

1.1. 測定量とその取り扱い

どのような実験でも、その過程に測る(量る, 秤る, 計る)という操作が含まれており、実験結果は数値でもって定量的に表される。しかし、その数値は実験操作の過程に含まれる不確かさを含んでいる。したがって実験で得たデータに基づいて議論する場合、データがどこまで信頼できるかを、よく理解しておくことが非常に大切である。

1.1.1. 測定

1.1.1.1. 測定量

化学実験において、ある操作を行って何らかの測定量を得る場合、測定量は物理量であって、行っている操作は物理操作である。測定とはある物理量を数値で表すことで、1) 基準単位量を定義し、2) 被測定量が単位量の何倍かを比較して、3) その結果得られた数値が測定量である。例えば、長さを測定したときの測定量は、基準単位量である1メートルの何倍という数値である。さまざまな物理量のうち、長さ l [m メートル]、質量 m [kg キログラム]、時間 t [s 秒]、電流 I [A アンペア]、熱力学的温度 T [K ケルビン]、物質(の)量 n [mol モル]、光度 I_v [cd カンデラ]の7つが独立した次元をもつとみなされている。かつこ内に示すように、それぞれの物理量を表す記号は**イタリック体**で、基本単位を表す記号は**ローマン体**で書かれる。これらの基本単位は国際単位系(SI)によるものであり、SI基本単位である。SI単位の10の累乗倍または累乗分の1を表すのにSI接頭語が用いられる(表 1-1-1)。速度や力のような他の物理量は誘導物理量として基本物理量から物理法則に従って誘導される。

分子量について:ある物質の分子量(molecular weight)とは、その物質の分子質量(1分子当たりの質量)と ^{12}C 原子質量の1/12との比、と定義される相対分子質量(relative molecular mass of a substance)であり、次元をもたない。分子量にg単位をつけた質量はその物質1molの質量に等しい。生化学の分野でよく用いられるダルトン(dalton)は質量の単位で、1ダ

表 1-1-1 SI 接頭語

	大きさ	SI 接頭語	記号	大きさ	SI 接頭語	記号
ルトンは ^{12}C 原子1個の質量の1/12倍	10^{-1}	デシ(dec)	d	10	デカ(deca)	da
と定義されておりSI単位ではない。1ダ	10^{-2}	センチ(centi)	c	10^2	ヘクト(hecto)	h
ルトンは $1.6605655 \times 10^{-27}\text{kg}$ に相当する。	10^{-3}	ミリ(milli)	m	10^3	キロ(kilo)	k
ダルトンを用いる場合は分子量ではなく、	10^{-6}	マイクロ(micro)	μ	10^6	メガ(mega)	M
分子質量になる。ダルトンにDaという記	10^{-9}	ナノ(nano)	n	10^9	ギガ(giga)	G
号が用いられることがあるが、国際度量	10^{-12}	ピコ(pico)	p	10^{12}	テラ(tera)	T
衡委員会では認めていない。	10^{-15}	フェムト(femto)	f	10^{15}	ペタ(peta)	P
	10^{-18}	アット(atto)	a	10^{18}	エクサ(exa)	E

1.1.1.2. 測定機器

測定機器は被測定量と単位量(標準量)とを比較する道具である。ただし、被測定量と同種の標準量を直接比較することはまれである。通常は、被測定量を別の標準量と比較し易い量に変換して測定をおこなう。この変換を行う機器を変換器(トランスデューサ)と呼ぶ。

表 1-1-2 に挙げた例のように、ビュレットでは長さの標準量と比較しており、pH メータでは、被検液を用いて構成される電池の起電力(電位差)を pH の指定された標準溶液を用いた場合の電池の起電力(電位差)と比較している。

表 1-1-2 測定機器の物理量の変換

変換器	物理量の変換
ビュレット	体積 → 長さ
水銀温度計	温度 → 体積 → 長さ
pH メータ	水素イオン活量(濃度) → 電位差 → 電流(電流計)
光電管	光 → 電流(電流計)

1.1.1.3. 比較の方法

比較の方法には偏位方式(deflectional method)と零位方式(null method)がある。はかりの場合、ばねばかりは偏位方式であり、天秤は零位方式である。また電圧計の場合、指針電圧計は偏位方式であり、ポテンシオメータは零位方式である。偏位方式は簡便で感度の高い測定ができるが測定操作によって被測定系がみだされる。零位方式は簡便さ感度の点で偏位方式に劣るが、比較される標準量が準備されており、被測定系をみださないで正確な測定ができる。

1.1.2. 精度と正確さ

繰り返し測定で再現性ある結果が得られても、その結果が必ずしも真の値を示しているとはかぎらない。測定データの精度(precision)と正確さ(accuracy)の関係は図 1-1-1 のようになる。

精度の低いデータで平均値がたまたま真の値に近いことも無くはないが、一般には、精度の低い実験データは正確さも低い。

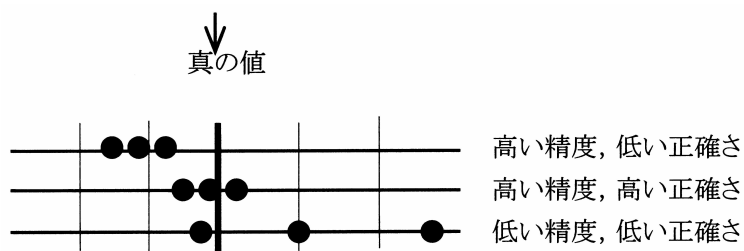


図 1-1-1 精度と正確さ(●は測定値)

1.1.3. 誤差

実験によって得た測定値は、真の値から多少とも異なるのが普通である。測定値と真の値との差が誤差となる。

1.1.3.1. 確定誤差(系統誤差)

一定の定常的な原因があつて、測定結果に系統的な影響を与える場合に生ずる誤差で、(1)測定機器に欠陥がある場合や、未補正のピペットを用いる場合などに生ずる誤差、(2)測定者のくせや不注意による実験操作上の誤差、(3)原理上目的の反応が完結しない場合や副反応がさけられない場合など、測定方法そのものに起因する誤差がある。(1)(2)は機器の校正、実験操作に対する注意と熟練によって回避可能または補

正可能であるが、(3)は方法を改めなければ避けることができない。確定誤差が大きいことは不正確であることと同じである。

1.1.3.2. 不確定誤差（偶然誤差）

同じ測定者が実質的に同一の実験条件下で行う連続測定においても、測定値にはばらつきがある。予測したり見積もったりすることの出来ないこの偶然の誤差はランダムな分散となる。この不確定誤差は正規分布する。偶然誤差が大きいことは不精密であることと同じである。

1.1.3.3. 正規分布と標準偏差

正規分布曲線は次式で与えられ、

$$y = \frac{\exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \quad (1.1.1)$$

図 1-1-2 に示すように、中央(平均値) μ に対して対称で、測定値と頻度との間に一定の関係がある。ここで、 σ は母標準偏差とよばれ、曲線の広がりを表す。中央の値を中心にして $\pm \sigma$ の幅をとると、全体の頻度の約 68%がその内部にはいり、 $\pm 2\sigma$ 、 $\pm 3\sigma$ でそれぞれ約 95%、99.7%がその内部にはいる。誤差がこのような分布をすることによって初めて統計量として取り扱いが可能になる。

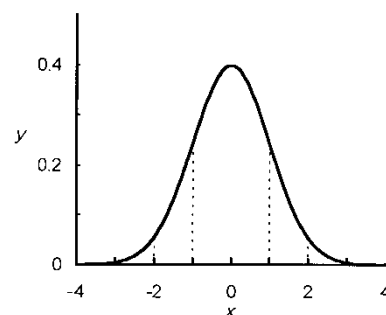


図 1-1-2 正規分布曲線

科学実験では通常、 n 回のサンプリングで得られた測定値 x_i ($i = 1 \cdots n$)から、真の σ 値を推定する。この標準偏差の推定値 s は標本標準偏差とよばれ、次式で算出される。

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \left(= \sqrt{\frac{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n(n-1)}} \right) \quad (1.1.2)$$

ここで、 $\bar{x}$ ($= \sum x_i / n$) は平均値である。 $s > \sigma$ となるが (1.1.2) 式からわかるように、 n が十分大きくなれば $n-1 \cong n$ となり、 $s \cong \sigma$ となる。また、 $100s/\bar{x}$ を相対標準偏差(RSD)または変動係数(CV)といい(単位:パーセント)、 s^2 ($= V$)を分散とよぶ。

1.1.3.4. 平均値の信頼限界

母集団から n 個のデータを抽出したときの平均値 $\bar{x}$ は真の値 μ と正確に一致するわけではなく、 μ を中心とした正規分布となる。このような $\bar{x}$ の標準偏差 $\sigma(\bar{x})$ は、母集団の標準偏差 σ より小さくなり、次の関係で表される。

$$\sigma(\bar{x}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (1.1.3)$$

したがって、たとえば95%の信頼度(危険率 $P = 0.05$)で、 $\bar{x}$ から真の値 μ の存在する範囲を推定するとすれば、正規分布曲線の特性より標準偏差 $\sigma(\bar{x})$ の ± 1.96 倍の幅を考えればよいので、

$$\mu = \bar{x} \pm 1.96\sigma(\bar{x}) \quad (1.1.4)$$

と得られる。しかし、実験では、(1.1.3)式の σ は未知であり、その推定値である標本標準偏差 s しかわからない。実験的な平均値 $\bar{x}$ の標準偏差 $s(\bar{x}) = s/\sqrt{n}$ から μ を推定する場合、その不確かさは実験値の自由度 ϕ ($= n-1$)が減少するとともに増大する。これを補正した値として、 t 値が表 1-1-3 のように求められている。この t を用いると、平均値 $\bar{x}$ の標準偏差 $s(\bar{x})$ から μ を次のように推定できる。

$$\mu = \bar{x} \pm ts(\bar{x}) = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.1.5)$$

表 1-1-3 信頼区間 95% ($P = 0.05$) に対する t 値

ϕ (自由度)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t	12.71	4.303	3.182	2.766	2.571	2.447	2.365	2.306	2.262	2.228
ϕ (自由度)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
t	2.201	2.179	2.160	2.145	2.131	2.120	2.110	2.101	2.093	2.086

