0$ , lze jej za určitých podmínek zanedbat, pak platí, že

$$\Phi_0 = \Phi_a + \Phi_t$$

**b) transmittance  $T$**  – vyjadřuje poměr propuštěného toku elmag. záření a dopadajícího toku elmag. záření

$$T = \frac{\Phi_t}{\Phi_0} ;$$

Transmittance nabývá hodnot **od 0 do 1 tj. od 0 do 100 %**. Její hodnota závisí na koncentraci roztoku a síle vrstvy (tloušťce kyvety), Je tím menší, čím větší je koncentrace roztoku a tloušťka kyvety. Závislost transmittance  $T$  na molární koncentraci roztoku a síle vrstvy roztoku je dána vztahem (viz níže). Grafem této závislosti je křivka (viz *Obr. č.2.1.* ).



$$T = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

kde  $c$  je látková koncentrace v mol/l,  
 $l$  je tloušťka Yvety v cm,

$\epsilon$  je molární absorpční koeficient, je pro každou látku charakteristická konstanta (viz níže).

Obr. č.2.1. graf závislosti T na c

c) **absorbance A** – (dříve *extinkce*) je logaritmus převrácené hodnoty transmittance. Tedy

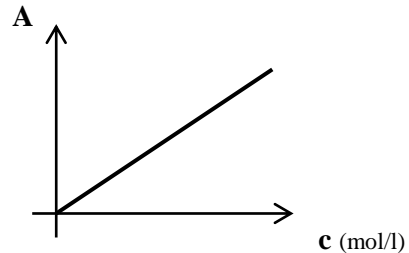
$$A = \log 1/T = -\log T$$

dále pak

$$A = -\log 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

; A nabývá hodnot od 0 do  $\infty$ .



Obr. č.2.2. kalibrační křivka závislosti A na c

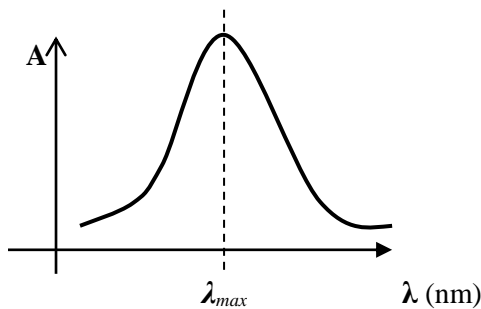
Výše uvedený závěr je znám jako **Lambert – Beerův zákon**. Z tohoto zákona vyplývá, že závislost absorbance **A** na koncentraci roztoku  $c$  při konstantní síle kyvety a konst. vlnové délce je přímková. Grafem je *kalibrační křivka*, z níž je možno ze zjištěné hodnoty absorbance **A** určit koncentraci roztoku. **Zákon Lambert – Beerův vyhovuje pouze pro ředěné roztoky ( $c < 10^{-2}$  mol/l)**. Při těchto koncentracích se neuplatňuje závislost  $\epsilon$  na indexu lomu měřeného roztoku.

Z Lambert – Beerova zákona lze rovněž vypočítat *molární absorpční koeficient*  $\epsilon$  (jinak lze najít v tabulkách).

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l}$$

,  $\epsilon$  je závislý na vlnové délce procházejícího záření. Udává se pro  $l = 1$  cm a  $c = 1$  mol/l (pak  $\epsilon = A$ )

Závislost **A** na  $\lambda$  při konst koncentraci  $c$  a konst. síle vrstvy  $l$  udává přibližný tvar grafu (znázorněna část kalibrační křivky pro závislost **A** na  $\lambda$ ) (viz obr. 2.3.)



Obr. č.2.3. kalibrační křivka pro závislost A na  $\lambda$  (extinkční křivka)

Jelikož velikost absorpce je různá pro různé látky a různé vlnové délky, používáme pro přesná měření monochromatické světlo té vlnové délky, pro kterou v dané látce je absorpce maximální ( $\lambda_{max}$ ). Každá látka má svojí  $\lambda_{max}$ , při které nastává maximální absorpce a při které pak provádíme vlastní měření.

Vlastní měření koncentrace provádíme přímou metodou naměřením absorbance měřeného roztoku a odečtením koncentrace z *kalibrační křivky*. Pracujeme obvykle s takovými koncentracemi, aby **A** se pohybovala v rozmezí 0 až 0,7.

## Rozdělení absorpční spektrální analýzy.

Podle použité přístrojové techniky se absorpční spektrální analýza dělí na:

1. **kolorimetrii** – pracujeme s viditelným zářením, detektorem intenzity záření je oko,
2. **fotometrii**
  - a) *subjektivní* – pracujeme s viditelným zářením, detektorem intenzity záření je oko,
  - b) *objektivní* – pracujeme s viditelným zářením, detektorem intenzity záření je fotočlánek nebo fotonka,
3. **spektrofotometrii** – pracujeme s viditelným nebo UV zářením, detektorem intenzity záření je fotočlánek nebo fotonka,
4. **atomová absorpční spektrofotometrie**

### Princip kolorimetrie

Kolorimetricky měříme koncentraci barevného roztoku porovnáním intenzit zbarvení roztoku o neznámé koncentraci se standardním roztokem (roztok známé koncentrace). Pracujeme při rozptýleném denním světle a k porovnání intenzit používáme oko. Proto říkáme, že kolorimetrie je *vizuální metoda*, je to metoda subjektivní.

