

INTRODUZIONE ALLA SPETTROSCOPIA ORGANICA

Paolo Pengo
Stanza 344, ppengo@units.it

OBIETTIVI DELL'INSEGNAMENTO

Determinazione della struttura di composti organici mediante l'interpretazione di dati spettroscopici/spettrometrici

TESTI DI RIFERIMENTO/CONSIGLIATI

R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, D.L. Bryce 'Identificazione Spettrometrica di Composti Organici'
Casa Editrice Ambrosiana.

M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh. 'Metodi Spettroscopici nella chimica organica', II Edizione, EdiSES

C. Chiappe, F. D'Andrea, G. Abbandonato, 'Tecniche spettroscopiche e identificazione di composti organici.
Problemi svolti e da svolgere.' ETS

MODALITÀ DI SVOLGIMENTO DELL'ESAME

L'esame finale prevede una prova scritta e una prova orale.

La prova scritta (3h) consiste nel riconoscimento della struttura di un composto organico sulla base degli spettri di massa, IR, nmr, in maniera analoga alle esercitazioni svolte in aula. Nella prova scritta deve essere individuata la struttura del composto e gli spettri interpretati nel dettaglio, così da dimostrare di essere in grado di operare in modo autonomo e saper decidere qual'è la struttura corretta sulla base delle informazioni fornite.

Per accedere all'orale è indispensabile aver riconosciuto il composto.

Nella prova orale viene discusso l'elaborato e vengono poste alcune domande sulle tecniche illustrate nel corso e sulle loro peculiarità di applicazione.

Vedi: https://corsi.units.it/sm10/modulo/2022/339618/af_gen_cod/102sm

ARGOMENTI PRINCIPALI

Spettrometria di massa

Spettroscopia Infrarossa (IR) – Spettroscopia vibrazionale

Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

Aspetti teorici (principio del metodo)

Aspetti strumentali

Interpretazione del dato spettroscopico/spettrometrico

Spettroscopie

Spettrometrie

SPETTROSCOPIA/SPETTROMETRIA

Alcune definizioni per evitare confusione!

SPETTROSCOPIA

La **spettroscopia** è lo studio dell'assorbimento (o dell'emissione) delle **radiazioni elettromagnetiche** da parte della materia. I diversi tipi di spettroscopia si distinguono **per il tipo** di radiazione elettromagnetica, cioè la sua **lunghezza d'onda frequenza o una funzione di queste grandezze**, coinvolta nell'interazione.

Il risultato di un'analisi spettroscopica è uno **SPETTRO** che riporta una variazione dell'intensità della radiazione elettromagnetica, asse y, in funzione della lunghezza d'onda (frequenza o altro), asse x, a seguito dell'interazione con la materia.

SPETTROMETRIA

La **spettrometria** è misurazione (determinazione) di uno spettro, NON necessariamente a seguito dell'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia.

In questo caso lo spettro riporta sull'asse x una grandezza che non è legata alla radiazione elettromagnetica.

RICORDIAMO L'OBIETTIVO

Determinazione della struttura di composti organici mediante l'interpretazione di dati spettroscopici/spettrometrici

PRIMA DELLE ANALISI SPETTROSCOPICHE/SPETTROMETRICHE

La formula molecolare di un composto organico contiene informazioni preziose sulla sua struttura

Data una qualunque formula molecolare possiamo calcolare il **Grado di Insaturazione (GI)** della specie in questione

$$GI = 1 + \frac{1}{2} \sum_k N_k (V_k - 2)$$

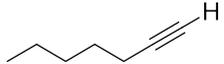
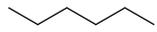
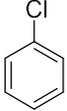
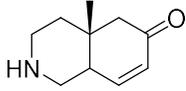
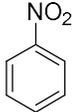
Dove:

k identifica il tipo di atomo: carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto, alogeni etc;

N il numero di questi atomi;

V la loro valenza

GRADO DI INSATURAZIONE, ALCUNI ESEMPI

Formula	GI	Formula	GI
	2		0
Chemical Formula: C ₇ H ₁₂		Chemical Formula: C ₆ H ₁₄	
	4		1
Chemical Formula: C ₆ H ₅ Cl		Chemical Formula: C ₆ H ₁₂	
	2		4
Chemical Formula: C ₄ H ₆ O		Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₅ NO	
	5		
Chemical Formula: C ₆ H ₅ NO ₂			

$$GI = 1 + \frac{1}{2} \sum_k N_k (V_k - 2)$$

Il GI è uguale al totale del numero di cicli e legami π (insaturazioni) che sono presenti nella molecola.

Il GI **NON DÀ** informazioni su come sono organizzate le insaturazioni.

Il GI è uguale al numero di moli di idrogeno molecolare che è necessario aggiungere (formalmente) alla formula molecolare per ottenere una specie completamente satura (senza cicli e senza legami π)

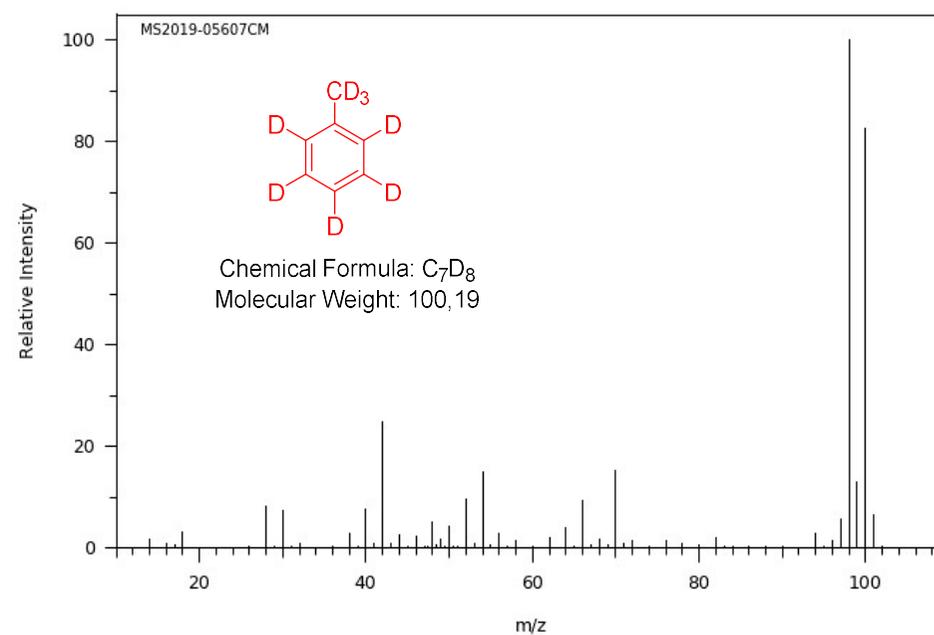
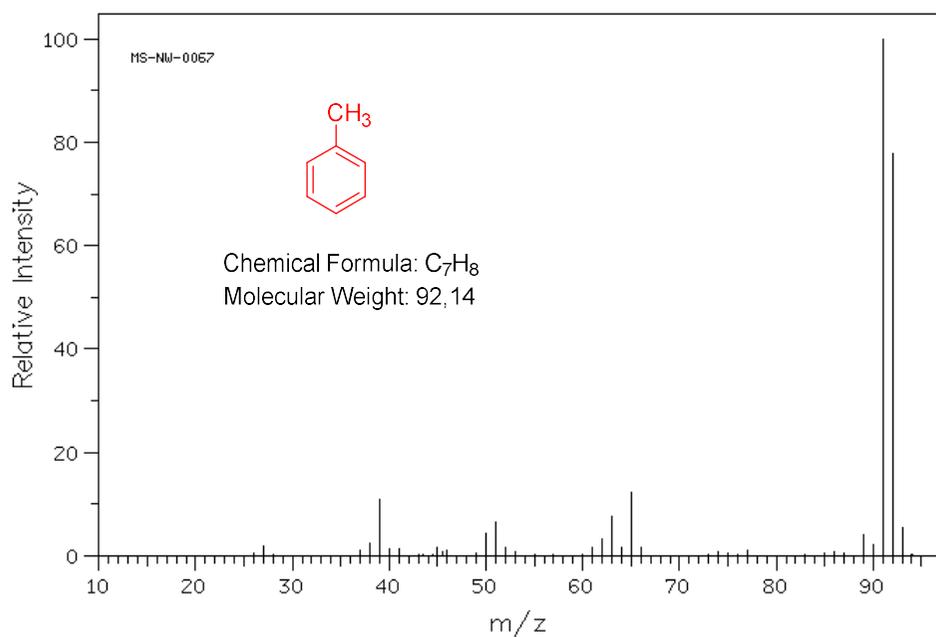
SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

Principio del Metodo

L'analita, in genere in fase vapore viene ionizzato e successivamente gli ioni prodotti vengono separati in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z).