1.1.3.5. 誤差の伝搬

測定値に演算を施したり、測定値間で計算を行ったりするとき、求める数値は測定値からの誤差をとまなう。求める数値 y が測定値 a, b, c の関数として、 $y = f(a, b, c, \dots)$ と表されるとき誤差 Δy は次のように表される。

$$\Delta y = \left(\frac{\partial f}{\partial a} \right) \Delta a + \left(\frac{\partial f}{\partial b} \right) \Delta b + \left(\frac{\partial f}{\partial c} \right) \Delta c + \dots \quad (1.1.6)$$

線形の場合(例: $y = k + k_1 a + k_2 b$)

$$\Delta y = k_1 \Delta a + k_2 \Delta b$$

この時 y, a, b の標準偏差を s_y, s_a, s_b とすれば、次の関係が得られる。

$$s_y^2 = (k_1 s_a)^2 + (k_2 s_a)^2 \quad (1.1.7)$$

乗除の場合(例: $y = ka/b$)

$$\frac{\Delta y}{y} = \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta b}{b}$$

このとき、 y, a, b の相対標準偏差を $s_y/y, s_a/a, s_b/b$ とすれば、次の関係が得られる。

$$\left(\frac{s_y}{y}\right)^2 = \left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 \quad (1.1.8)$$

べき乗の場合(例: $y = ka^n$)

$$\frac{\Delta y}{y} = \frac{n\Delta a}{a} \quad \frac{s_y}{y} = ns_a \quad (1.1.9)$$

指数対数関係の場合(例: $y = k^x$)

$$\frac{\Delta y}{y} = \ln k \Delta a \quad \frac{s_y}{y} = \ln k s_a \quad (1.1.10)$$

1.1.4. 有意差検定

ある試料を2人の実験者が同一の方法で得た分析値や、1人の実験者が2つの異なる方法で得た分析値、あるいは2つの試料を同一の実験者が同一の方法で得た分析値について、それぞれの平均値の間に本質的な差(確定誤差)があるか否かを判定することは、非常に重要な問題である。「2組の測定値の差は不確定誤差だけで説明できる」という仮説が正しいかどうかを決めるのに、有意差検定という手法が用いられる。

1.1.4.1. F検定 … 分散の仕方が同じか比較する！

2組の測定値が同じ母集団に属するのであれば、それぞれの測定値の分散(標準偏差の2乗)にはあまり差がないはずである。いま、このような2組の測定値の分散の比を F_0 とする。

$$F_0 \equiv \frac{V_1}{V_2} = \left(\frac{s_1}{s_2}\right)^2 \quad (\text{ただし } V_1 > V_2 \text{ とする}) \quad (1.1.11)$$

ある信頼度のもとで許される F_0 値の最大値を F 値とよび、たとえば信頼度 95%(危険率 $P = 0.05$) の場合の F 値は表 1-1-4 のようになる。

表 1-1-4 信頼度 95%($P = 0.05$)における F 値

$\phi_1 \backslash \phi_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4
3	10.1	9.55	8.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98

2組の実験値から得られた分散(あるいは標準偏差)から, (1.1.11)式にしたがって算出した F_0 値が, $F_0 \leq F$ となれば信頼度 95%で「2組の実験値の分散に有意の差がない」, つまり「2組の実験値の精密さに差がない」と推定できる. 逆に, $F_0 > F$ のときは, 信頼度 95%で「2組の実験値はそれぞれ異なった母集団に属する」と推定できる. このような検定法を F 検定とよび, これは本質的には2組の実験値の不確定誤差の比較を行うものである.

1.1.4.2. t 検定 … 平均値と比較!

(1) 母集団の μ と測定平均値 $\bar{x}$ との比較

母集団の平均値 μ が既知の場合, 実験で得られた平均値 $\bar{x}$ と μ との差が有意であるか, つまり確定誤差があるかどうか, あるいは正確さを決めるためには, t 検定を行う. (1.1.5)式を変形すると, 次式が得られる.

$$t_0 = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s(\bar{x})} = |\bar{x} - \mu| \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (1.1.12)$$

(1.1.12)式にしたがって実験結果から t_0 値を算出し, 表 1-1-3 の t 値と比較する. このとき, $t_0 \leq t$ であれば信頼度 95%で μ と $\bar{x}$ に有意の差がない, つまり, $\bar{x}$ には確定誤差がない, あるいは $\bar{x}$ は正確であると推定できる. 逆に $t_0 > t$ であれば信頼度 95%で確定誤差があると推定できる. このとき t の自由度 ϕ は $\phi = n-1$ となる.

(2) 2組の測定平均値 $\bar{x}_1$ と $\bar{x}_2$ の比較

2組の測定値が同じ母集団に属するものであれば, すなわち2組の分散(あるいは標準偏差)に有意な差がないとき(1.1.4.1.節参照), 両者の平均値の差に確定誤差があるかどうかの判定も必要になる. 2組の測定値に共通する標準偏差の合併推定値 $s(x_1, x_2)$ は次式で与えられる.

$$s(x_1, x_2)^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (1.1.13)$$

またこのとき, 2組の測定値の平均値の差 $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ の標準偏差 $s(|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|)$ は

$$s(|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|)^2 = s(x_1, x_2)^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

となる. この場合の t_0 は次式で与えられる((1.1.12)式参照).

$$t_0 = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s(|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|)} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) \{ (n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 \}}} \quad (1.1.14)$$

こうして得られた t_0 を表 1-1-3 の t 値と比較する. ただしこのときの t の自由度 ϕ は $\phi = n_1 + n_2 - 2$ となる. $t_0 \leq t$ であれば先の(1)の場合と同様, 信頼度 95%で $\bar{x}_1$ と $\bar{x}_2$ に有意の差がない, つまり, $\bar{x}_1$ と $\bar{x}_2$ との間には確定誤差がないと推定できる. 逆に $t_0 > t$ であれば信頼度 95%で確定誤差があると推定できる.

1.1.4.3. 異常値の棄却検定

1組の測定値の中でひとつの値が他の値からかけ離れている場合、その値を棄却すべきかどうかを判断する場合も、統計的な検定をする必要がある。このような異常値の棄却検定のひとつとして**ディクソン(Dixon)法**がある。1組の実験値をその大きさの順に並べ、疑わしい値 x_1 とし、これに最も近い値 x_2 とすると、 Q_0 を次のように定義する。

$$Q_0 = \frac{|x_1 - x_2|}{x_{\max} - x_{\min}} \quad (1.1.15)$$

ここで、 $x_{\min}$ と $x_{\max}$ はそれぞれ、測定値の中の最小値と最大値である。ある信頼度のもとで統計的に許される Q_0 の最大値を Q 値とよび、たとえば信頼度90%($P = 0.10$)の Q 値は表1-1-5のようになる。 $Q_0 > Q$ であれば、90%の信頼度で、 x_1 を棄却できる。逆に $Q_0 \leq Q$ であれば、棄却できない。

表 1-1-5 信頼度 90%($P = 0.10$)における Q 値

n (データ数)	3	4	5	6	7	8	9	10
Q	0.94	0.76	0.64	0.56	0.51	0.47	0.44	0.41

1.1.5. 最小二乗法

最近では試料中のある成分に特有な何らかの測定量(物理量)とその濃度(条件)との関係を利用した各種機器分析法が急速に進歩してきている。このような機器分析法では、濃度の異なるいくつかの標準試料に対する測定量と試料濃度の関係から検量線を作成し、それに基づいて未知試料の測定量からその濃度を決定することが多い。また、科学実験では2種類の数量(多くは物理量)の関係を検証することが頻繁に行われる。このような実験系は、条件(たとえば検量線における濃度)をいろいろ変えて実験するため、そこで得られる数値の取り扱い方は、1.1.4.節で述べたような同じ条件での実験値の取り扱いとは異なる。このような2種の数量を統計的に扱う手法を最小二乗法という。ここでは、条件 x と測定量 y が次式のような線形関係にある場合について簡単に述べる。

$$y = ax + b \quad (1.1.16)$$

ここで y は従属変数、 x は独立変数、 a は直線の傾き、 b は Y 軸の切片である。例えば、吸光光度法の検量線においては、 y は吸光度、 x は標準溶液の濃度である。ここで問題とするのは、いくつかの実験値から最適の a と b で表される直線 $\hat{y} = a\hat{x} + b$ を決めることである。この場合、「誤差は y だけにある」と仮定し、実験的 y 値と直線の $\hat{y}$ 値の差(y 残差)の平方和($= \sum (y - \hat{y})^2$)を最小にすることである。この原理に基づくと傾き a と切片 b は次のように与えられる。

$$a = \frac{\sum \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \left(= \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \right) \quad (1.1.17)$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (1.1.18)$$

ここで $\bar{x}$ はすべての x_i の平均値, $\bar{y}$ はすべての y_i の平均値である. こうして得られた直線は **x に対する y の回帰直線** という. また, 回帰直線が実験値にどれくらいよく合致するかを見積もる指標として **相関係数 r** がある.

$$r = \frac{\sum \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} \quad (1.1.19)$$

r は $-1 < r < 1$ の範囲をとり, $r = 1$ は完全な正の相関, $r = -1$ は完全な負の相関を表す. 通常の機器分析の検量線では $r > 0.995$ であることが望まれる. しかし, 2種類の数量(多くは物理量)の相関関係を検証する場合に $|r|$ は必ずしも 1 に近くないこともある. r 値が本当に有意であるかを検討する最も簡単な手法は, 次式で t_0 を求め, t 値と比較する方法(t 検定)である.

$$t_0 = |r| \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \quad (1.1.20)$$

このような線形回帰の t の自由度は $\phi = n-2$ である. $t_0 > t$ のとき, y と x は有意な相関があると推定できる.

一方, 傾き a と切片 b の標準偏差 $s(a)$ および $s(b)$ は次のように与えられる.

$$s(a) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2) \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.1.21)$$

$$s(b) = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 \sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n(n-2) \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.1.22)$$

標準偏差がわかれば(1.1.5)式と同様にして, 傾きや切片の信頼限界がわかる. 例えば, 切片の信頼限界は $b \pm ts(b)$ となる(t の自由度: $\phi = n-2$). 通常の機器分析の検量線の場合, 切片の信頼限界内にゼロが含まれていることが好ましい.