Základem měření je *Lambert-Beerův zákon*, z kterého vyplývá, že při stejné intenzitě zbarvení měřeného vzorku a standardu jsou stejné jejich absorbance  $A$ . Musí tedy platit, že **součin koncentrace a síly vrstvy standardu a je roven součinu koncentrace a síly vrstvy měřeného vzorku.**

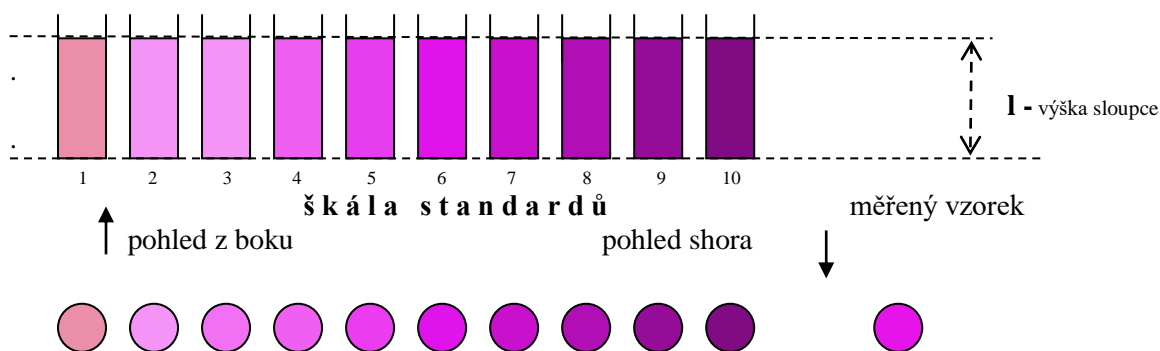
$$c_1 \cdot l_1 = c_2 \cdot l_2 ; \quad \begin{array}{l} \text{indexy 1 jsou pro měřený roztok,} \\ \text{indexy 2 jsou pro standard} \end{array}$$

pak neznámou koncentraci  $c_1$  roztoku vypočítáme ze vztahu

$$c_1 = \frac{c_2 \cdot l_2}{l_1} \quad \text{kde } l_1 \text{ a } l_2 \text{ jsou známé délky (tloušťky) roztoků,} \\ c_2 \text{ je koncentrace standardu.}$$

Pro vlastní stanovení používáme metody:

- a) **porovnávací** – porovnáváme intenzitu zbarvení měřeného roztoku s barevnou škálou standardů (Obr. č. 2.4. )

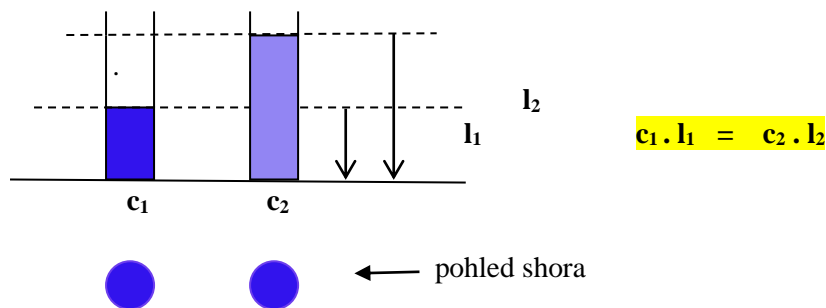


Obr. č. 2.4. barevná škála pro kolorimetrické stanovení

Používané zkumavky i výšky sloupců všech roztoků musí být stejné. Zkoumaný roztok porovnáváme *pozorováním shora* s barevnou intenzitou standardů. Koncentrace zkoumaného roztoku je rovna koncentraci standardu, se kterým se roztok barevně shoduje. Např. pro výše uvedený případ je koncentrace vzorku shodná s koncentrací standardu č. 5

- b) **zřed'ovací** – principem této metody je zřed'ování standardu nebo měřeného roztoku až je barva roztoku při pohledu shora stejná. Roztok intenzivnějšího zbarvení zřed'ujeme rozpouštědlem (např. vodou) tak dlouho, až se barevné intenzity vyrovnají (při pohledu shora). Podle L. – B. zákona musí platit, že pro stejně intenzivně zbarvené roztoky jsou absorbance stejné. Tudiž  $c_1 \cdot l_1 = c_2 \cdot l_2$ , odkud vypočítáme koncentraci měřeného roztoku, neboť  $l_1$  a  $l_2$  změříme a koncentraci standardu známe.

c) **vyrovnávací** – u této metody se mění síla vrstvy (výška sloupce) barevných roztoků tak, až oba roztoky mají při pohledu shora stejnou intenzitu zbarvení (viz Obr. č. 2.5.). Změnu výšky sloupce lze docílit buď upouštěním (snižováním hladiny, výšky roztoku) nebo přidáváním (zvyšováním hladiny, výšky) jednoho z roztoků nebo ponořováním skleněných válečků do kapaliny. Znovu platí L. – B. zákon.