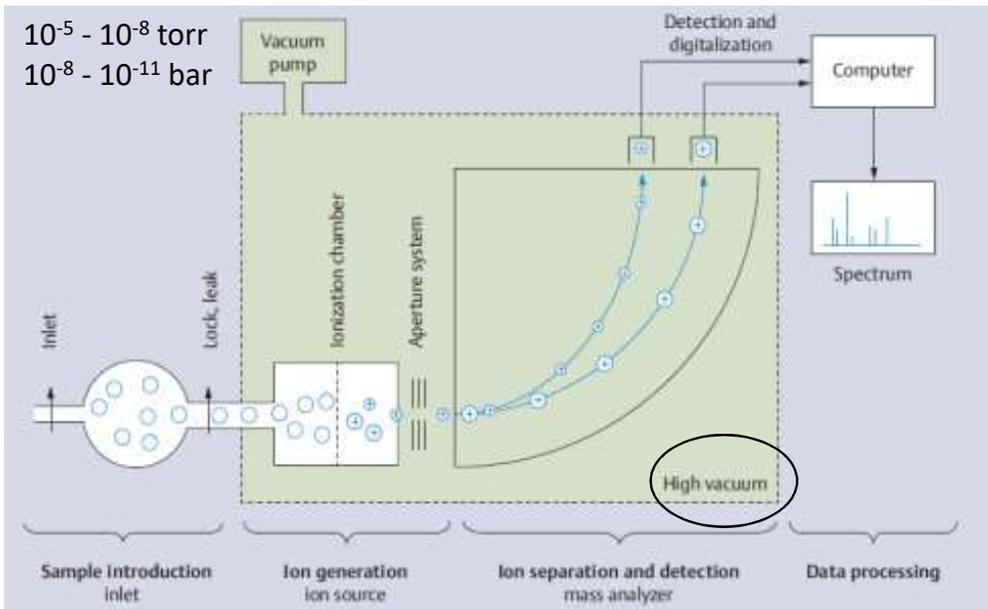
Uno SPETTRO DI MASSA riporta l'abbondanza dei vari ioni prodotti in funzione del loro valore di m/z

Esempi di spettri di massa



SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

Schema a blocchi di uno spettrometro di massa



Differenziazione delle tecniche di MS

- Per come avviene la ionizzazione dell'analita;
- Per come vengono separati e rivelati gli ioni prodotti.

Accoppiamento di MS e metodi cromatografici

Spesso uno spettrometro di massa può essere accoppiato con strumentazione di separazione cromatografica. In questo caso lo spettrometro di massa funge da detector. In sistemi GC-MS (Gascromatografia-Massa) In sistemi LC-MS (cromatografia liquida-Massa)

METODI DI IONIZZAZIONE

Ionizzazione per impatto elettronico, Electron Impact (**EI**)

Ionizzazione Chimica, Chemical ionization (**CI**)

Bombardamento con atomi veloci, Fast Atom Bombardment (**FAB**)

Electrospray Ionization (**ESI**)

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (**MALDI**)

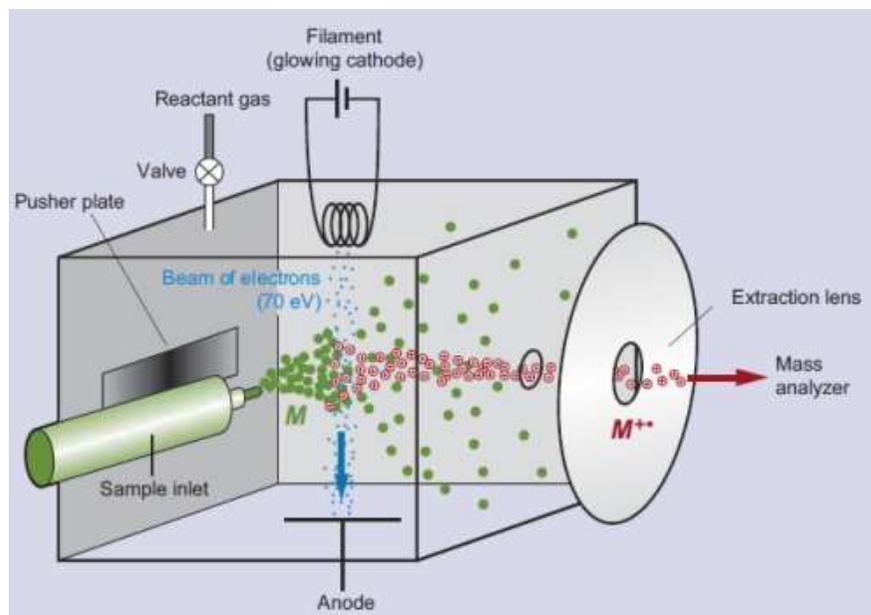
A partire dal campione (analita) consentono la formazione di ioni. Alcuni sono adatti a piccole molecole, altri possono essere usati per molecole più pesanti. Alcuni generano ioni ad alta energia, altri ioni a bassa energia.

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) METODI DI IONIZZAZIONE (FASE VAPORE)

Ionizzazione per impatto elettronico, Electron Impact ionization (EI)

Utile per piccole molecole di specie volatili $M_r < 1000$ Da

E' il metodo di ionizzazione più vecchio è un metodo di ionizzazione **molto energetico**



Nella camera di ionizzazione le molecole vengono bombardate con elettroni ad alta energia, tipicamente 70 eV (regolabile agendo sulla ddp tra anodo e catodo);

A seguito dell'impatto elettronico la molecola perde un elettrone generando un radicale catione ($M^{+\bullet}$). Questa specie è detta **IONE MOLECOLARE**



Gli elettroni che impattano sulle molecole possono avere energia sufficiente per frammentare (rompere) lo ione molecolare.

La frammentazione può essere accompagnata da **riarrangiamenti (trasposizioni) ed eliminazione di molecole neutre**.

Questi processi sono **CARATTERISTICI**, dipendono dalla **STRUTTURA MOLECOLARE** e quindi permettono di **OTTENERE INFORMAZIONI** sulla struttura dell'analita.

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) METODI DI IONIZZAZIONE

Ionizzazione Chimica, Chemical ionization (CI)

È un metodo **BLANDO** di ionizzazione, cioè relativamente poca energia è trasferita all'analita e si ottengono quindi frammentazioni più contenute rispetto all'EI, è utile per piccole molecole

Cosa succede?

- Un gas detto 'reagente' (metano, ammoniaca) viene introdotto nella sorgente di ioni e ionizzato (**IONI REAGENTI**).
- Le molecole di analita urtando gli ioni reagenti e subiscono una ionizzazione secondaria producendo, in genere lo ione $[M + H]^+$ detto **IONE MOLECOLARE PROTONATO**.

Fast Atom Bombardment (FAB) (5000 Da < Mr < 20000 kDa)

È un metodo **BLANDO** di ionizzazione (rispetto a EI) quindi causa limitata frammentazione.

Cosa succede?

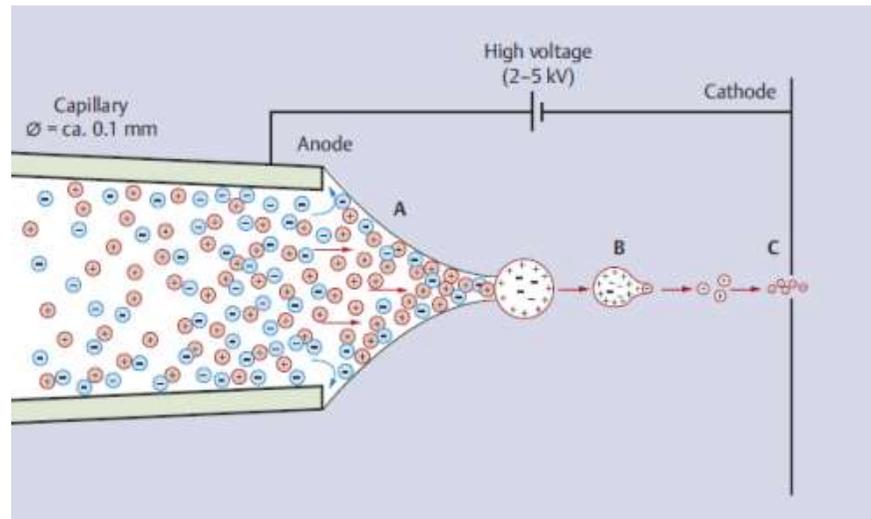
- L'analita è sciolto in una matrice liquida non volatile (glicerina, tioglicerolo), sulla superficie della matrice viene fatto incidere un fascio di atomi veloci, in genere Ar o Xe.
- L'energia trasferita alla matrice permette la protonazione (deprotonazione) dell'analita ed il suo desorbimento.