このような統計量は表計算ソフトを用いれば容易に求められるうえ, ほとんどのソフトには解析機能が標準的に組み込まれている. また多くの関数電卓にもこれに関連する統計量の計算機能が組み込まれているので, 計算はさほど面倒なことではない. 線形回帰で特に留意すべきことは, y と x が線形ではなく, なんらかの数学的処理($y' = f(y)$)を施したのちに線形回帰($y' = ax + b$)する場合である(例: 逆数プロットや対数プロット). この場合には, たとえ観測値 y の誤差が一定であっても, 変換値 y' の誤差は 1.1.3.5 節で述べたように一定とはならない. したがって, y' の各値に異なる重みをつけて線形解析する必要がある(重みをつけずに線形回帰した統計量, たとえば相関係数は全く意味を持たない). 重みを考慮した解析が行えるソフトに **gnuplot** がある. 重みを一定にして解析するには, 非線形な $y = h(x)$ としてそのまま非線形解析するほかない.

参考文献

- 1) M.L.McGlashan 著, 関 集三, 徂来道夫 共訳, SI単位と物理・化学量, 化学同人, 1981.
- 2) 海老原寛, 単位の小辞典, 講談社サイエンティフィック, 1992.
- 3) J.C. Miller, J.N.Miller 著, 宗森 信 訳, データのとりまとめ方, 共立出版, 1991.

1.2. 分析化学基本操作法

1.2.1. 化学体積計

1.2.1.1. 概要

化学体積計とは液体の体積を測定する容器のことで、通常は、ピペット、ビュレット、メスフラスコ、メスシリンダーの4種をさす(図 1-2-1)。このうち、ピペットとビュレットは**出用体積計**(標線で示される部分から液を流し出すとき、流出した液の体積が表示量に相当する[記号:A, Ex または TD])で、メスフラスコとメスシリンダーは**受用体積計**(標線で示される部分まで液を入れたとき、液の体積が表示量に相当する[記号:E, In または TC])である。ただし、メスフラスコには出用あるいは両用の標線を付したのものもある。後者の場合、出用の標線は受用の標線より上にある(図 1-2-1(d))。出用体積計の標線は液体を流し出したとき、体積計内壁に付着する液体量も考慮してある。

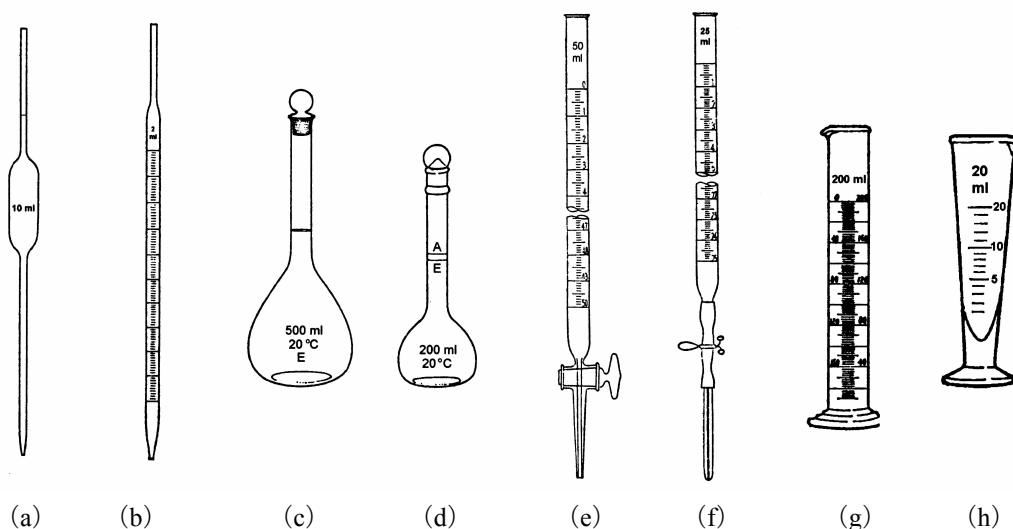


図 1-2-1 ガラス体積計 (a)ホールピペット, (b)メスピペット, (c)メスフラスコ(受用), (d)両用メスフラスコ, (e)活栓付ビュレット, (f)モールビュレット, (g)メスシリンダー, (h)メートルグラス

このようなガラス体積計を使用する場合、原則として、メニスカス(円筒内の液体が毛管現象によって生ずる凹凸面)の下底を、水平方向から見て、標線に合わせる(図 1-2-2)。

ガラス体積計は、加熱によりひずみが生ずるので、厳密には加熱乾燥してはならない。ただし、実験の種類(例:滅菌処理する場合等)によっては、加熱処理する必要もある。このような場合には、非加熱体積計と区別して使用する。生命科学関係では、このほかマイクロピペット(ピペットマンなど)も出用体積計として汎用される。以下、各体積計の使用方法を簡単に述べる。

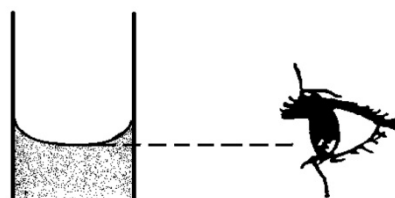


図 1-2-2 メニスカスの視定

1.2.1.2. ピペット

ピペットには、球部があり標線が1つだけのホールピペット(図 1-2-1 (a))と、直管型でいくつかの細かい標線がついたメスピペット(図 1-2-1 (b))がある。正確さは前者の方が優れている。メスピペットにはピペットの先まで標線があるもの(吹き出し型)と直管部分にのみ標線があるもの(図 1-2-1 (b))があるので、使用に際して注意が必要である。また、液の吸い上げ、押し出しをゴム(あるいはシリコン)球で行う安全ピペッタもある。特に、危険な溶液を扱う場合は、直接吸い上げることはせず、必ず安全ピペッタを使用すること。ここでは指操作によるホールピペットの用法について述べる。

- ① 洗浄したピペットで、液を少量吸い上げ、ピペットを横にしてまわし、内壁を液になじませ、共洗する。この操作を3回繰り返す。[注:少量の液を吸い上げるとき、先が必ず液内部に浸っているように注意すること。]

液を標線の少し上まで吸い上げ、人差し指で上端を押さえて、標線が目の高さにくるまで持ち上げる(図 1-2-3)。

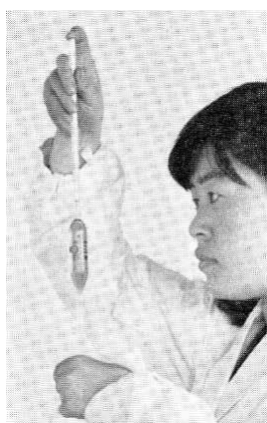


図 1-2-3 ピペットの持ち方

- ③ 人差し指を少し横にずらすようにゆるめて、メニスカスをゆっくり下げ標線に合わせる。このとき、ピペットの先端は溶液から離れた状態に保つこと(溶液中につけたままでは浮力分の誤差が生ずる)。気泡が入らないように注意する。
- ④ 液を別の容器に流し出す。しばらくしてから、人差し指で上端を押さえ、球部を左手で握り、中の空気を暖め、先端に残った液を押し出す。先端を容器内壁に軽くこすり液滴を落とす。このとき、先端に残った液を吹き出してはならない(出用体積計では一定の条件で流れ出る液量に対して標線が付されており、出し方を変えれば、体積も変化する)。ただし、容量が 5 mL 以下の場合は、呼気で吹き出す。
- ⑤ 使用後はよく水洗し、洗剤溶液に一晩浸した後、ピペットウォシャーで十分洗浄し、蒸留水で洗浄する。その後、先を上にして立て放置乾燥する(ピペットの先は非常に重要な部分である)。

【安全ピペッタ】

安全ピペッタには多種あるが、ほとんどはゴム(あるいはシリコン)製であり、スポイトと同様の原理で液の吸い上げと押し出しを行う。安全ピペッタには2カ所あるいは3カ所の空気弁があり、通常は閉じたままになっている。

この空気弁を外部から押さえると弁が開く構造になっている。このことに留意すれば、他の操作は手動の場合と同じである。

1.2.1.3. ビュレット

- ① 栓付ビュレットを(図 1-2-1 (e))のすり合わせの活栓は、ひもで本体コック部につないでおく。洗浄したビュレットの活栓を抜き出し、孔の部分避けた両端に近いすり合わせ面にグリースを薄く塗り、再び差し込んで緩やかにひねり、グリースをなじませる(既にグリース処理してある場合、あるいはテフロン活栓の場合はこの操作は不要)。一旦、水を入れて、液漏れがないことを確認する。
- ② 活栓を閉じた後、ビュレット上端にロートをのせ、使用する液(標準溶液)を $1/10 \sim 1/5$ ほど入れ、ビュレットを横にして静かにまわして共洗いをする。この操作を 3 回繰り返す(ロートで液を入れる際には、空気の出口をつくるため、指でロートを少し持ち上げる)。共洗い時の洗浄液は廃液として捨てる。
- ③ ビュレットをたて、ロートを用いて使用する液をゼロ線より少し上まで入れる。コックを全開にし、液を先端まで満たす。このとき、先端や活栓部に気泡が溜らないように注意すること。[活栓コックの他に、簡便型として、ピンチコックのもの(図 1-2-1 (f))やゴム管にガラスビーズを閉じこめた形式のものがある。後者の場合、ガラスビーズを摘むようにして流量を調節する。]気泡除去などのために流した標準溶液は再度利用する。
- ④ メニスカスを見ながらゼロ点に合わせた後、滴定する(ビュレットがきちんと鉛直方向になっていることを確認しておく)。滴定に際しては目盛りの $1/10$ の単位(0.01 mL)まで読みとる。
- ⑤ 使用後、残った液は捨て、もとのびんに戻してはならない。ビュレットはよく水洗し、活栓を抜き、先端を上になて乾燥する。