Obr. č. 2.5. Ilustrativní náčrt pro vyrovnávací kolorimetrii

Nevýhodou kolorimetrie je malá přesnost (práce s polychromatickým světlem, detekce okem je málo citlivá a subjektivní). Má proto malé použití.

Přístroje pro kolorimetrická měření se nazývají *kolorimetry* (např. k. Duboscqův)

### Princip fotometrie

Fotometrie je absorpční metoda, která pracuje s monochromatickým zářením z oblasti viditelného světla. Monochromátorem je filtr. K detekci intenzity záření používáme buď oko (*vizuální fotometrie* – subjektivní metoda, méně přesná) nebo fotočlánek (*objektivní fotometrie*, přesnější). Metoda využívá opět L. – B. zákona. Při konstantní vlnové délce  $\lambda_{\max}$ , neměnné tloušťce kyvety  $l$  a stejné hodnotě  $\epsilon$  je  $A \sim c$

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Fotometricky se stanoví barevné roztoky, tj roztoky barevných látek (např.  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  apod.) nebo látek bezbarvých či téměř bezbarvých (např.  $\text{Fe}^{3+}$ ), které se vhodným činidlem (např.  $\text{NH}_4\text{SCN}$  nebo kys. salicylovou) převedou na látku barevnou. Takto lze stanovit anorganické (např.  $\text{PO}_4^{3-}$ ) i organické látky, pH apod. V lékařství se fotometricky stanoví kyseliny salicylová v krvi a v moči, dále cukry v krvi, vitamíny, hormony a další látky.

Přístroje pro fotometrická stanovení se nazývají *fotometry*. Známe jich celou řadu, která se liší konstrukcí a přesností. Nejznámějším, dnes již nepoužívaným přístrojem byl Pulfrichův fotometr.

### Princip spektrofotometrie

Spektrofotometrie je založená na stejném principu jako ostatní absorpční metody. Od fotometrie se liší pouze tím, že monochromatické záření vzniká průchodem světla mřížkou nebo hranolem. Intenzitu prošlého záření detekujeme rovněž fotoelektricky (fotonkou, fotočlánkem nebo fotonásobičem).

Jelikož vlnová délka používaného monochromatického záření je mnohem přesnější (rozdíl od fotometrie či kolorimetrie), jsou dosahované výsledky měření přesnější než u předcházejících provedení. Kromě toho spektrofotometrie může pracovat s vlnovými délkami z blízké oblasti UV záření. To umožňuje spektrofotometricky stanovit látky, např. některé anorganické látky, dále benzen, toluen a jiné organické látky, které jsou ve viditelném světle bezbarvé.

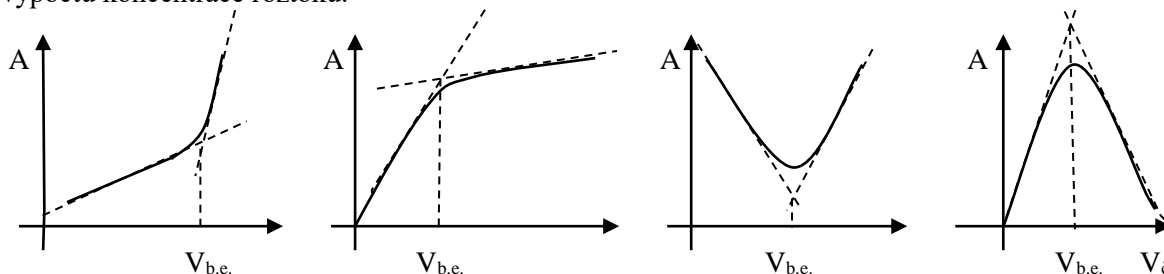
Spektrofotometrie je rozšířená metoda v klinických laboratořích. Umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace roztoku v řádech  $10^{-3}$  až  $10^{-6}$  mol/l. Používá se rovněž k detekci aminokyselin, při kapalinové chromatografii a jinde.

Přístroje používané pro měření se dělí na

- spektrofotometry (spektrofotokolorimetry) – pracujeme při konstantní vlnové délce, zpravidla ve viditelné oblasti spektra (např. Spekol)
- spektrometry – můžeme měřit absorpenci nebo transmitanci při různých vlnových délkách, také v oblasti UV záření (UV – VIS Specord).

*Spektrofotometrická měření* provádíme tak, že proměřením známých standardních roztoků při  $\lambda_{\max}$  záření získáme kalibrační křivku (závislost  $A$  na  $c$  roztoku). Koncentraci měřeného vzorku zjistíme z této křivky vnesením naměřené hodnoty absorpce.

Spektrofotometrická měření lze provádět rovněž formou spektrofotometrických titrací. Pracujeme s konst. vlnovou délkou tak, že ke vzorku přidáváme titrační činidlo (pokud možno dostatečně koncentrované) a sledujeme závislost absorpance na objemu přidaného odměrného činidla. Objem činidla v bodě ekvivalence  $V_{b.e.}$  (odečteme z titrační křivky – viz Obr. č. 2.6.) použijeme dále k výpočtu koncentrace roztoku.



Obr. č. 2.6. Typy spektrofotometrických titračních křivek

Moderní registrační spektrometry jsou plně automatizované a mohou automaticky proměřovat série vzorků a zároveň je přímo vyhodnocovat a tisknout.