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) METODI DI IONIZZAZIONE

Electrospray Ionization (ESI) Utile per molecole e biomolecole fino a 100 kDa ma anche piccole molecole polari. È un metodo **BLANDO** di ionizzazione, cioè relativamente poca energia è trasferita all'analita e si ottengono quindi frammentazioni più contenute rispetto all'EI. Permette l'ottenimento di ioni con carica maggiore di 1.

Cosa succede?

L'analita viene disciolto in un solvente polare e volatile, e viene nebulizzato da un capillare la cui estremità è tenuta ad un alto potenziale elettrico. In questo modo le goccioline si caricano elettricamente e quando il solvente evapora e la gocciolina raggiunge una dimensione sufficientemente piccola, questa esplosione rilasciando il campione ionizzato che viene analizzato. Si formano in genere ioni $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M - H]^-$, $[M + nH]^{n+}$



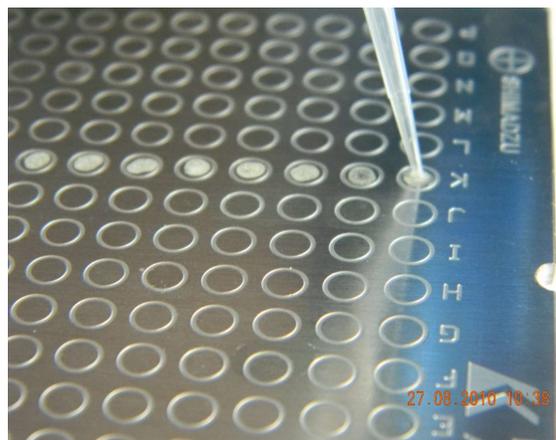
SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) METODI DI IONIZZAZIONE

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) 1000-5000 Da < massa < 200000-300000

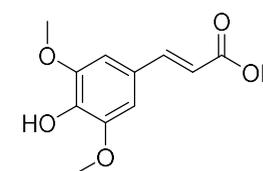
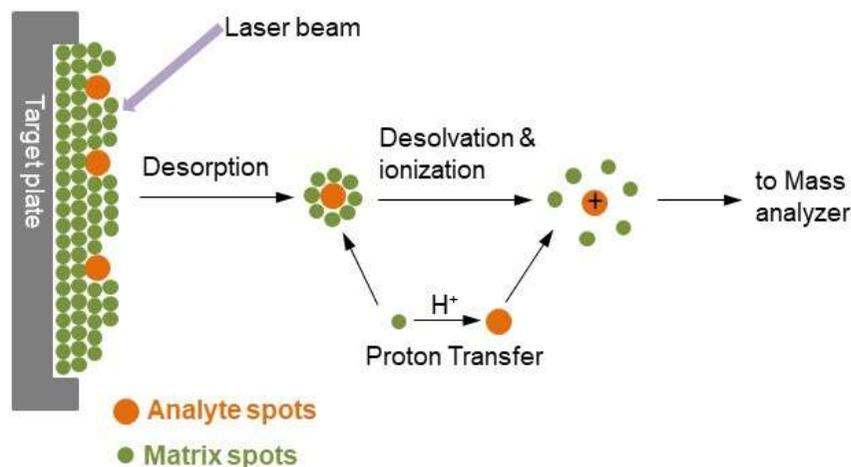
E' un metodo **BLANDO** di ionizzazione, cioè relativamente poca energia è trasferita all'analita e si ottengono quindi frammentazioni più contenute rispetto all'EI

Cosa succede?

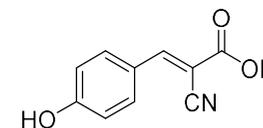
- L'analita viene co-cristallizzato con un largo eccesso di composti che ionizzano/cristallizzano bene. Questi composti costituiscono la cosiddetta **MATRICE**. Alcuni esempi sono l'acido sinapico e l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico.
- Un fascio laser viene fatto incidere sulla miscela matrice/analita, l'assorbimento di energia causa la ionizzazione ed il desorbimento dell'analita. Si ottengono in genere ioni $[M + H]^+$ oppure $[M - H]^-$



Piastra portacampioni per MALDI-MS



Acido Sinapico



Acido α -ciano-4-idrossicinnamico

ANALIZZATORI DI MASSA

Analizzatore a settore magnetico

Analizzatore a quadrupolo (Quad)

Analizzatore a tempo di volo (Time of flight, TOF)

A partire dal flusso di ioni in uscita dalla sorgente consentono la risoluzione (cioè la separazione degli ioni in base al loro valore di m/z). Il meccanismo con cui questo avviene è diverso da analizzatore ad analizzatore.

ATTENZIONE: un analizzatore **NON È** un detector.

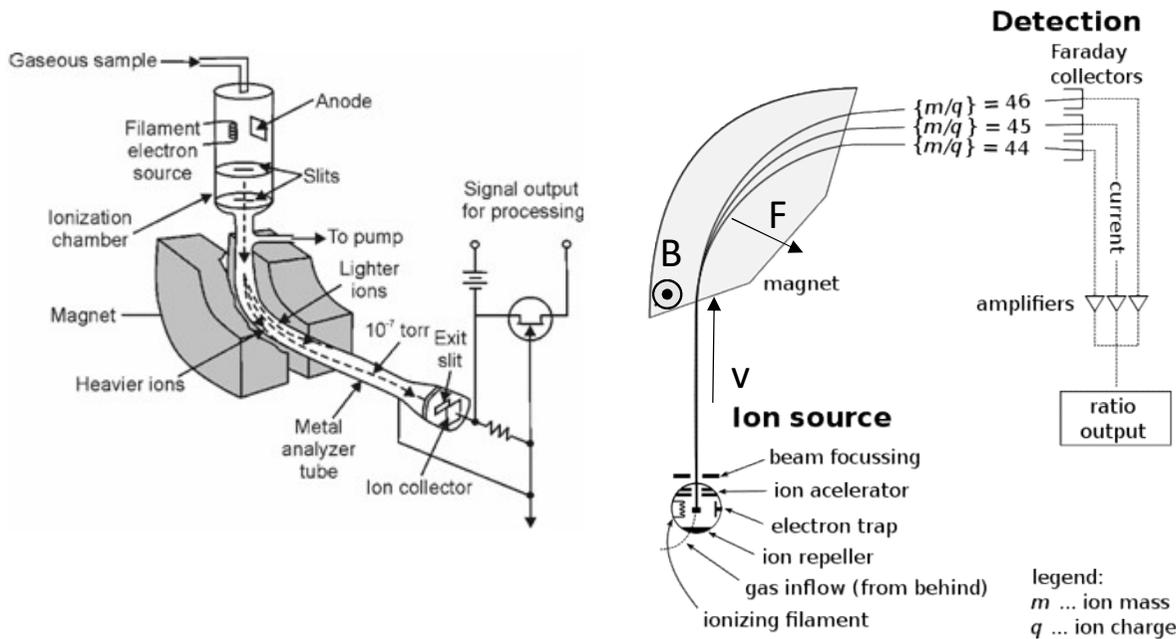
Cioè non genera un segnale.

DETECTOR

Un detector trasforma un flusso di ioni **IN USCITA** da un **ANALIZZATORE** in un segnale in genere **ELETTRICO** che poi viene processato e convertito in uno spettro.

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) ANALIZZATORE A SETTORE MAGNETICO

E' l'analizzatore di massa più vecchio



Gli ioni con carica z sono accelerati da una ddp E
 Possiedono quindi una energia $U = zE$ che è uguale alla loro energia cinetica K quindi

$$K = zE = \frac{1}{2}mv^2$$

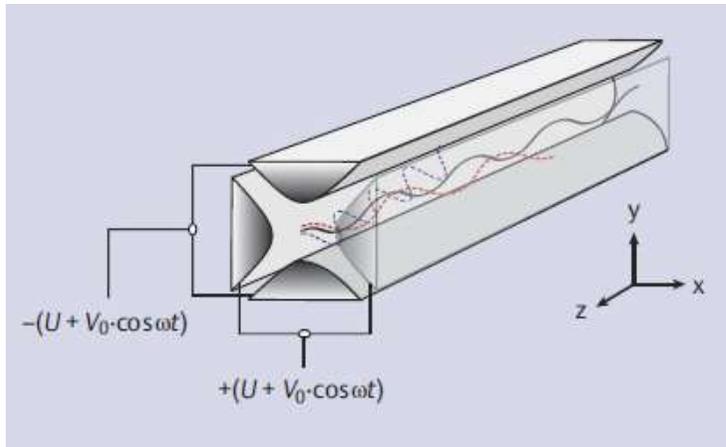
Dentro al settore magnetico gli ioni risentono della forza di Lorent $F = zvXB$ ortogonale sia a v che a B (regola della mano destra) questo porta gli ioni a deviare dalla loro traiettoria descrivendo un percorso curvo. La forza di Lorentz agisce come una forza centripeta $F = (mv^2)/r$ quindi:

$$\frac{mv^2}{r} = zvB \quad \Rightarrow \quad r = \frac{m v}{z B} \quad \text{poichè} \quad v = \left(\frac{2zE}{m}\right)^{1/2} \quad \text{allora}$$

$$r = \frac{1}{B} \left(\frac{2Em}{z}\right)^{1/2}$$

La curvatura dipende da m/z , questo consente la separazione (risoluzione spaziale degli ioni)