1.2.1.4. メスフラスコ

メスフラスコのすり合わせの栓は、ひもでフラスコの首部につないでおく。

- ① 秤量瓶で精密秤量した試料(1.2.2.2.節参照)、あるいはピペットで正確にはかりとった液体試料(1.2.1.2.節)を、洗浄したメスフラスコに移す。固体試料は、必ずいったん溶かしてから、メスフラスコに移すこと。また、液体を移すとき、メスフラスコの首部をぬらさないようにすること(首部のすりあわせ部分には、液体がたまりやすく、体積誤差の原因となる)。
- ② 完全に溶けたことを確認した後、標線の少し下まで水を加え、小ピペット(駒込ピペット、パストゥールピペット等:ホールピペットやメスピペットを代用しないこと!)から少量ずつ水を加え、メニスカスを標線に合わせる。
- ③ 乾いた栓をして上下に数回倒してまぜ合わせる。
- ④ この溶液を試薬瓶に移し、内容物、調製日、調製者名を書いたラベルを貼る。このとき、試薬瓶は少量の溶液でよく共洗いしてから用いること。また、光に鋭敏な試薬は褐色瓶に保存すること。
- ⑤ 使用後はよく水洗し、さかさに立てて放置乾燥する。(使用後の試薬瓶のラベルは必ずはがす。)

メスフラスコは、標準溶液や測定試料溶液のように精密秤量や正確な体積計量を行った試料の溶液調製あるいは希釈を行うためのものである。発色試液や緩衝液のように、秤量や体積計量の精度が必ずしも高くないものの溶液の調製には、メスフラスコを使用しても意味がない(1.1.3.5節参照)。このような溶液の調製には、メスシリンダーを用いる(1.2.1.5節参照)。

1.2.1.5. メスシリンダー

メスシリンダーを受用体積計として用いるには、未知体積を計量する場合と、溶液を一定体積に希釈する場合がある。後者の目的でメスシリンダーを用いる場合には、メスフラスコほどの精度を要求しない場合に限られ、その操作は以下のように行う。

- ① 薬包紙等で秤量した試料(1.2.2.3節参照)あるいは一定量の溶液をビーカーに移し、最終溶液体積の8割程度の水で完全に溶かす。[注:固体試料を直接メスシリンダーに入れて溶かすことは、溶液が均一にならないので避けるべきである。]
- ② この溶液をすべてメスシリンダーに移し、ビーカー内壁を少量の水で洗浄し、その洗液もメスシリンダーに移す。
- ③ 水を加え、メニスカスを標線に合わせる。
- ④ この溶液を、先に用いたビーカーに移しよく混合する。これを先に用いたメスシリンダーに再度移し、均一にする。
- ⑤ この溶液を試薬瓶に移し、内容物、調製日、調製者名を書いたラベルを貼る。このとき、試薬瓶は少量の溶液でよく共洗いしてから用いること。また、光に鋭敏な試薬は褐色瓶に保存すること。

より低い精度で溶液調製する場合には、メスシリンダーを出用体積計としても用いることもある。この場合、ピペットや出用メスフラスコで規定されている体積以外の体積でも計量できる利点がある。ただし、固体試料をメスシリンダー内で直接溶かしてはならないことは、①で述べたとおりである。また、メスシリンダーのなかには、円錐形をしたメートルガラスとよばれるものもあるが(図 1-2-1 (h))、その精度は円筒型メスシリンダー(図 1-2-1 (g))に比べて劣る。

1.2.1.6. マイクロピペット (ピペットマン・)

マイクロピペットは、比較的微量な体積を複数回はかりとる場合に非常に便利で、特に生命科学分野で汎用される。しかしその体積の正確さはピペットに比べ劣る欠点もある。マイクロピペットは、ピペットと同様、最大容量の異なるいくつかのモデルがあり、目的とする容量によってそれらを使い分ける必要がある。ここではギルソン社のピペットマン・(Pタイプ)を例に挙げて使用法を説明する(Pの後の数字は最大容量を μL 単位で表している)。

- ① モーションナットあるいはアジャスティングノブを回して、本体上部のデジタル目盛りを希望の容量にセットする(図 1-2-4)。あそびがあるので、目盛り設定は、必ず減らす方向に回転して合わせる。したがって、目盛りを増やす場合には、希望の目盛りより $1/3$ 回転ほど越えて、その後減らしながら合わせる。目盛りの読み方の例は図 1-2-4 に示した。

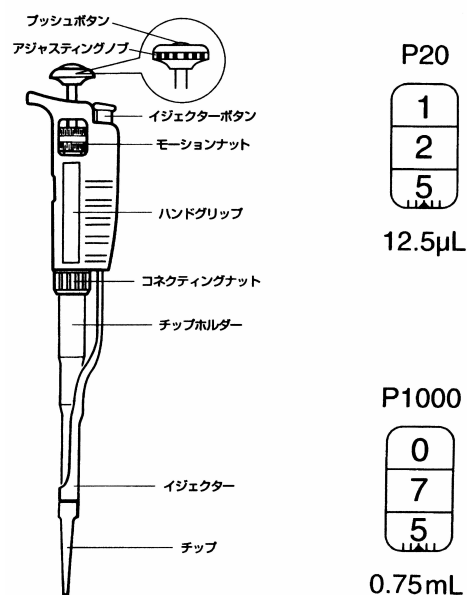


図 1-2-4 ピペットマン®(Pタイプ)の構造とその目盛りの読み方

- ② ピペットマン®のチップホルダーの先端に、所定のチップをしっかりと固定する。チップはピペットマンのモデルごとに決められている。
- ③ プッシュボタンを第1ストップまで押し下げ(図 1-2-5)、垂直のまま先端を溶液に浸し、プッシュボタンをゆっくり戻し、液を吸入する[第1ストップまでの容量がはかりとる容量である]。このとき、チップ先端の深さは以下のようにし、決して深すぎないようにすること。

P-2, P-10: 1 mm 以下

P-20, P-100: 2～3 mm

P-200～P-1000: 2～4 mm

P-5000: 3～6 mm

- ④ 1 秒ほど待ったのち、静かに引き上げ、チップ先端に液滴が付着しておれば、チップの外側のみをふき取る。
- ⑤ 移す容器の内側にチップの先端をそわせ、プッシュボタンをいったん第1ストップまでゆっくり押し下げる。そのまま1秒ほど待ったのち、プッシュボタンを第2ストップまで押し下げ、チップ内に残った液を完全に吐出する(図 1-2-5) [P-2, P-10 では第1ストップで止める必要はない]。
- ⑥ プッシュボタンを押したまま、チップを容器の内壁にすべらせながら注意深くあげ、その後、プッシュボタンをはなす。
- ⑦ 使用済みのチップは、インジェクターボタンを親指で押してはずす。

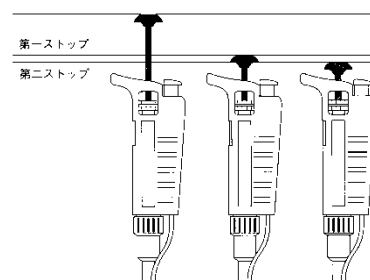


図 1-2-5 ピペットマンの2段ストローク

【参考】

A) チップ内壁に付着した液体を洗い流し精度を上げる方法

ピペットマン[®]ではかりとった液を大量の溶液に分注する場合、上記⑤の操作の後、チップの先端を溶液につけたまま、液を再度吸入し、引き続き第1ストップまで押し下げる。この操作を数回繰り返した後、第2ストップまで押し下げる。その後、上記⑥以降の操作を行う。

B) チップの予備洗浄により再現性を向上させる方法

タンパク質等の試料溶液の場合、はかりとる前に、試料溶液の吸入・吐出を数回繰り返し、チップ内壁を試料溶液になじませる。チップ内の液を吐出した後、上記③以降の操作を行うことにより、再現性が向上する。

1.2.2. 重量測定法

1.2.2.1. 概要

重量測定には上皿天秤、化学天秤、直示天秤などがあるが、最近では電子天秤を使用することが多い。電子天秤には、秤量上限あるいは、感度等がそれぞれの機種ごとに設定されており、目的に合った機種を選定することが重要である。

図1-2-6に(上皿)電子天秤の原理を示す。皿上に質量 M の物質をおくとき、重力 Mg が加わり、さおが傾く。このさおの傾き量は、さおの他端にある光学系位置検出器で検出される。一方、電磁石に電流を流し Mg と釣り合う復元力を発生させ、さおを元の水平の位置に保つようにする(零位方式;1.1.1.3.節参照)。このとき、零位に保つのに要する電流が Mg に比例する。この電流値はA-D変換され、 Mg 量としてデジタル表示される。このように電子天秤は、ばねばかりと同様、重力を測定するものであり、上皿天秤、化学天秤、直示天秤のような質量を測定するものではない。したがって、電子天秤は使用する場所を変えたら必ず校正する必要がある。また、電磁石の温度係数は比較的大きいので高精度測定では、温度補償も必要となる。

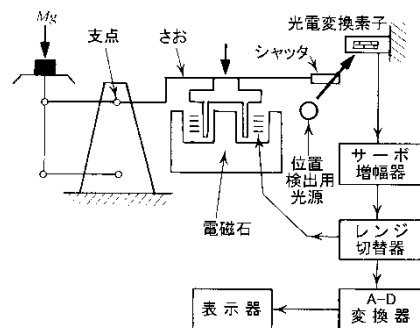


図 1-2-6 電子天秤の原理図

1.2.2.2. 精密秤量

物質を定量的に分析する場合、必ず基準とするものがあり、その基準値を決定するのはほとんどの場合、質量(重量)である。したがって、標準物質や測定試料の秤量誤差は、その後のすべての測定値に反映されることを十分認識しておく必要がある(1.3.5.節参照)。このように、秤量した質量(重量)が後の測定値に反映する場合には、必ず0.1 mg単位まで精密に読みとる。この目的のためには、当然、0.1 mgまでの精度が保証されている精密天秤を用いる。また、たとえば「約1 gを精密に量る」とは、その表示量の10 %以内(すなわち 1 ± 0.1 g)を0.1 mgまでの精度で量りとることであり、決して1.0000 g秤量することではない。そのような努力をすることは無駄であり、むしろ秤量に膨大な時間を費やすため、水分吸収等の誤差を招くことになる。また、通常の精密秤量では有効数字が4桁となるようにする。