### Princip atomové absorpční spektrofotometrie

Je to novější směr spektrální absorpční analýzy využívající absorpční čárová spektra. Tato analytická metoda založena na platnosti Kirchhoffova zákona, podle kterého *každá látka absorbuje záření té vlnové délky, kterou sama vyzařuje*. U prvků se jedná o tzv. *atomovou absorpci*. Atomovou absorpční spektrofotometrii měříme absorpci (úbytek intenzity) záření (přesné vlnové délky) procházejícího plamenem, ve kterém je rozprášen analyzovaný vzorek. Tento úbytek je úměrný koncentraci prvku rozpašovaného do plamene a měří se fotoelektrickým přístrojem, většinou spektrofotometrem (atomový absorpční spektrofotometr). U atomové absorpční spektrofotometrie vyhodnocujeme výsledky metodou analytické (kalibrační) křivky podobně jako u emisní plamenové fotometrie.

Atomové absorpční spektrofotometrie se v praxi využívá při stanovení asi 30 prvků, mj. Na, K, Mg, Ca, Zn, Cu, Ag, Pb a dalších a to jak v anorganických tak i organických materiálech.

Výhodou této metody je zejména možnost přímého stanovení prvků bez předchozí separace. U organických vzorků (biologický materiál) odpadá nepříjemná a zdlouhavá mineralizace.

## Laboratorní úlohy z kolorimetrie

### **Úloha č.1. Zjištění koncentrace roztoku modré skalice (nebo $KMnO_4$ ) metodou porovnávací kolorimetrie (porovnávací kolorimetrie).**

**Princip:** porovnáváme intenzitu zbarvení roztoku neznámé koncentrace se zbarvením roztoků téže látky rozdílných známých koncentrací uspořádaných do barevné škály.

**Pomůcky:** 0,2 M roztok modré skalice (nebo  $5 \cdot 10^{-3} M$  roztoku  $KMnO_4$ ), 11 stejných zkumavek, stojánek na zkumavky.

**Postup:** Do 10 zkumavek odměřte postupně 1 – 10 ml 0,2 M roztoku modré skalice (nebo  $5 \cdot 10^{-3} M$  roztoku  $KMnO_4$ ) a doplňte dest. vodou na celkový objem 10 ml. Zbývající zkumavku naplňte pouze destil. vodou a umístěte do řady jako první. Vypočítejte koncentraci roztoků v jednotlivých zkumavkách a šrafováním, tečkováním nebo barevně znázorněte intenzitu zbarvení roztoků. Zjištěné hodnoty koncentrací zapište do tabulky



**Tabulka**

zkumavka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
V (cm <sup>3</sup> ) Cu <sup>2+</sup> (MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )											
V (cm <sup>3</sup> ) H <sub>2</sub> O											
c (mol/dm <sup>3</sup> )											
sytost zbarvení											

**Úkol:** určete koncentraci neznámého roztoku modré skalice (manganistanu draselného) porovnáním zbarvení v kolorimetrické škále.

**Poznámka:** Podobná úloha – *Kolorimetrické stanovení amoniaku ve vodě* – str. 150, Kozáková, Holada, Maliníková: *Laboratorní technika pro 4. roč. gymnázií*

**Úloha č.2. Zjištění koncentrace roztoku modré skalice (nebo KMnO<sub>4</sub>) metodou vyrovnávací kolorimetrie (porovnávací kolorimetrie).**

**Princip:** Intenzita zbarvení roztoku je při stejné koncentraci závislá na síle barevné vrstvy. Je-li zbarvení stejné při různých koncentracích, musí platit L. – B. zákon. Známe-li výšky sloupců obou roztoků a koncentraci jednoho z nich, lze z L. – B- zákona vypočítat koncentraci neznámého roztoku.

**Pomůcky:** 0,2 M roztok modré skalice (nebo 5.10<sup>-3</sup>M roztoku KMnO<sub>4</sub>), 5 stejných zkumavek, deska z pěnového polystyrenu, (místo stojánku na zkumavky)

**Postup:** Pět stejných zkumavek naplníme zkoumanými roztoky v objemech 2, 4, 6, 8 a 10 ml a změříme výšky sloupců.. Pozorujeme zbarvení při pohledu **shora** proti bílému pozadí. Intenzitu zbarvení, výšky sloupců znovu zaznamenáme do tabulky (viz úloha č.1.).

zkumavka č.	1	2	3	4	5
V cm <sup>3</sup> roztoku					
Výška sloupce v mm					
Sytost zbarvení					

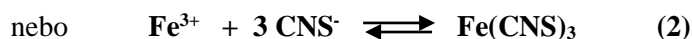
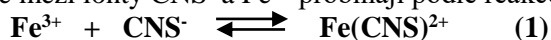
**Úkol:** Určete z Lambert – Beerova zákona koncentraci neznámého roztoku (vzorku) porovnáním intenzity sledovaného roztoku se škálou.