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) ANALIZZATORE A QUADRUPOLO



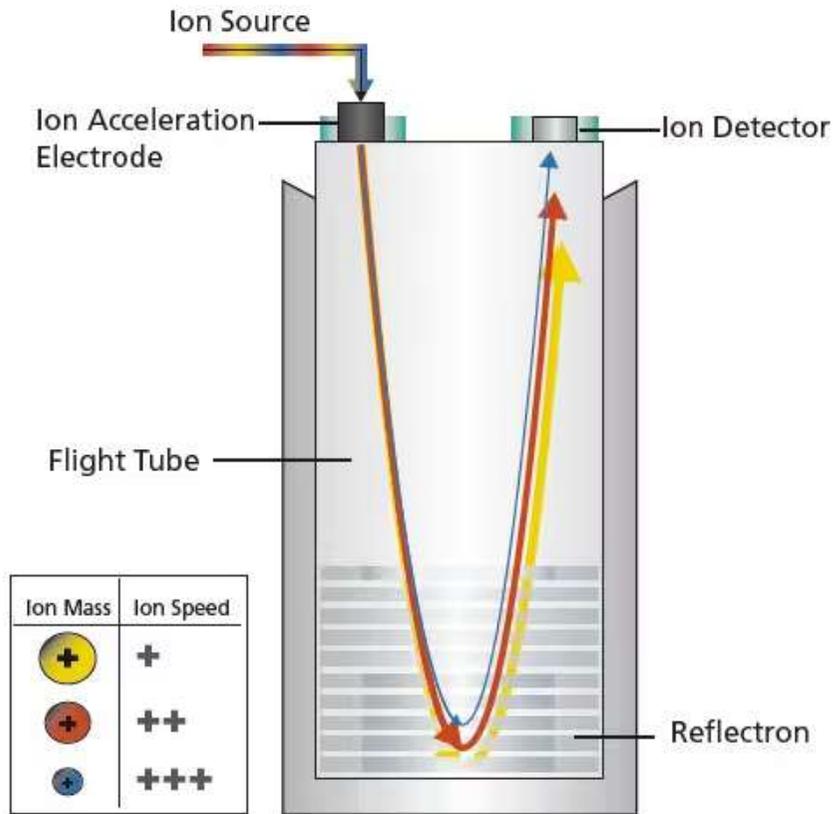
Analizzatore di massa a quadrupolo
(profilo iperbolico)

Principio di funzionamento

Quando a ciascun polo viene applicata una combinazione di tensione continua e tensione alternata ad alta frequenza (RF), all'interno del quadrupolo viene generato un campo elettrico con una fase che varia rapidamente. Di conseguenza, gli ioni che attraversano questo campo elettrico oscillano nelle direzioni x e y.

Variando i parametri di quadrupolo: U , V_0 , ω alcuni ioni con specifico m/z mantengono un'oscillazione stabile, attraversano il quadrupolo per raggiungere il rivelatore (condizione di risonanza). Altri ioni con m/z incompatibili con i parametri di quadrupolo danno oscillazioni instabili e alla fine collidono con i poli o escono dall'analizzatore senza arrivare al detector.

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO (TOF)



Analizzatore Time-of-Flight (TOF)

Principio di funzionamento

Gli analizzatori TOF separano gli ioni di diverso m/z misurando il tempo impiegato dagli ioni per viaggiare attraverso una regione senza campo (tubo di volo, tubo di deriva).

A parità di energia cinetica K ioni più pesanti hanno velocità minore di quelli più leggeri ed impiegano più tempo per percorrere il tubo di deriva. Supponiamo che L sia la distanza di volo e quindi:

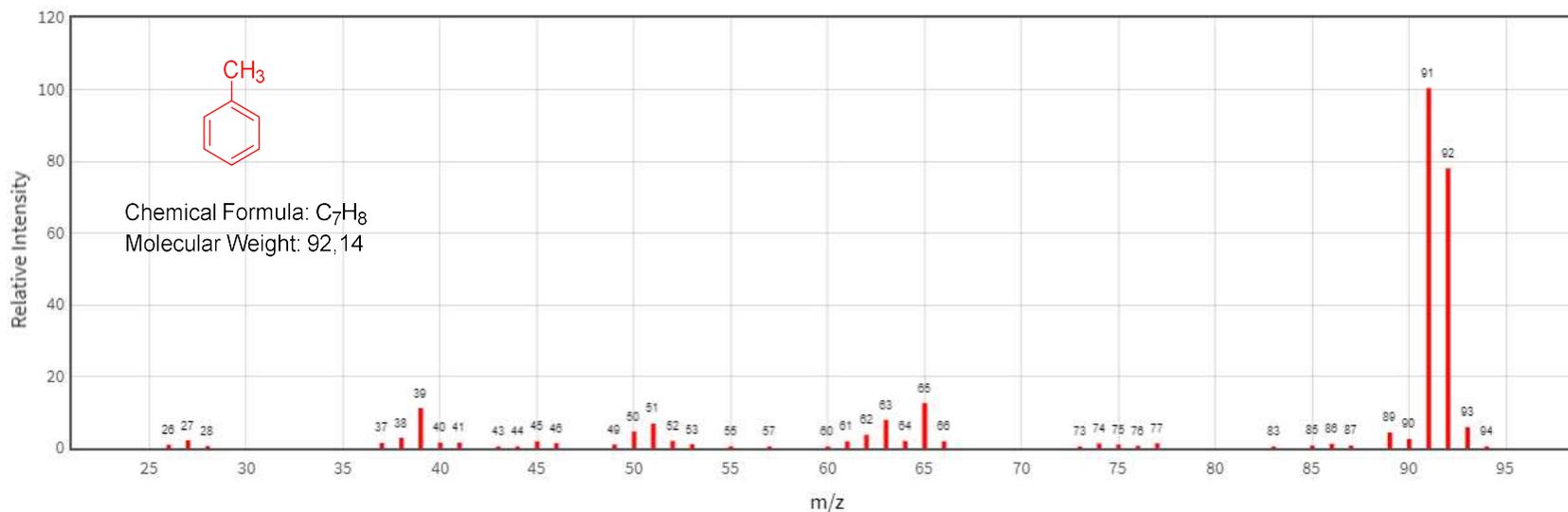
$$K = zE = \frac{1}{2}mv^2 \quad v = \left(\frac{2zE}{m}\right)^{1/2}$$

$$Tof\left(\frac{m}{z}\right) = L\left(\frac{m}{2zE}\right)^{1/2}$$

Risoluzione temporale degli ioni

SPETTROMETRIA DI MASSA, SPETTRI DI MASSA

Spettro di massa del toluene (EI, 70 eV)