精密秤量には、基本的には秤量瓶を用いる。また秤量後、別の容器(たとえばメスフラスコ)に試料を移す際は、必ず秤量瓶に付着した試料を、使用する溶媒で流し込む。さもなくば、精密に秤量した努力は全く意味をなさなくなる。

精密秤量を行う場合は、天秤の扉は閉じて目盛りを読むことが重要である。空気の対流による秤量誤差をなくすためである。また熱対流によっても秤量誤差が生ずる。したがって、高温試料の秤量は避けるべきである。

精密秤量あるいはこの後の一般秤量の場合を問わず、一度試薬瓶からとり出した固体試薬を、再び戻すようなことはしてはならない。

1.2.2.3. その他の注意事項

【一般秤量】

実験条件設定のための溶液調製(例：発色試液や緩衝液)においては、標準物質や測定試料の場合ほど高精度な秤量は要求されない。このような場合、一般精度の電子天秤(あるいは上皿天秤)を用いれば十分ことが多い。少なくとも、高精度に秤量することは無意味である。また、こうした一般秤量にはパラフィン紙(薬包紙)等を用いてもよい(秤量後の溶液調製については1.2.1.5.節参照)。ただし、試液にはその濃度の許容限界が狭い場合もあるので、その精度は実験に応じて適宜判断しなければならない。

【冷蔵・冷凍品の秤量】

タンパク質等、温度変化を受けやすい試料(試薬)は、冷蔵あるいは冷凍保存されている。このような試料の入った容器を、冷蔵(凍)庫から取り出し、すぐにふたを開けると、温度差のため、試料(試薬)が露結し、吸湿してしまう。これを避けるため、容器のふたを閉じたまま、デシケータ中で、室温に戻してから秤量する。場合によっては、デシケータをアスピレータで減圧しながら室温に戻す。秤量後は、速やかに密栓して冷蔵(凍)庫に保管すること。

【保守】

天秤は安定した平らな実験台に置き、水平になっていることを確認しておく。天秤はいかなる精度のものであっても、試料をこぼしてはならない。こぼれた試料は天秤の腐食、あるいは誤作動の原因となる。質量(重量)測定の重要性を認識していれば、このことがどのような問題を引き起こすかわかるはずである。万が一、試料をこぼした場合には、速やかによくふき取ること。共用天秤の場合、使用責任が不明確になりやすいが、こぼれた試料を放置するものは、実験・研究をする資格はない。また、扉付きの天秤(精密天秤)の場合、使用後は必ず扉を閉じ、電源を切ること。

1.2.2.4. ガラス体積計の補正(重量法)

出用体積計の場合には、検査すべき体積計を用いて、所定の手法によりはかりとった溶液の重量 W を精密測定し、その値から体積計の体積 V を算出する。一方、受用体積計の場合は、検査すべき体積計の空重量 W_0 を精密測定した後、標線まで液体を入れる。体積計とともに秤量(W_1)し、内部の液体の重量 $W(=W_1 - W_0)$ を見積もる。この W から体積計の体積 V を算出する。液体としては、通常、純水を用いる。

体積計の標線は 20 °C におけるものとして定められているが、検査は 20 °C で行うとは限らない。したがって、実施水温時における水の密度 (表 1-2-1 (a)) と容器の体積膨張率および浮力を考慮して補正しなければならない。表 1-2-1 (b) はこれらを合算した換算補正值 c を示す表である。水温におけるこの c 値を用いると、体積 V は次のように得られる。

$$V = (1 + c)W \quad (1.2.1)$$

表 1-2-1 (a) 1 気圧における水の密度 (g cm^{-3})

t (°C)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	0.99970	0.99961	0.99949	0.99938	0.99924	0.99910	0.99894	0.99877	0.99860	0.99841
20	0.99820	0.99799	0.99777	0.99754	0.99730	0.99704	0.99678	0.99651	0.99623	0.99594

表 1-2-1 (b) ガラス体積計の換算補正值 ($c \times 10^5$)

t (°C)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
14	197	198	199	200	201	203	204	205	206	207
15	209	210	211	213	214	215	216	218	219	221
16	222	223	225	226	228	229	230	232	233	235
17	236	238	239	241	242	243	245	247	248	250
18	252	253	255	257	258	260	261	263	265	267
19	268	270	272	273	275	277	279	280	282	284
20	286	288	290	291	293	295	297	299	301	303
21	305	307	308	310	312	314	316	318	320	322
22	324	326	328	330	333	335	338	339	341	343
23	345	347	349	352	353	356	358	360	363	365
24	367	369	371	374	376	378	381	383	385	387
25	390	392	394	397	399	402	404	406	409	411

1.2.3. 溶液調製法

1.2.3.1. 標準溶液

1.2.2.2.節で述べたように、定量分析を行う場合、ほとんどの場合、基準物質の質量(重量)が基準となる。この基準物質のことを一次標準物質(例: スルファミン酸[酸あるいはアミンとしての標準], 炭酸ナトリウム[塩基としての標準])とよび、その純度は 100% に十分近いものである。分子量 M_w の固体標準物質から、一定濃度 C の標準液を体積 V だけ調製するには、重さ W を精密に量り、

$$W = M_w C V \quad (1.2.2)$$

水で正確に V とする。このとき、正確に W 量るのではなく、その $\pm 10\%$ 以内で、0.1 mg まで精密に量ればよいことは 1.2.2.2.節で述べたとおりである。このようにして得られた標準溶液の真の濃度は、 C_{real} となる。真の濃度 C_{real} と表示濃度 C の比はファクター f とよぶ。

$$C_{\text{real}} = f C \quad (1.2.3)$$

C_{real} を用いることは、実験の間では重要であるが、一般性に欠ける。したがって、化学量論的な記述には、

C_{real} ではなく C を用いる。そして実験の場合では、必ず f を用いて補正する。なお、濃度表現のひとつに規定度というものがあるが、これは反応によって定義されるものであり、必ずしも一義的には決定できない(たとえば KIO_3)。このため、現在は規定度という表現は用いないことになっている。

現実には上記のような一次標準物質の種類は限られているうえ、常に一次標準物質までさかのぼって定量するのは煩雑である。このような場合、以下の2つの方法がとられる。まず、第1の方法は、適当な定量的反応を利用して、一次標準物質を基準に、別の溶液のファクターを決定する。この操作を標定とよび、得られた溶液を2次標準溶液とよぶ(例:スルファミン酸で標定した水酸化ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウムで評定した塩酸水溶液)。二次標準溶液を用いても、分析の正確さが大きく低下することはない。二次標準溶液の調製においては、そのものの純度は必ずしも高くはないものであるため、精密に秤量する必要はなく、結果として、正確な体積に希釈する必要もない(メスフラスコで計量すれば十分である)。ただし、標定操作は必須である。

[注: **水酸化ナトリウム**は、吸湿性のうえ、空気中の二酸化炭素をも吸収しやすいため、その純度はかなり低い。このため固体水酸化ナトリウムを精密天秤で秤量することは全く意味がなく、避けるべきである。また水酸化ナトリウムに含まれる炭酸イオンを除去するには、水酸化バリウムを少量加え、炭酸バリウムを沈殿させた後、ろ過して用いる方法(水酸化バリウム法)と、水酸化ナトリウムの濃厚溶液を調製し、1週間程放置し炭酸ナトリウムを沈殿させた後、上澄みを利用する方法(濃厚溶液法)がある。いずれの場合も希釈する際は、沸騰して炭酸を追い出しその後冷却した純水を使用しなければならない。]

第2の方法は、一次標準物質に準ずる物質の質量(重量)を基準とする方法である。特に複雑系では、高純度標準物質を入手することが困難であることも多く、この手法がよく用いられる。溶液調製は一次標準物質の場合と全く同じである。準標準物質の場合には、その純度がその後のすべての分析の正確さを左右するので、用いた準標準物質の入手法を明示することが重要である。(例:タンパク質の定量法のひとつであるローリー法において、その標準物質として牛血清アルブミンが用いられるが、その純度には大きな差があるので、用いた標準試料の純度に留意すべきである)。

1.2.3.2. 分析試料溶液

分析すべき未知試料物質を溶液にするには、その濃度を明確に定義する必要があるため、溶液調製においては、精密に秤量して(1.2.2.2.節参照)、正確に希釈(1.2.1.2.および1.2.1.4.節参照)することは当然である。

1.2.3.3. 液体試薬

市販試薬が液体の場合、適当な濃度 C に調製する際、その試料のはかり方には、重量法と容量法の2通りがある。重量法では、市販液体の含量 $P(\text{w/w}\%)$ を考慮すれば、量りとる重量 W は次のように与えられる(他の記号は(1.2.2)式と同一)。

$$W = \frac{100 M w C V}{P} \quad (1.2.4)$$

一方、容量法では、液体の密度 d も考慮する必要があるが、はかりとる体積 V_s は、

$$V_s = \frac{100 MwCV}{Pd} \quad (1.2.5)$$

となる。比較的よく使われる市販液体試薬の P と d の値を表 1-2-2 にまとめた。試薬によってはこれらの値が異なるものもあるので、表示ラベルに注意されたい。また、 P や d の精度は低いので、通常の溶液調製において、液体試薬の重量や体積を精密（あるいは正確）にはかる必要はなく、また、正確な体積に希釈する必要もない。ただし、溶液を標準液として用いる場合には、必ず適切な標定操作を行い、溶液のファクターを決定する必要がある。なお、硫酸を希釈する場合には、必ず水に硫酸を加えるようにする。

表 1-2-2 市販液体試料濃度表 (15 °C)

試薬名	化学式	(Mw)	$d[\text{g mL}^{-1}]$	$P[\text{w/w \%}]$	近似濃度[M]
塩酸	HCl	(36.47)	1.19	37	12
硝酸	HNO ₃	(63.02)	1.42	70	16
硫酸	H ₂ SO ₄	(98.08)	1.84	96	18
リン酸	H ₃ PO ₄	(98.00)	1.70	85	15
(氷)酢酸	CH ₃ COOH	(60.05)	1.06	96	17
アンモニア水	NH ₃	(17.03)	0.90	28	15
過塩素酸	HClO ₄	(100.47)	1.55	60	9
過酸化水素水	H ₂ O ₂	(34.01)	1	30	9