**Úloha č. 3.: Studium rovnováhy při reakci iontů Fe<sup>3+</sup>s thiokyanatanovými CNS<sup>-</sup>**

/ využití metody vizuální vyrovnávací kolorimetrie /

Úloha podle učebnice Jan Čípera a kol.: CHEMIE pro IV. ročník gymnázií (2. díl), SPN Praha, 1974

**Princip:** Reakce mezi ionty CNS<sup>-</sup> a Fe<sup>3+</sup> probíhají podle reakce



Zjištěním (vypočítáním) rovnovážných koncentrací jednotlivých iontů lze určit rovnovážnou konstantu jednotlivých reakcí a zjistit, která z uvedených reakcí je pravděpodobnější. Pro výpočet rovnovážných koncentrací využíváme platnost Lambert – Beerova zákona použitím metody vyrovnávací vizuální kolorimetrie.

Poznámka: Z L. – B. zákona vyplývá, že

$$c_1 \cdot l_1 = c_2 \cdot l_2 ,$$

kde c jsou koncentrace roztoků /c<sub>1</sub>...známá, c<sub>2</sub>...neznámá/ a l jsou výška sloupců roztoků / l<sub>1</sub> ...známého roztoku a l<sub>2</sub>...neznámého roztoku /. Při měření se postupuje tak, že se mění výška standardního roztoku /odebíráním nebo přidáváním/ tak dlouho, až se při pohledu shora jeví oba roztoky stejně intenzivně barevné.

**Pomůcky:** 5 stejných zkumavek o objemu asi 25 ml (označených čísly 1 až 5), 0,002 M roztok thiokyanatanu draselného KCNS, základní roztok dusičnanu železitého  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  o konc. 0,2000 M, destilovaná voda, pipety dělené (1, 2, 5 ml).

**Postup:**

1. *Příprava reakčních směsí:* vyberte 5 stejných zkumavek. Do každé odměřte pipetou nebo injekční stříkačkou 10,00 ml 0,002 M roztoku thiokyanatanu draselného. Potom přidejte do všech zkumavek po 10,00 ml roztoku dusičnanu železitého následujících koncentrací: do 1 zk. – 0,200 M, do 2. zk. – 0,0200 M, do 3. zk. – 0,01 M, do 4. zk. – 0,005 M a do 5. zk – 0,0025 M / *přesná koncentrace jednotlivých roztoků je závislá na přesné koncentraci základního roztoku*. Roztoky dobře promícháme (protřepeme) a umístíme do stojánku.

2. *Stanovení rovnovážné koncentrace komplexu ve 2. až 5. zkumavce:* Rovnovážné koncentrace komplexního iontu ve 2. až 5. zkumavce zjistíme porovnáním intenzity zbarvení jejich roztoku s barvou standardního roztoku (ve zkumavce č. 1). Nejdříve každou z obou porovnávaných zkumavek obalíme bílým papírem a měníme výšku pouze standardního roztoku přidáváním nebo odebíráním roztoku pomocí pipety nebo inj. stříkačky až je intenzita barvy stejná. Při každém stanovení změříme výšku sloupců ( $l_1$  a  $l_2$ ) a zapíšeme do při pravené tabulky. Ze zjištěných hodnot vypočítáme rovnovážné koncentrace komplexního iontu. Ve 2. až 5. zkumavce.

3. *Další výpočty:* Dále výpočtem určíme:

a) *počáteční koncentrace*  $c_{\text{poč.}}$  ( $[ ]_{\text{poč.}}$ ) výchozích látek -  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{poč.}}$ ,  $[\text{CNS}^-]_{\text{poč.}}$ ,

Upozornění: při výpočtu je nutné mít na zřeteli, že celkový objem ve zkumavce je po smíchání obou roztoků 20 ml, tj.  $20 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3$ . Za předpokladu, že jedná složka je ve značném přebytku (v našem případě  $\text{Fe}^{3+}$ ), je koncentrace druhé složky v rovnovážném stavu nulová ( $[\text{CNS}^-]_{\text{rovn.}}$  v 1. zkumavce). *Počáteční konc. thiokyanatanů  $[\text{CNS}^-]_{\text{poč.}}$  je ve všech zkumavkách stejná.*

b) *rovnovážné koncentrace složek* -  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{rovn.}}$ ,  $[\text{CNS}^-]_{\text{rovn.}}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CNS})^{2+}]_{\text{rovn.}}$  příp.  $[\text{Fe}(\text{CNS})_3]_{\text{rovn.}}$ ,

- pro rovnici 1) je  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{rovn.}} = [\text{Fe}^{3+}]_{\text{poč.}} - [\text{Fe}(\text{CNS})^{2+}]_{\text{rovn.}}$   
 $[\text{CNS}^-]_{\text{rovn.}} = [\text{CNS}^-]_{\text{poč.}} - [\text{Fe}(\text{CNS})^{2+}]_{\text{rovn.}}$

- pro rovnici 2) je  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{rovn.}} = [\text{Fe}^{3+}]_{\text{poč.}} - [\text{Fe}(\text{CNS})_3]_{\text{rovn.}}$

$[\text{CNS}^-]_{\text{rovn.}} = [\text{CNS}^-]_{\text{poč.}} - [\text{Fe}(\text{CNS})_3]_{\text{rovn.}}$

c) *hodnoty disociačních konstant* (nejprve pro reakci 1. a pak pro reakci 2.