<https://webbook.nist.gov>

- Intensità relative in funzione di m/z

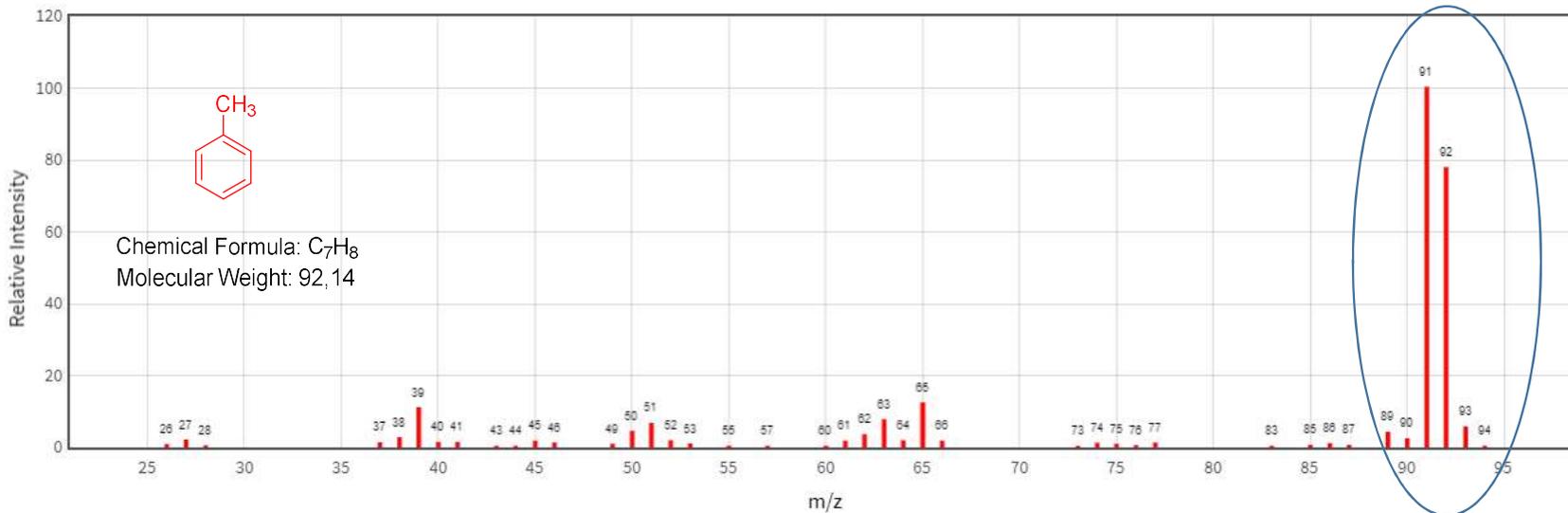
Relative a cosa?

Per **CONVENZIONE** al picco più intenso in uno spettro MS (che si chiama picco BASE) è attribuita intensità 100. Il picco base non è necessariamente quello dello ione molecolare!

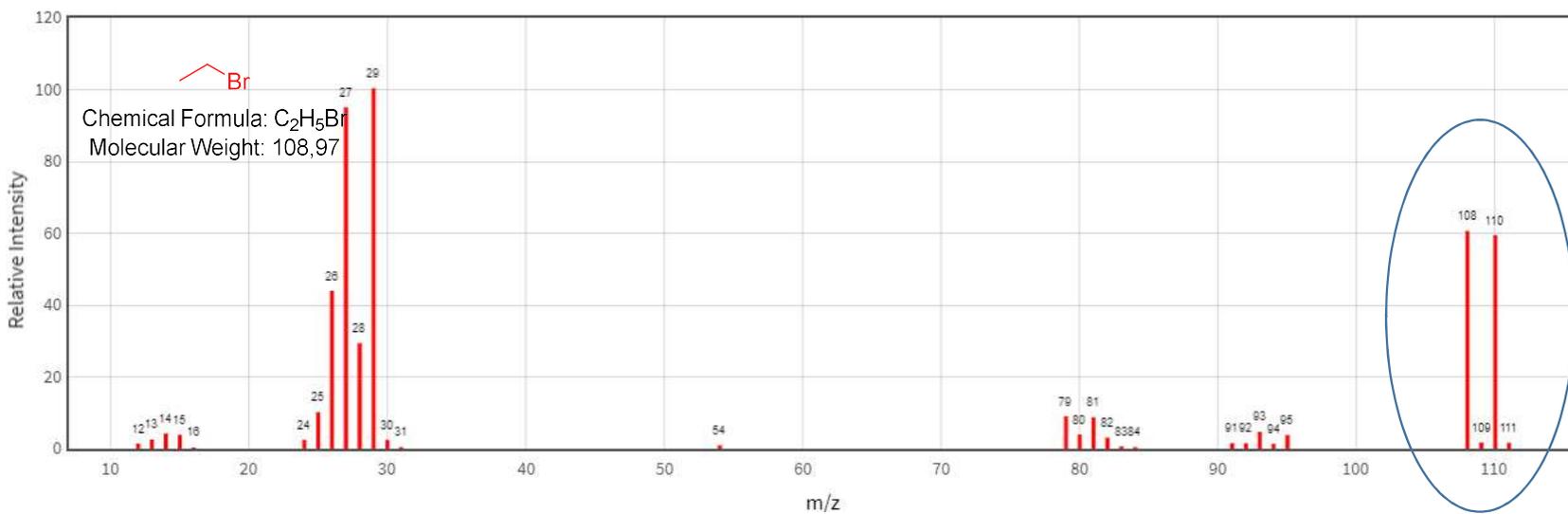
Nello spettro di massa del toluene il picco base è un picco a m/z = 91.

Il picco dello ione molecolare è quello che si trova a valori m/z più elevate.

SPETTROMETRIA DI MASSA, SPETTRI DI MASSA



Perché vediamo una serie di picchi?



<https://webbook.nist.gov>

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

Cos'è la massa di una molecola?

Poiché ciascun elemento può esistere come miscela di isotopi le molecole di un composto non hanno tutte la stessa massa.

Massa media

E' la massa di una molecola calcolata usando i valori dei **pesi atomici standard** dei suoi elementi costituenti.

In spettrometria di massa **PERO** si possono risolvere (identificare separatamente) le masse di ciascuna composizione isotopica dell'analita. Si osserva cioè quello che definito **PATTERN ISOTOPICO** dello ione.

PATTERN ISOTOPICO

'Set of peaks related to ions with the same chemical formula but containing different isotopes; e.g. the 16 and 17 mass/charge peaks in a CH₄ sample arising from ¹²CH₄⁺ and ¹³CH₄⁺ ions'. (IUPAC Gold Book)

Il pattern isotopico è quindi costituito da picchi a M+1, M+2, etc le cui intensità dipendono strettamente dalla composizione della molecola. L'analisi delle intensità dei picchi nel pattern isotopico dà informazione sulla composizione.

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE

Il rapporto di intensità tra il picco M+1 ed il picco M può essere utile per ottenere informazioni sul numero di atomi di carbonio nella struttura.

L'abbondanza isotopica di ^{13}C è 1.1%

E quindi l'intensità del picco M+1 è data da:
$$I_{M+1} = I_M \frac{1,1}{100} N_C$$

Più utile è l'analisi del picco ad M+2, questo è in genere di intensità trascurabile ECCETTO quando nella molecola è presente un atomo di **cloro** oppure **bromo** oppure **zolfo**.

Cloro

^{35}Cl 100%

^{37}Cl 32,5%

$$I_{M+2} = I_M \frac{32,5}{100} N_{Cl}$$

Bromo

^{79}Br 100%

^{81}Br 98,0%

$$I_{M+2} = I_M \frac{98,0}{100} N_{Br}$$

Zolfo

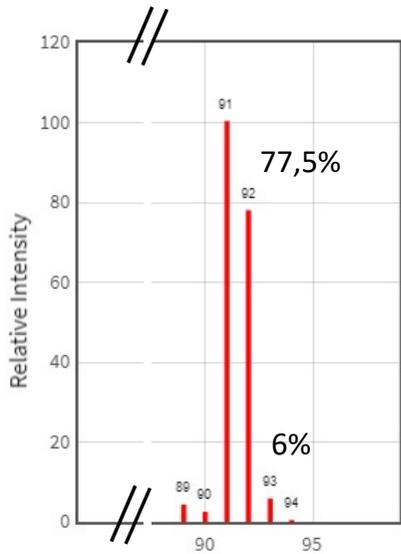
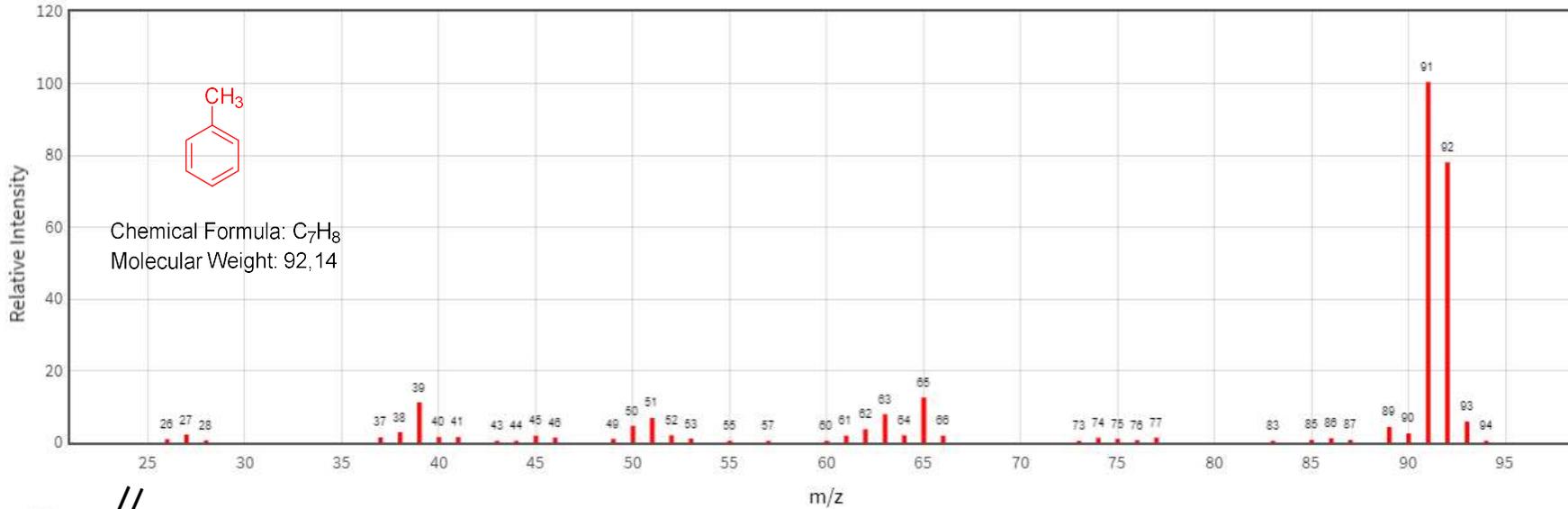
^{32}S 100%