1.2.4. ガラス電極による pH 測定法

1.2.4.1. 原理

pH 値は、水素イオン(H^+)の活量を a_{H^+} とするとき、次のように定義される。

$$\text{pH} \equiv -\log a_{\text{H}^+} \approx -\log[\text{H}^+] \quad (1.2.6)$$

一方、実用的 pH は、通常、図 1-2-7 に示したようなガラス電極を用いて測定する。ガラス薄膜の両側に試料液 x と基準液 s を接触させると、両相の pH 差に比例した膜電位 (ΔE) が発生する。

$$\Delta E = A - B \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{H}^+(x)}}{a_{\text{H}^+(s)}} = A + 2.303B \frac{RT}{F} (\text{pH}_x - \text{pH}_s) \quad (1.2.7)$$

ここで、 R , T , F はそれぞれ気体定数、絶対温度、ファラデー定数で、 A はガラス面の不均一さに起因する誤差（不斉電位）等を表し、 B は理想的ネルンスト(Nernst)型応答からのずれを表す。 ΔE は、溶液 x と s に同一の参照電極(図 1-2-7 では Ag/AgCl)を浸し、その電極間の電位差を、内部抵抗の高い電圧計で測定する(ポテンシオメトリ)。この原理に基づいた pH 測定装置を pH メータとよぶ。

1.2.4.2. 使用方法

pH メータには様々な機種があるので、ここではそれらに共通する一般的使用法について述べる。

- ① ガラス電極は、十分水になじませた状態で使用する(ガラス電極が乾かないように注意する)。また、ガラス先端部は非常に破損しやすいので、取り扱いには特に注意すること。
- ② 内部液補充口のゴム栓を開く。(液絡部において内部液側が測定液側に対して加圧状態に保つため)
- ③ 手動温度校正の場合、温度を適宜設定する((1.2.7)式の T の設定)。
- ④ ガラス電極を純水でよく洗浄し、ティッシュペーパー等でふき取ったのち、pH 7 の標準溶液に浸し、規定値に校正する((1.2.7)式の A 項の補正)。pH 測定に際しては、必ずガラス電極の液絡部分まで被検液に浸るようにすること。
- ⑤ ガラス電極を再度純水でよく洗浄し、ふき取ったのち、pH 4 あるいは 9 の pH 標準溶液に浸し、規定値に校正する((1.2.7)式の B 項の補正)。ここで④⑤の順番は厳守すること。
- ⑥ ④または⑤で大きな調整を必要とした場合には、④⑤を繰り返す[④～⑥を2点校正法とよぶ]。
- ⑦ ガラス電極を純水でよく洗浄しふき取った後、それを測定液に浸し、安定したのち、値を読む。
- ⑧ 理想的には、溶液を緩やかに攪拌した状態で pH(電位)測定するのが好ましい。
- ⑨ 使用後は、ガラス電極をよく洗浄し、内部液補充口のゴム栓を閉じたのち、水に浸して保存する。
- ⑩ ガラス電極の応答が遅い場合、ガラス電極先端をしばらく希塩酸に浸したのち、使用する。特に液絡部の汚れは、応答を著しく低下させる原因であるので、注意すること。

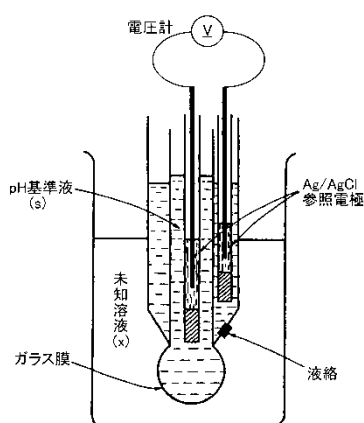


図 1-2-7 ガラス電極の構造

1.2.5. 緩衝液

1.2.5.1. 酸塩基平衡

一塩基酸 HA は、水溶液中で次のような解離平衡にあり、



その真の平衡定数(酸解離定数) K_a° は、次のように定義される。

$$K_a^\circ = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}} \quad (1.2.9)$$

ここで, a_{HA} および a_{A^-} は, それぞれ共役酸 HA および共役塩基 A^- の活量である. 活量 a と濃度 C との関係は, 次のように表されるので,

$$a = \gamma C \quad (1.2.10)$$

濃度で表現した見かけの酸解離定数 K_a は, HA および共役塩基 A^- の活量係数 γ_{HA} および γ_{A^-} を含んだものとなる.

$$K_a \equiv \frac{a_{\text{H}^+} [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a^\circ \frac{\gamma_{\text{HA}}}{\gamma_{\text{A}^-}} \equiv \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.2.11)$$

また $-\log K_a = \text{p}K_a$ とすると,

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \quad (1.2.12)$$

となる.

水自体は両性(酸としても塩基としても働く性質)であり, HA の酸塩基平衡を考える場合には, 水の自己解離平衡も考える必要がある(このように溶媒の自己解離平衡が関与する点が, 酸塩基反応の大きな特徴のひとつである).



ここで K_W は水のイオン積(水の自己解離定数)とよばれる(真の自己解離定数は活量で定義されるが, ここでは関係する活量係数を含んだ値を平衡定数として扱う).

一方, 一酸強塩基 BOH は完全解離する.



いま, HA と BOH の単独あるいは混合溶液を, 全濃度 C_A の HA と全濃度 C_B の BOH からなるものと考えれば, 次の関係が成り立つ.

$$C_A = [\text{HA}] + [\text{A}^-] \quad (\text{A の全濃度}) \quad (1.2.15)$$

$$C_B = [\text{B}^+] \quad (\text{B の全濃度}) \quad (1.2.16)$$

$$[\text{B}^+] + [\text{H}^+] = [\text{A}^-] + [\text{OH}^-] \quad (\text{電気的中性の原理}) \quad (1.2.17)$$

(1.2.11)式と(1.2.15)式より, $[\text{A}^-] = C_A K_a / (K_a + [\text{H}^+])$ と得られ, これを(1.2.13)式, (1.2.16)式とともに(1.2.17)式に代入すると, 一塩基酸と強塩基との酸塩基反応を示す一般式が得られる.

$$C_B + [\text{H}^+] = \frac{C_A K_a}{K_a + [\text{H}^+]} + \frac{K_W}{[\text{H}^+]} \quad (1.2.18)$$

【弱酸・弱塩基単独溶液】

HA 単独溶液の場合には $C_B = 0$ である。 $C_A K_a \gg 10^{-12} \text{ M}^2$ かつ $C_A \gg K_a$ のとき、溶液は酸性となり、(1.2.18) 式の右辺第2項 ($=[\text{OH}^-]$) は無視できる。このとき、HA の解離度を α とおくと、 $[\text{A}^-] = \alpha C_A \approx [\text{H}^+]$ と近似できる。これを(1.2.18)式(あるいは(1.2.11)式)に代入すれば、良く知られているオストワルド(Ostwald)の希釈律が得られる。

$$K_a = \frac{C_A \alpha^2}{1 - \alpha} \quad \left(\alpha = \frac{-K_a + \sqrt{K_a^2 + 4C_A K_a}}{2C_A} \right) \quad (1.2.19)$$

このように、弱酸は希釈すれば解離度は1に近づく。ただし、 $C_A \ll K_a$ となるような非常に薄い酸溶液や $K_a C_A \ll 10^{-12} \text{ M}^2$ となるような非常に弱い酸溶液では、水の解離による OH^- を無視できなくなり、(1.2.19)式は適用できない。例えば、 $C_A = 10^{-6} \text{ M}$ の HCN 溶液 ($K_a = 6.0 \times 10^{-10} \text{ M}$) について、(1.2.19)式を用いて $[\text{H}^+]$ を計算すると、 $\text{pH} = 7.6$ となり、酸を加えてアルカリ性になるという矛盾が生ずる(どのような酸も無限希釈すれば、(1.2.18)式の右辺第1項は無視できるので、 pH は7になるはずである)。

強酸と弱塩基 B' からなる酸性塩の溶液は、その酸 $\text{H}^+\text{B}'$ に対して K_a を定義し、弱酸として取り扱えば良い。また、弱塩基 B' の溶液の場合には、その共役酸 $\text{H}^+\text{B}'$ と強塩基 BOH の等濃度溶液、つまり、 $C_A = C_B$ と考えれば良い。

【強酸・強塩基単独溶液と水平化効果 (leveling effect)】

K_a が非常に大きい HA を強酸とよび、この場合は(1.2.18)式の右辺第1項は C_A に近似できる、つまり C_A にかかわらず完全解離する。同様のことは既に(1.2.14)式で強塩基 BOH に対して適用している。濃度 C_A が極端に小さい場合を除いては、(1.2.18)式右辺第2項は無視できるので、 $[\text{H}^+] = C_A$ と得られる(強塩基の場合には $[\text{OH}^-] = C_B$)。どのような強酸あるいは強塩基でもこうした事情は全く同じであり、水の中では、それらはそれぞれ最も強い酸 $\text{H}^+(\text{H}_3\text{O}^+)$ あるいは最も強い塩基 OH^- に変換されてしまい、その強酸・強塩基本来の酸塩基特性は区別できなくなる。このことを水平化効果とよぶ。これは、(1.2.13)式に示す水の自己解離特性(両性特性)に起因する。また、酸性あるいは塩基性とは溶媒の特性に対して定義されるものであり、たとえば HCl は水の中では強酸であるが、酢酸溶媒中では弱酸としてふるまう。