**Úkoly :**

a) Všechny výpočty uveďte do protokolu – obecný vzorec + číselné údaje /ředění roztoku, výpočty koncentrací roztoků, výpočty rovnovážných konstant),

b) Všechny experimentální a vypočítané údaje zapíšte do tabulky:

Číslo pokusu	Výška sloupce /v mm/		Počáteční koncentrace		Rovnovážné koncentrace			K
	Zkumavka č.1	Další zkumavky	$[\text{CNS}^-]$	$[\text{Fe}^{3+}]$	$[\text{Fe}(\text{CNS})^{2+}]$	$[\text{CNS}^-]$	$[\text{Fe}^{3+}]$	$K_{\text{Fe}(\text{CNS})_2^+}$
1								
2								
3								
4								
5								

c) z hodnot rovnovážných konstant pro obě předpokládané reakce vyvoďte závěr o tom, která z obou uvažovaných reakcí je pravděpodobnější.

### 3. Jiné optické metody

Mezi jiné metody patří ještě:

- 1) *polarimetrie* – optická metoda založená na měření úhlu otočení polarizovaného světla po průchodu opticky aktivní látkou. Velikost úhlu je funkcí koncentrace opticky aktivní látky. Přístroj určený k měření se nazývá polarimetr.
- 2) *refraktometrie* – metoda měření indexu lomu pomocí *refraktometru*. Na základě indexu lomu lze zkoumané látky identifikovat, určit jejich čistotu, koncentraci apod. Stanovení indexu lomu je rychlé, přesné a snadné. K naměřeným hodnotám lze v tabulkách nebo pomocí kalibračních křivek najít příslušné koncentrace. Refraktometrie se uplatňuje zejména v potravinářském průmyslu (cukrovarnictví, pivovarnictví apod.)
- 3) *nefelometrie* – měří intenzitu rozptýleného záření zakaleného (nehomogenního) roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku; měření se provádí kolmo na směr vstupu záření.
- 4) *turbidimetrie* – měří intenzitu zeslabeného záření, které prochází zakaleným roztokem přímo, v závislosti na koncentraci částic v roztoku.
- 5) *interferometrie* – optická analytická metoda, založená na interferenci světla. Na rozdíl od refraktometrie se však neměří přímo index lomu, ale rozdíl indexu lomu mezi dvěma prostředími – prostředím známým, definovaným indexem lomu, a neznámým, měřeným. Využívá se ohybu a interference světla na štěrbíně. Z rozdílů indexů lomu je možno určit analytickou koncentraci měřené látky, vzorku.

Interferometrie se používá k analýze plynů (např. metanu v důlním plynu, kyslíčnicku uhličitého v produktech dýchání, acetonu ve vzduchu a jiné) a velmi zředěných roztoků (např. kontrola čistoty pitné vody, k stanovení obsahu soli v mořské vodě apod.).

#### POLARIMETRIE

**Polarimetrie** je optická metoda, založená na měření úhlu otáčení  $\alpha$  polarizovaného světla po průchodu opticky aktivní látkou. Velikost tohoto úhlu je přímo úměrná koncentraci  $c$  opticky aktivní látky a délce kyvety  $l$ . Veličina  $[\alpha]^{20}_\lambda$  charakterizuje danou opticky aktivní látku. Jsou-li  $l$  a  $[\alpha]^{20}_\lambda$  veličiny konstantní, pak  $\alpha \sim c$  čili  $\alpha$  je pouze funkcí koncentrace  $c$ .

Obecně  $\alpha \sim c \cdot l \cdot [\alpha]^{20}_\lambda$

Odtud

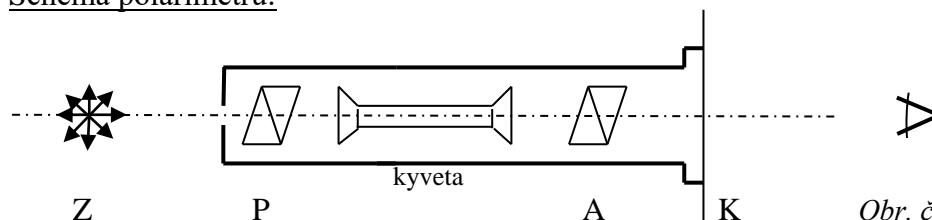
$$[\alpha]^{20}_\lambda = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c} \quad \text{a} \quad c = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot [\alpha]^{20}_\lambda} \quad (\text{v gramech na 100 ml roztoku})$$

**kde**  $\alpha$ ...úhel otočení polarizovaného světla změřený polarimetrem; + ..látka pravotočivá, – ..látka levotočivá),  $l$ ...délka kyvety v dm,  $c$ ...koncentrace roztoku v gramech na 100 ml roztoku,

$[\alpha]^{20}_\lambda$  .... specifická rotace (optická otáčivost) dané látky při 20°C a vlnové délce žluté sodíkové čáry 589,3 nm ;  $[\alpha]^{20}_\lambda$  jednotlivých opt. akt. látek je možné najít v tabulkách.