^{33}S 0,78%

^{34}S 4,4%

$$I_{M+2} = I_M \frac{4,4}{100} N_S$$

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE ESEMPIO DEL TOLUENE



M m/z = 92 (77,5)

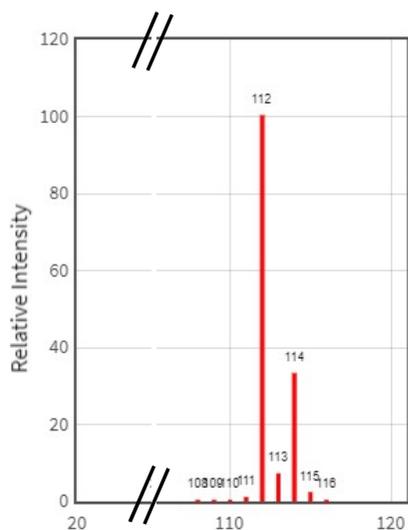
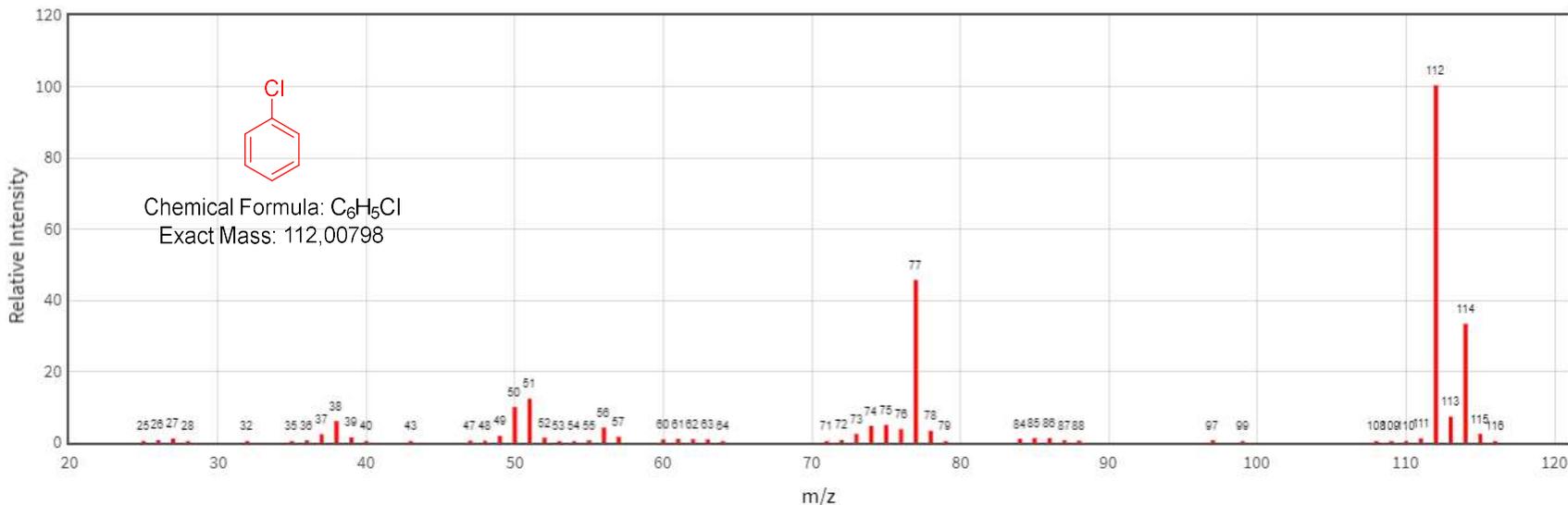
M+1 m/z = 93 (6)

$$I_{M+1} = I_M \frac{1,1}{100} N_C$$



$$\frac{I_{M+1}}{I_M} \frac{100}{1,1} = N_C = 7$$

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE ESEMPIO DEL CLOROBENZENE



M m/z = 112 (100)

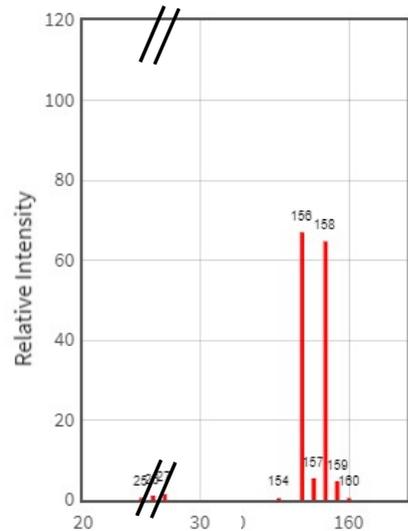
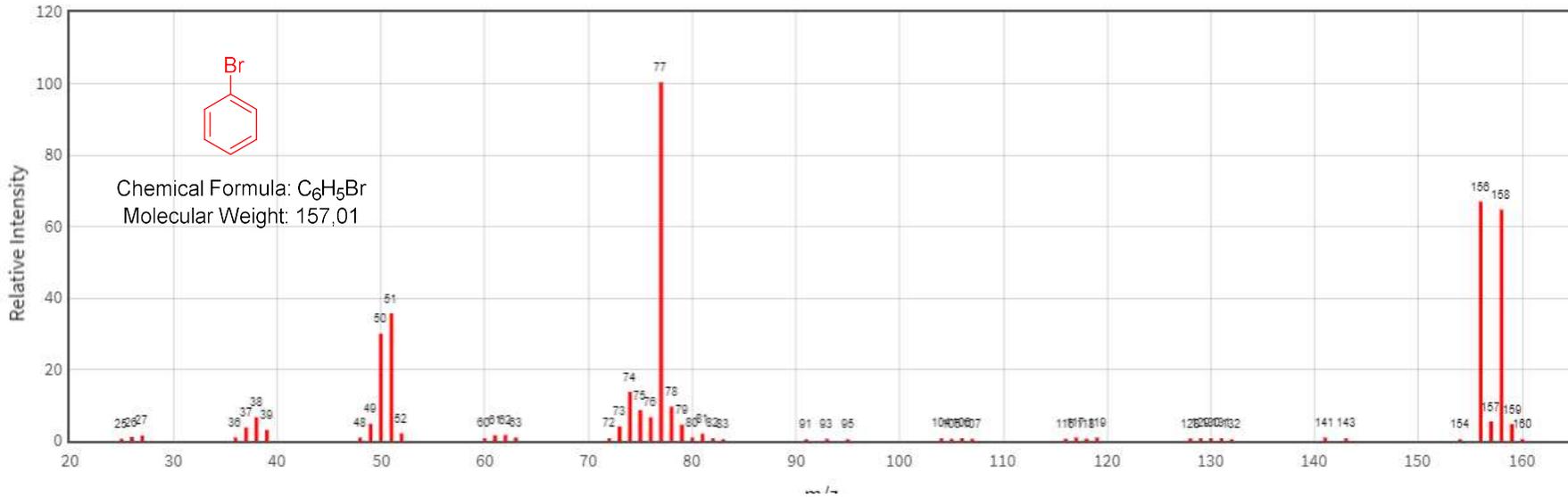
M+2 m/z = 93 (33)

$$I_{M+2} = I_M \frac{32,5}{100} N_{Cl}$$



$$\frac{I_{M+2}}{I_M} \frac{100}{32,5} = N_{Cl} = 1$$

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE ESEMPIO DEL BROMOBENZENE



M m/z = 156 (66,3)

M+2 m/z = 158 (64,8)