1.2.5.2. 緩衝能

酸とその共役塩基が存在する場合には、必ず緩衝効果が現れる(つまり、ある酸溶液に微量の強塩基 ΔC_B を加えても、 pH の増加量 ΔpH は $-\log(\Delta C_B)$ より小さくなる)。これは弱酸とその共役塩基混合溶液 ($C_A > C_B$) の場合はもとより、強酸単独の場合でも、強酸由来の $\text{H}^+(\text{H}_3\text{O}^+)$ に対して共役塩基 H_2O が存在するので緩衝効果がある。強塩基単独の場合には H_2O と OH^- による緩衝効果が現れる。ただし、弱酸 HA とその共役塩基混合溶液の場合には、HA が最も強い酸としてふるまうので、 $-\Delta[\text{HA}] = \Delta[\text{A}^-] \approx \Delta C_B$ となり、明らかに $-\Delta[\text{H}^+] \ll \Delta C_B$ となる。これに対して、強酸溶液の場合には、 H^+ が最も強い酸なので $-\Delta[\text{H}^+] = \Delta C_B$ となる。一方、強塩基溶液の場合、 H_2O が最も強い酸となるので、 $\Delta[\text{OH}^-] = \Delta C_B$ となる。このような緩衝効果の大きさは緩衝能 β とよばれ、次のように定義される。

$$\beta = \frac{dC_B}{dpH} \left(= \frac{-2.303dC_B}{d \ln[H^+]} = \frac{-2.303dC_B}{d[H^+]} \frac{d[H^+]}{d \ln[H^+]} = -2.303[H^+] \frac{dC_B}{d[H^+]} \right) \quad (1.2.20)$$

(1.2.18) 式を $[H^+]$ で微分し, (1.2.20) 式の最右辺に代入すると,

$$\beta = 2.303 \left\{ \frac{C_A K_a [H^+]}{(K_a + [H^+])^2} + [H^+] + \frac{K_w}{[H^+]} \right\} \quad (1.2.21)$$

が得られる. (1.2.21) 式の $\{ \quad \}$ 内第1項は, 弱酸 HA とその共役塩基 A^- による緩衝能で, $K_a = [H^+]$ のとき最大となり濃度 C_A に比例する. このような緩衝能は強酸性と強アルカリ性条件を除いた領域で観測できる. また, 第2項は強酸性溶液中で観測される $H^+ (H_3O^+)$ と H_2O による緩衝能で, 第3項は強アルカリ性で観測される H_2O と OH^- による緩衝能を表す.

強酸および強アルカリ溶液以外の緩衝液とは, (1.2.21) 式で示したように, 目的とする pH 付近に pK_a を有する弱酸 HA とその共役塩基の混合溶液である. ただし, その緩衝能が観測される pH 領域は (1.2.21) 式からわかるように, $pH \approx pK_a \pm 1$ に限られ, pK_a から 2 以上離れた pH 領域では, ほとんど緩衝能がなくなる.

1.2.5.3. イオン強度効果

活量係数 γ とは, (1.2.10) 式に示したように, 理想状態からのずれの尺度を表すものである. 別の言い方をすれば, 理想系に比べて, その溶質が $-RT \ln \gamma$ だけ溶け易くなることを意味している. 中性物質の場合, 希薄溶液であれば溶質間相互作用は

ほとんどなく, $\gamma = 1$ と近似できる. しかしイオンの場合には, 静電相互作用のため溶解しやすくなり, 希薄溶液でも理想状態からずれてくる ($\gamma < 1$).

あるイオンに対して, 対イオンは平均として球対称に分布していると考えられる. これをイオン雰囲気という. 結果として静電場ができ, 中心イオンは静電的エネルギーにより安定化される. ある場所における対イオンの存在確率とそのエネルギーの関係はボルツマン分布で与えられる. また電荷と電場の関係は, 電磁気学のポアソン式で与えられる. (イオン雰囲気内の誘電率を巨視的なそれと同じと考えて) この関係を解くと, 電位と電荷密度が, 中心イオンからの距離 (r) の関数として得られる (図 1-2-8). この場の中での静電相互作用による安定化エネルギーを求めることにより, イオンの活量係数は次のように与えられる.

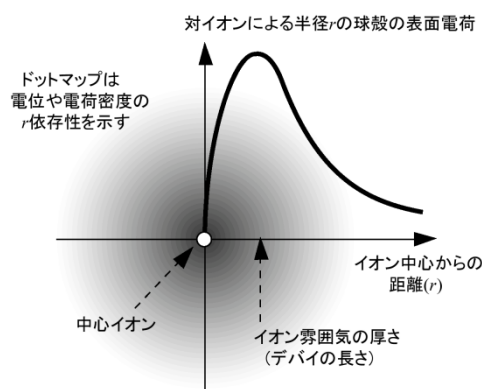


図 1-2-8 イオン雰囲気と表面電荷

$$\log \gamma = -Az^2 \sqrt{I} \quad (1.2.22)$$

これを**デバイ-ヒュッケル(Debye-Hückel)の極限法則**という. ただし, A は温度によって決まる定数 ($0.509 \text{ M}^{-1/2}$ [25°C]) で, z はイオンの電荷である. また I はイオン強度とよばれるもので, 溶液内のイオン i の電荷を z_i , 濃度を C_i とすると, 次のように表される (例: 0.1 M NaCl 溶液の I は 0.1 M , $0.1 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$ 溶液の I は 0.3

M).

$$I = \frac{\sum (z_i^2 C_i)}{2} \quad (1.2.23)$$

イオン強度 I が大きい場合には, 次の拡張デバイ-ヒュッケル式が提唱されている.

$$\log \gamma = -\frac{Az^2\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (1.2.24)$$

ここで B は 25°C の水溶液では $3.291 \times 10^9 \text{ M}^{-1/2} \text{ m}^{-1}$ で, a はイオン半径 (NaCl の場合 $a = 4 \times 10^{-10} \text{ m}$) である. ただし, このような高イオン強度溶液では, 次のデイビエス (Davies) の経験式の方が便利で, 実験値とよく適合する.

$$\log \gamma = -\frac{Az^2\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + 0.1z^2I \quad (1.2.25)$$

このようにイオン強度 I が大きくなると, 活量係数 γ は 1 から次第に小さくなる.

酸とその共役塩基のどちらか, あるいはその双方は必ずイオンであるため, それらの活量はイオン強度に大きく影響され, 結果として, (1.2.11) 式で示した, 見かけの K_a はイオン強度に依存する.

$$\text{p}K_a = \text{p}K_a^\circ + \log\left(\frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}}\right) = \text{p}K_a^\circ + \left(\frac{A\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.1I\right) \left\{ (z_{HA})^2 - (z_{A^-})^2 \right\} \quad (1.2.26)$$

リン酸のように, $|z_{HA}| < |z_{A^-}|$ の場合には, イオン強度 I の増加とともに, 見かけの $\text{p}K_a$ は減少する. 逆にアミン類は, その共役酸の見かけの $\text{p}K_a$ は I の増加とともに増加する. どちらの場合も, イオン強度を増加させると, 酸塩基平衡は, 電荷が増加するほうに傾く.

1.2.5.4. 緩衝液の調製

緩衝液を調製するには, 基本的には, 次の4通りの方法がある. (巻末参照)

- ① 共役酸 HA の溶液 ($C_{HA} [\text{M}]$, $V_{HA} [\text{mL}]$) とその塩 A^- の溶液 ($C_A [\text{M}]$, $V_A [\text{mL}]$) を混合する (例: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$). pH 3~11 くらいの緩衝液では, 水の解離の影響を無視できるので, 加えた共役酸と共役塩基の量比は, 緩衝液中でのそれらの濃度比とほぼ等しい. したがって, このときの pH は次のように与えられる.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \approx \text{p}K_a + \log \left(\frac{C_A V_A}{C_{HA} V_{HA}} \right) \quad (1.2.27)$$

これをヘンダーソン-ハッセルバルク (Henderson-Hasselbalch) の式とよぶ. しかし, 必ずしもこの式で計算しなくても, pH メータで溶液の pH を測定しながら, 体積の多い方の溶液に体積の少ない方の溶液を少しずつ加え, 所定の pH にすることが多い.

- ② 塩基性塩あるいは弱塩基 B の溶液 ($C_B [\text{M}]$, $V_B [\text{mL}]$) に, 強酸 HA の溶液 ($C_{HA} [\text{M}]$, $V_{HA} [\text{mL}]$) を加え

る(例:Na₂HPO₄ + HCl , CH₃COONa + HCl, Tris + HCl [Tris とはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン H₂NC(CH₂OH)₃ の略称のこと]). 塩基性塩の塩基成分(通常アニオン)あるいは弱塩基の共役酸 B⁺H の解離定数を K_aとすると, (極端な酸性あるいはアルカリ側を除いて)この pH は次のようになる(ただし, C_B V_B > C_{HA} V_{HA}).

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[B^+H]} \cong pK_a + \log \left(\frac{C_B V_B - C_{HA} V_{HA}}{C_{HA} V_{HA}} \right) \tag{1.2.28}$$

この場合も, pHメータで溶液の pHを測定しながら, 塩基性溶液に強酸の希釈液を少しずつ加え, 所定の pH にすることが多い.

- ③ 酸性塩あるいは弱酸 HA の溶液(C_{HA}[M], V_{HA}[mL])に, 強塩基 BOH の溶液(C_B [M], V_B[mL])を加える(例:NaH₂PO₄ + NaOH , クエン酸一カリウム塩 + NaOH, NH₄Cl + NaOH, H₃BO₃ + NaOH). 酸性塩の酸成分(通常カチオン)あるいは弱塩基の共役酸 AH の解離定数を K_aとすると, (極端な酸性あるいはアルカリ側を除いて)この pH は次のようになる(ただし, C_{HA} V_{HA} > C_B V_B).

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \cong pK_a + \log \left(\frac{C_B V_B}{C_{HA} V_{HA} - C_B V_B} \right) \tag{1.2.29}$$

簡便には, pHメータで溶液の pHを測定しながら, 酸性溶液に強塩基の希釈液を少しずつ加え, 所定の pH にする.

- ④ 非共役の弱酸と弱塩基の溶液を混合する(例:クエン酸 + Na₂HPO₄ [これはマッキルベイン (MacIlvaine) 緩衝液とよばれることもある]). これは弱酸とその共役塩基による緩衝能, および弱塩基とその共役酸による緩衝能を合わせ持つものと考えればよい. このように, 2種以上の共役酸・塩基対から成る緩衝液は緩衝能を示す pH 領域が広がるので, 一般に, 広域緩衝液とよばれる.