Přístroj určený k měření velikosti úhlu otočení se nazývá *polarimetr*. Jeho schéma je uvedeno na *Obr. č. 3.1*. Používá se nejčastěji v cukrovaru k rychlému orientačnímu zjišťování např. koncentrace sacharosu v cukrové řepě. Úhlová stupnice na analyzátoru je nahrazena přímo měřítkem pro koncentraci. Takto upravený polarimetr se nazývá *sacharimetr*.

Schéma polarimetru:



*Obr. č. 3.1* Schéma polarimetru

Z.....světelný zdroj (nepolarizované světlo), používá se sodíková výbojka, která dává monochromatické světlo s vlnovou délkou  $\lambda = 589,25$  nm odpovídající D čáře sodíkového spektra,

- P.....polarizátor, převádí světlo nepolarizované na polarizované, používá se nejčastěji Nicolův hranol (nikol), je uchycen pevně, neotáčí se,  
 A.....analyzátor, při otáčení „hledá“ potočenou rovinu polarizovaného světla, používá se opět Nicolův hranol (nikol), který je uchycen volně, otáčí se kolem vodorovné osy,  
 K.....dělený kruh v úhlových stupních, měří úhel otočení roviny.

## Laboratorní úlohy z polarimetrie a refraktometrie

### Úkol č. 1. Měření na polarimetru (schéma viz níže)

- a) Nejdříve se seznámíme se stavbou a funkcí polarimetru (zorné pole – zkřížené a nezkřížené nikoly, odečítání na stupnici – hlavní stupnice a nonius, plnění kyvety).
- b) Měření úhlu otočení naplněné kyvety roztokem glukosy nebo fruktosy o koncentraci cca 10% a výpočet
  - specifické rotace (výsledek porovnáme s tabulkovou hodnotou),
  - přesné koncentrace použitého roztoku (specifickou rotaci odečteme z tabulek).

### Úkol č. 2. Ověření inverze sacharozy

- a) Připravíme 100 g roztoku sacharosy o hmotnostní koncentraci  $p = 10\%$  a přepočítáme pomocí hustoty ( $\rho = 1,038 \text{ g/cm}^3$ ) na koncentraci  $c$  (g/100 ml roztoku). Naplníme kyvetu (2 dm) a polarimetrem změříme úhel  $\alpha_1$ . Vypočítáme specifickou rotaci  $[\alpha_1]^{20}_\lambda$  - označíme směr rotace !!!
- b) Roztok sacharosy (50 ml) okyselíme kyselinou chlorovodíkovou (5 ml 10 % HCl), přikryjeme hodinovým sklem a zahříváme 10 až 15 minut k varu. Poté roztok ochladíme na okolní teplotu, polarimetrem změříme úhel otočení  $\alpha_2$  a vypočítáme specifickou rotaci  $[\alpha_2]^{20}_\lambda$  - nezapomeňte určit znaménko směru otáčení!!!
- c) Porovnejte naměřené a vypočítané hodnoty a objasněte pojem „inverze sacharosy“.

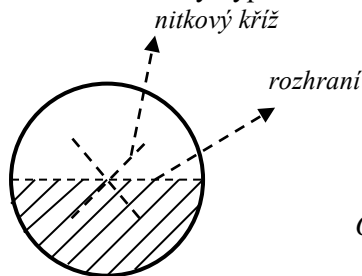
### Úkol č. 3. Zjišťování koncentrace sacharosy pomocí refraktometru. /úloha z refraktometrie/

**Princip:** refraktometrie – metoda měření indexu lomu pomocí refraktometru. Velikost indexu lomu je závislá na koncentraci měřeného roztoku. Z naměřených hodnot indexu lomu lze sestavit kalibrační křivku a z ní pak odečíst příslušnou koncentraci měřeného roztoku..

Poznámka: Některé refraktometry jsou přímo cejchovány pro danou látku, proto lze koncentraci přímo odečíst na stupnici přístroje.

**Pomůcky:** 20 %ní roztok sacharosy /základní roztok/, zkumavky, pipetky, refraktometr (sacharimetr)

**Postup:** Ze základního roztoku připravíme zředěním základního roztoku destilovanou vodou další roztoky v poměru 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 2 : 3, 3 : 4 (20 %ní roztok : ml H<sub>2</sub>O) – pracujte co nejpřesněji !!! Vzniklé roztoky nanese pipetkou na hranol refraktometru a opatrně přiklopíme druhým hranolem (uzavřeme). Po zapnutí spodního osvětlení vyrovnáme rozhraní ve světelném poli do středu nitkového kříže (obr. 3.2.) Na stupnici refraktometru (sacharometru) odečteme příslušnou koncentraci a porovnáme s teoreticky vypočtenou hodnotou, odpovídající danému zředění.