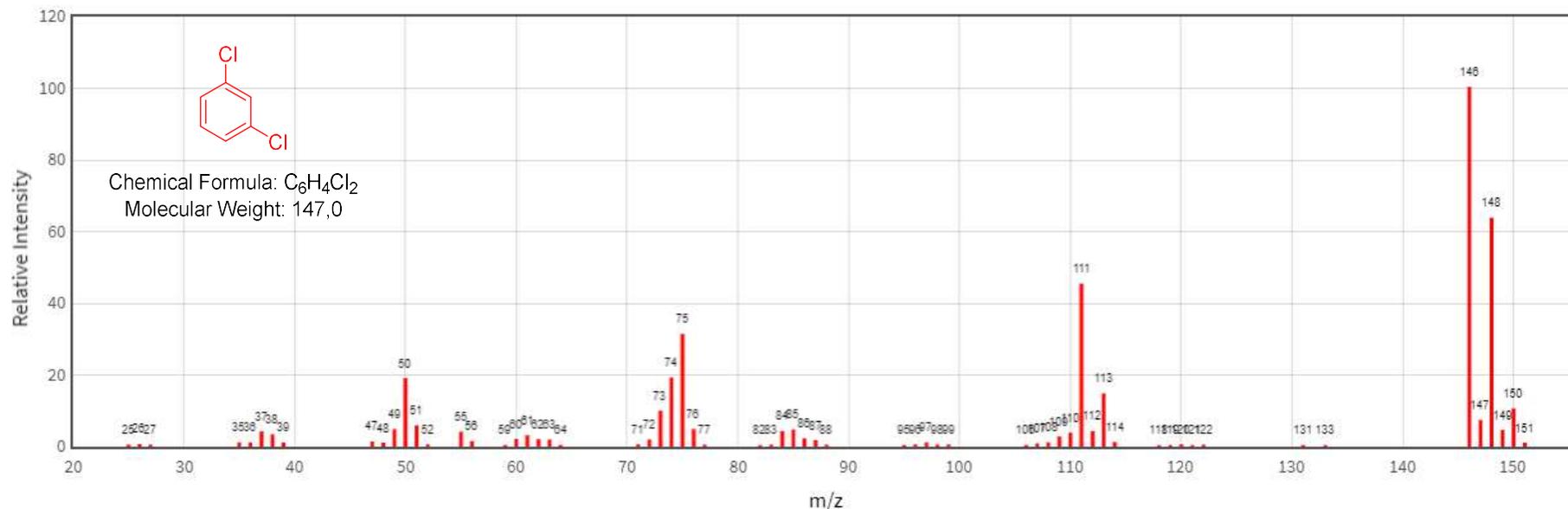
$$I_{M+2} = I_M \frac{98}{100} N_{Br}$$



$$\frac{I_{M+2}}{I_M} \frac{100}{98} = N_{Br} = 1$$

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE

E se avessimo due atomi di cloro, per esempio l'1,3-diclorobenzene che pattern isotopico ci aspetteremmo?



Per trovare la risposta bisogna fare un po' di statistica. Qual è la probabilità che nella molecola si trovino 2 atomi ³⁵Cl ? Qual è la probabilità che si trovino un ³⁵Cl ed un ³⁷Cl? Qual è la probabilità che si trovino due ³⁷Cl?

Cloro

³⁵Cl 100%

³⁷Cl 32,5%

Frazione isotopica X(³⁵Cl) = 100/(100+32,5)=0,75

Frazione isotopica X(³⁷Cl) = 32,5/(100+32,5)=0,25

<https://webbook.nist.gov>

PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE, 1,3-DICLORO BENZENE

Cloro

^{35}Cl 100%

^{37}Cl 32,5%

Frazione isotopica $X(^{35}\text{Cl}) = 100/(100+32,5)=0,75$

Frazione isotopica $X(^{37}\text{Cl}) = 32,5/(100+32,5)=0,25$

- La probabilità che nella molecola si trovino 2 atomi ^{35}Cl è $[X(^{35}\text{Cl})]^2 = 0,56$
- La probabilità che si trovino un ^{35}Cl ed un ^{37}Cl è $2 X(^{35}\text{Cl}) X(^{37}\text{Cl}) = 0,38$
- La probabilità che si trovino due ^{37}Cl è $[X(^{37}\text{Cl})]^2 = 0,063$



Picco M

1



Picco M+2

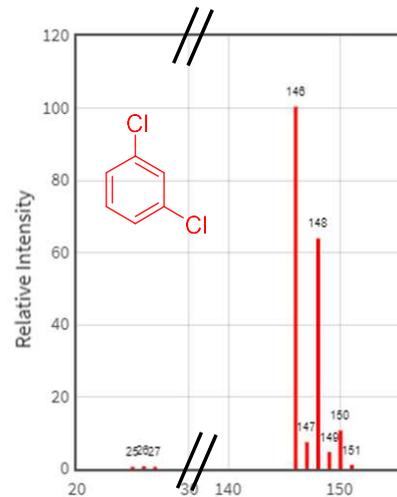
0,67



Picco M+4

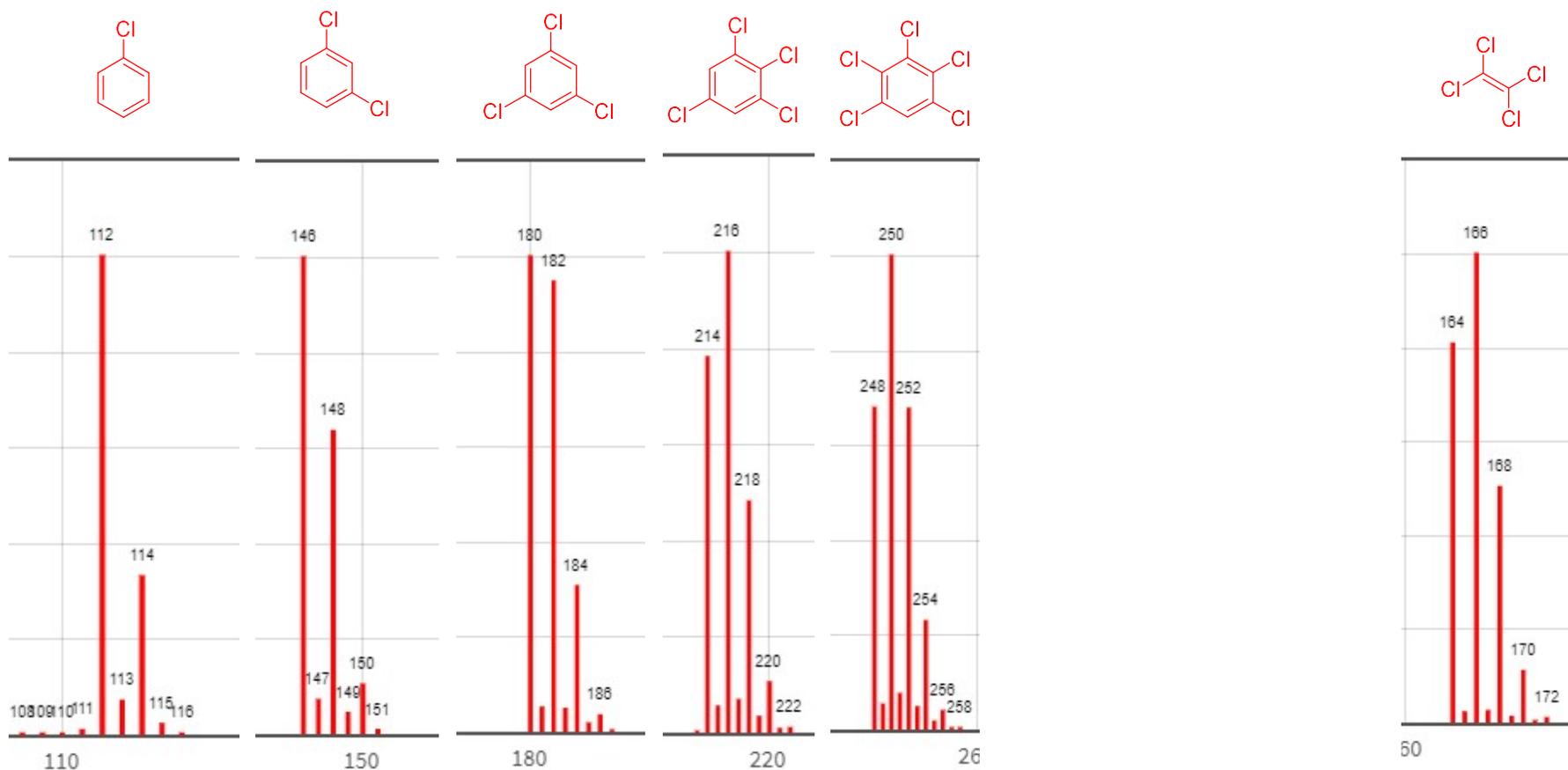
0,11

Ovviamente la somma delle probabilità è 1!