Obr. č. 3.2. rozhraní světlého a tmavého pole

Naměřené hodnoty zapíšeme do tabulky:

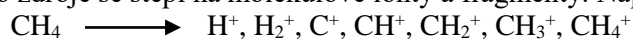
ředění	Žádné	1 . 1	1 . 2	1 . 4	2 . 3	3 . 4
konc. teoretická						
konc. naměřená						

- Úkoly:** 1. Do protokolu uveďte číselné výpočty koncentrací jednotlivých roztoků  
2. Zhodnoťte rozdíl vypočítaných a naměřených hodnot

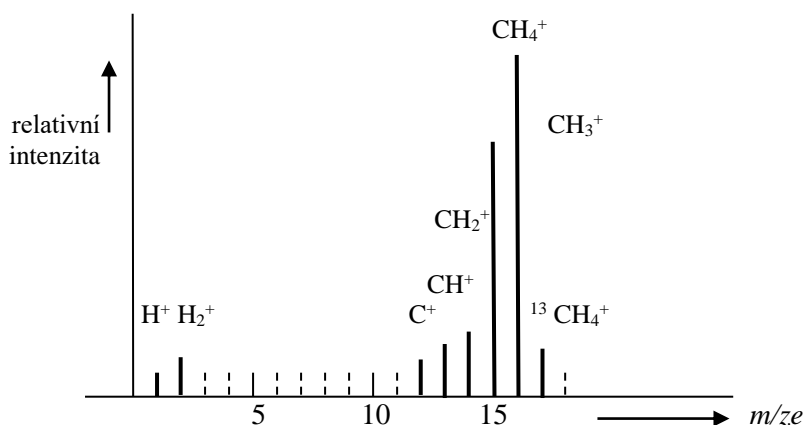
## C. Jiné instrumentální metody

### 1. Hmotnostní spektrometrie

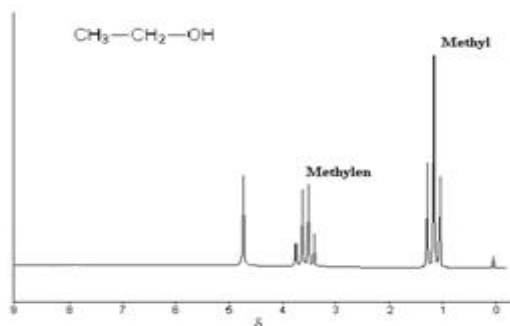
patří mezi moderní fyzikální instrumentální metody používané v chemické analýze. Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů, v magnetickém poli. Pro separaci je rozhodující veličinou tzv. *efektivní hmotnost* ionizované částice ( $m/z$ );  $m$  je hmotnost iontu,  $z$  – jeho nábojové číslo a  $e$  – elementární náboj). Analyzovaný vzorek (plynný) účinkem iontového zdroje se štěpí na molekulové ionty a fragmenty. Např. methan může poskytnout tyto částice



V elektrickém poli vytvoří vzniklé částice (ionty) proud, který je ve formě tenkého svazku veden do homogenního magnetického pole. V něm se jednotlivé částice rozliší podle svých efektivních hmotností – dochází k zakřivení jejich drah. Částice stejných efektivních hmotností vycházející z magnetického pole dopadají na stejné místo detektoru a vytváří soustavu čar zv. *hmotnostní spektrum* (viz obr. 1, 2)



Obr. 1 Hmotnostní spektrum methanu



Obr. 2 NMR spektrum ethanolu

V praxi se využívají převážně kladné částice – ionty. Přístroj pro hmotnostní spektrometrii se nazývá *hmotnostní spektrometr*.

V současnosti má hmotnostní spektrometrie značný význam. Rozbor hmotnostních spekter umožňuje zjišťovat kvalitativní i kvantitativní složení sloučenin. Kvalitativně je možno identifikovat všechny prvky. Hmotnostní spektrometrie se využívá také ve strukturní analýze, ke stanovení molekulové hmotnosti a k identifikaci chemických individuů. Obsahuje-li některý prvek molekulového iontu izotopy, objeví se v hmotnostním spektru čáry v intenzitách odpovídajících jejich přirozenému koncentračnímu zastoupení. Z hmotnostního spektra získáme informace o funkčních skupinách obsažených v molekule analyzované látky.

Další uplatnění má hmotnostní spektrometrie ve stopové analýze plyných směsí anorganického i organického charakteru. K těmto účelům postačuje většinou velmi malé množství sloučeniny, např. řádu 10 µg. Různé metody hmotnostní spektrometrie slouží k identifikaci a detekci stopových nečistot (<10<sup>-5</sup> %), např. stopových prvků v polovodičích, v čistých materiálech pro jadernou fyziku, ve velmi čistých kovech apod.

#### **Shrnutí:**

##### ***Hmotnostní spektrometrie (MS)***

- Fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.
- Metoda má výbornou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek.
- Těžištěm analytického využití MS je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury.
- Hmotnostní spektrometrie umožňuje určit izotopový poměr prvku ve vzorku (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H, <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S, <sup>33</sup>S/<sup>32</sup>S).
- Hmotnostní spektrometry nízkého i vysokého rozlišení lze provozovat v běžných podmínkách analytických laboratoří.
- Dostupnost moderních iontových zdrojů rozšiřuje aplikační oblast hmotnostní spektrometrie na vysokomolekulární netěkavé látky (biochemický, klinický výzkum).

## **2. Přehled některých dalších metod**

Mezi další metody instrumentální analýzy patří (uvedeno jen přehledně):

- spektrální analýza v oblasti rentgenových spekter,
- infračervená a Ramanova spektroskopie,
- luminiscenční analýza,
- interferometre,
- magnetometre,
- radiometrická analýza

Podrobný rozbor jednotlivých metod i v oblasti základních pojmů a principů překračuje rámec této publikace.