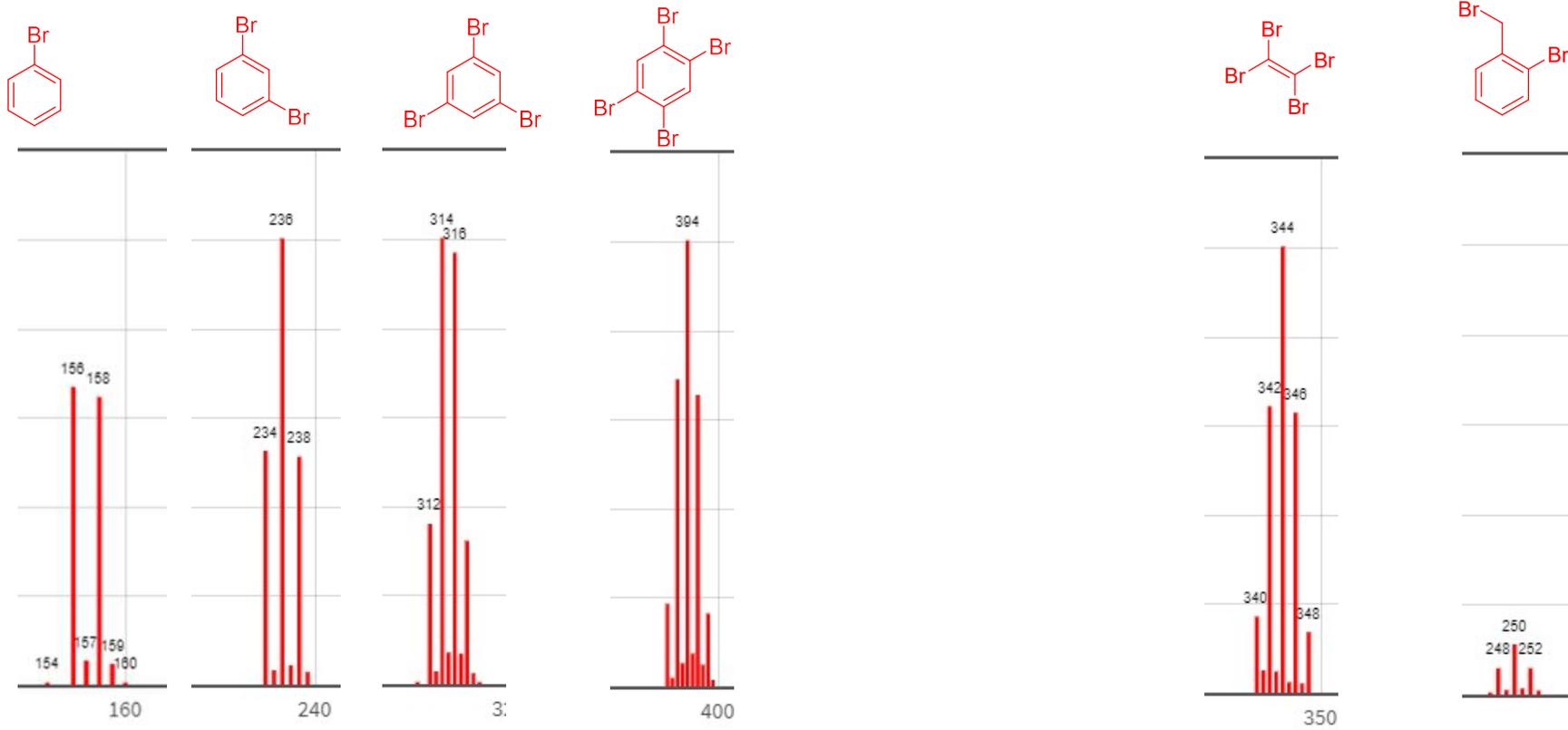
PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE

Lo stesso approccio si applica anche a casi in cui il numero degli atomi di cloro è superiore a 2 oppure abbiamo atomi di bromo etc. Il pattern di intensità dei picchi M, M+2, M+4 ect è caratteristico del numero di atomi di cloro (Bromo)



PATTERN ISOTOPICO E COMPOSIZIONE

Caso dei composti polibromurati



ESERCIZIO



Chemical Formula: $C_6H_3Br_3$
Molecular Weight: 314,80

Calcolare le intensità relative dei picchi M, M+2, M+4, M+6 per l'1,3,5-tribromobenzene
Sapendo che vale quanto segue



Bromo

^{79}Br 100%

^{81}Br 98,0%

QUALCHE ALTRA DEFINIZIONE

Massa nominale

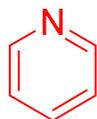
Integer mass the most abundant naturally occurring stable isotope of an element or the sum of the integer masses of the constituent elements of a molecular ion or molecule. (*Pure Appl. Chem.*, **2013**, 85, 1515–1609).

Si misura in Dalton Da

Esempi

Ossigeno: isotopo piu abbondante: ^{16}O massa nominale 16 Da Carbonio: isotopo piu abbondante: ^{12}C massa nominale 12 Da

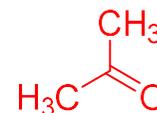
Azoto: isotopo piu abbondante: ^{14}N massa nominale 14 Da Cloro: isotopo piu abbondante: ^{35}Cl massa nominale 35 Da



Chemical Formula: $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$
massa nominale 79 Da



Chemical Formula: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$
massa nominale 112 Da

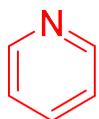


Chemical Formula: $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$
massa nominale 58 Da

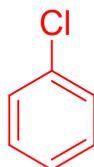
QUALCHE ALTRA DEFINIZIONE

Massa monoisotopica

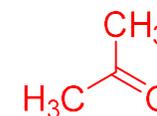
E' la massa di una molecola calcolata usando i valori di massa dell'isotopo **più abbondante** di ciascuno dei suoi elementi costituenti. Di misura in Da



Chemical Formula: C₅H₅N
monoisotopic mass 79,04220 Da



Chemical Formula: C₆H₅Cl
Monoisotopic mass: 112,00798 Da



Chemical Formula: C₃H₆O
Monoisotopic Mass: 58,04186 Da

Massa Esatta

'Calculated mass of an ion or molecule **with specified isotopic composition**' *Pure Appl. Chem.*, **2013**, 85, 1515–1609

Massa Accurata

Massa determinata sperimentalmente per uno ione di carica nota (generalmente con strumenti ad elevata accuratezza fino a 5 decimali)

«REGOLA» DELL'AZOTO

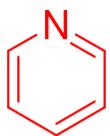
E' utile per capire se un composto (incognito) contiene azoto

- Si applica solo a composti organici contenenti H, C, N, O, P, S, Si, X, (alogenuri)
- Si applica solo a composti organici neutri.
- Si applica solitamente al picco M⁺.

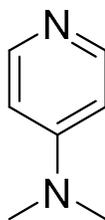
«Regola» dell'azoto:

Un composto con un numero dispari di atomi di azoto ha massa nominale di valore dispari.

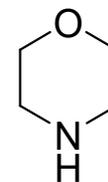
Un composto con un numero pari di atomi di azoto (o nessun atomo di azoto) ha massa nominale di valore pari.



Chemical Formula: C₅H₅N
Nominal Mass: 79,10



Chemical Formula: C₇H₁₀N₂
Nominal Mass:122



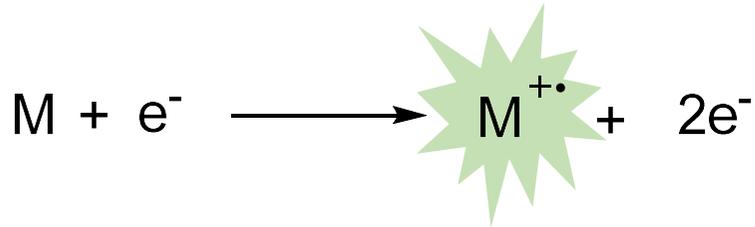
Chemical Formula: C₄H₉NO
Nominal Mass: 87

FRAMMENTAZIONI, RIARRANGIAMENTI ED ELIMINAZIONE DI MOLECOLE NEUTRE

Le frammentazioni, riarrangiamenti, ed eliminazione di molecole neutre da uno ione molecolare sono **tipiche** di analisi di massa condotte **mediante ionizzazione per impatto elettronico EI**.

Sono molto meno frequenti con altri metodi di ionizzazione.

Questi processi derivano dall'elevata energia degli ioni formati per impatto elettronico



IMPORTANTE: Sono tipiche, sono di aiuto nella identificazione di una struttura.

IMPORTANTE: è più facile che nella formazione di $M^{+\bullet}$ venga espulso un elettrone da coppie non condivise (n) rispetto ad elettroni di orbitali π rispetto ad elettroni in orbitali σ .