【対イオン・緩衝液の選択】

強塩基由来のカチオンである Na⁺や K⁺等は, 水の中では極端に弱い酸であるのでお互いに区別できず(水平化効果), どちらを選択しても酸塩基特性としては同じである. 逆にCl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻ は水の中では極端に弱い塩基としてふるまい, お互いに酸塩基特性は区別できない. しかし, こうしたイオンの生物学的活性が現れる実験系もあるので, 緩衝液の作成の際には, このような対イオンの選択にも注意をはらう必要がある. 同様の意味で, 特定の共役酸あるいは塩基が生物学的活性や特定のイオンと錯形成する場合には, pK_a が同程度の別の酸とその共役酸からなる緩衝液を選択する必要がある(表 1-2-3). [例:Ca²⁺や Fe^{2+/3+}はクエン酸やリン酸と錯形成するので, これらのイオンに関する実験を行う場合, クエン酸やリン酸緩衝液を使用することはできない.]

表 1-2-3 生命科学実験で汎用される緩衝液とその共役酸および pK_a°

pK _a °	名称	共役酸の化学式
2.15	リン酸	H ₃ PO ₄
2.35	グリシン(第1)	HOOCCH ₂ NH ₃ ⁺
3.13	クエン酸(第1)	HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂
4.76	クエン酸(第2)	HOC(COOH)(CH ₂ COOH)CH ₂ COO ⁻
4.76	酢酸	24CH ₃ COOH
6.15	MES	O  N ⁺ HCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
6.40	クエン酸(第3)	HOC(COOH)(CH ₂ COO ⁻) ₂

【強酸・強アルカリ緩衝液】

強い酸性側あるいはアルカリ性側の緩衝液の場合には、水の解離の影響を考えた、(1.2.18)式を用いて計算しなければならない。ただし、この場合もpHメータで測定しながら混合すれば、容易にこのような緩衝液を調製できる。

【濃度の正確さ】

通常は、緩衝液試薬の秤量を精密に行う必要はなく、また正確に希釈する必要もない(1.2.1.5.節, 1.2.2.3.節参照)。ただしその濃度の正確さは目的に応じて決める必要がある。

【イオン強度一定の緩衝液】

ある緩衝液でその成分の全濃度 C_A が一定の場合でも、pH が変化するとイオン強度も変化する。特に実験対象物質がイオン性の場合には、その活量はイオン強度に大きく左右されるので、平衡定数や反応速度定数の pH 依存性を調べる場合には、緩衝液のイオン強度を一定に保つ必要がある。この場合には、設定したイオン強度 I の条件下での見かけの pK_a を(1.2.26)式で計算し、設定する緩衝液の pH 値における[HA]および[A⁻]を(1.2.12)式と(1.2.15)式から計算する(ただし、酸性側、あるいはアルカリ性側では、水の解離を考慮した(1.2.18)式を用いる)。この時点での緩衝液の溶液組成から、そのイオン強度を(1.2.23)式で計算し、設定値に対する不足分を中性塩(例:NaCl)で補足すれば、イオン強度一定の異なる pH の緩衝液を調製できる。

1.2.5.5. 滴定曲線

酸塩基滴定で、溶液の pH と加えた標準液の量の関係を描いた曲線を滴定曲線という。この理論曲線は(1.2.18)式から求められる(適当な[H⁺]を代入してそのときの C_B を求めればよい)。図 1-2-9 は異なる pK_a を有する種々の一塩基酸($C_A = 0.1 \text{ M}$)を強塩基で滴定した場合の、滴定曲線である(ただし滴定に伴う体積変化は無視した)。(1.2.20)式の定義からわかるように、滴定曲線の平坦部が緩衝能のある領域である。

【半当量点の pH】

滴定前の液性が酸性であれば、その pH 値は(1.2.19)式から得られる $-\log(\alpha C_A)$ に等しい。半当量点($C_B = C_A/2$)における pH($pH_{eq/2}$)が 3 から 11 の範囲であれば、溶液中の H⁺と OH⁻ の濃度は無視できるほど小さいので、(1.2.18)式の左辺、右辺の第2項は無視でき、

$$pH_{eq/2} = pK_a \quad (1.2.30)$$

という関係が得られる。つまり酸の強さが弱まる(pK_a が増加する)につれ、平坦部は高 pH 側にシフトする。酸性度が強まり、 $pH_{eq/2}$ が 3 以下となると、(1.2.18)式の左辺第2項は無視できなくなり、

$$\frac{C_A}{2} + [H^+]_{eq/2} = \frac{C_A K_a}{K_a + [H^+]_{eq/2}} \quad (1.2.31)$$

となる。強酸(K_a が非常に大きい酸($pK_a < 0$))では、(1.2.31)式の右辺は C_A に近似され、強酸の K_a には依存し

なくなり, 単純に $\text{pH}_{\text{eq}/2} = C_A/2$ と表される. これは水の水平化効果によるものである. 逆に, pK_a が大きくなり (弱酸の酸性度が非常に弱まり), $\text{pH}_{\text{eq}/2}$ が 11 以上になると, (1.2.18) 式の右辺第2項 ($= [\text{OH}^-]$) が無視できなくなり,

$$\frac{C_A}{2} = \frac{C_A K_a}{K_a + [\text{H}^+]_{\text{eq}/2}} + \frac{K_W}{[\text{H}^+]_{\text{eq}/2}} \quad (1.2.32)$$

となる.

【当量点の pH】

次に当量点 ($C_B = C_A$) での pH (pH_{eq}) について考える. 強酸の場合には (1.2.18) 式の右辺第1項は C_A となるので, $\text{pH}_{\text{eq}} = \text{pK}_W/2 = 7$ である. 弱酸の場合, 図 1-2-9 からわかるように, $\text{pH}_{\text{eq}} > 7$ となる. したがって, (1.2.18)

式の左辺第2項は無視でき, $\frac{C_A [\text{H}^+]_{\text{eq}}}{K_a + [\text{H}^+]_{\text{eq}}} = \frac{K_W}{[\text{H}^+]_{\text{eq}}}$ となる. 滴定曲線からわかるように $K_a \gg [\text{H}^+]_{\text{eq}}$ と近似でき

るので,

$$[\text{H}^+]_{\text{eq}} = \sqrt{\frac{K_a K_W}{C_A}} \quad (1.2.33)$$

と得られる. これは弱酸と強塩基からなる塩基性塩の加水分解を定量的に表した式にほかならない.

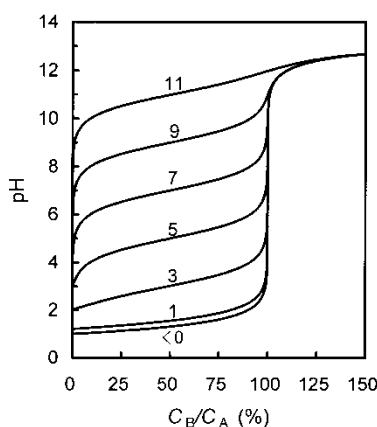


図 1-2-9 一酸塩基の滴定曲線
(数字は pK_a)

【酸混合物の滴定曲線】

2種の一塩基酸 HA_1 (濃度 $C_{A,1}$, 酸解離定数 $K_{a,1}$) と HA_2 (濃度 $C_{A,2}$, 酸解離定数 $K_{a,2}$) の混合物と強塩基の酸塩基反応の場合, (1.2.18) 式は以下のように書き換えられる.

$$C_B + [\text{H}^+] = \frac{C_{A,1} K_{a,1}}{K_{a,1} + [\text{H}^+]} + \frac{C_{A,2} K_{a,2}}{K_{a,2} + [\text{H}^+]} + \frac{K_W}{[\text{H}^+]} \quad (1.2.34)$$

$\text{pK}_{a,1} \ll \text{pK}_{a,2}$ の場合, 滴定の前半では, HA_1 だけが中和され, (1.2.34) 式の右辺第2, 3項は無視できる. HA_1

の中和が完了すると、右辺第1項は $C_{A,1}$ に近似され、続いて HA_2 の中和が始まる。結果として、滴定曲線はそれぞれの酸の強さと量に対応した階段状の形になる。2つの $pK_{a,1}$ と $pK_{a,2}$ が近接した場合には、滴定曲線の階段状の折れ曲がり不明確になる。これは広域緩衝液の特性である。この場合でも(1.2.34)式で表現できることにはかわりはない。3種以上の酸混合物も同様に考えられる。

【二塩基酸の滴定曲線】

二塩基酸 H_2A の場合は、 $2HA^- \rightleftharpoons H_2A + A^{2-}$ という不均化反応の影響が現れるため、状況は多少複雑になる。 H_2A の第1, 第2解離定数をそれぞれ次のようにおく。

$$K_{a,1} (= \frac{[HA^-][H^+]}{[H_2A]}) \quad (1.2.35a)$$

$$K_{a,2} (= \frac{[A^{2-}][H^+]}{[HA^-]}) \quad (1.2.35b)$$

このとき C_A は次のように与えられる。

$$C_A = [H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}] \quad (1.2.36)$$

H_2A 溶液に一酸強塩基 BOH (濃度 C_B)が含まれる系の電気的中性則は次式で与えられる。

$$C_B + [H^+] = [HA^-] + 2[A^{2-}] + [OH^-] \quad (1.2.37)$$

(1.2.35a,b)式と(1.2.36)式から $[H_2A]$ を消去し、 $[HA^-]$ と $[A^{2-}]$ を C_A , $K_{a,1}$ および $K_{a,2}$ で表し、(1.2.37)式に代入すると、次の H_2A と BOH の混合物の一般式が得られる。

$$C_B + [H^+] = \frac{C_A (K_{a,1}[H^+] + 2K_{a,1}K_{a,2})}{[H^+]^2 + K_{a,1}[H^+] + K_{a,1}K_{a,2}} + \frac{K_W}{[H^+]} \quad (1.2.38)$$

$pK_{a,1} \gg pK_{a,2}$ の場合には、 $K_{a,1}[H^+] \gg K_{a,2}[H^+]$ であるので、(1.2.38)式の右辺第1項の分母と分子の()内に、 $K_{a,2}[H^+]$ を加えると、(1.2.34)式の右辺第1, 第2項で、 $C_{A,1} = C_{A,2}$ としたものと同一になる。すなわち、 $pK_{a,1} \gg pK_{a,2}$ の場合には、 $2HA^- \rightleftharpoons H_2A + A^{2-}$ という不均化反応の影響はきわめて小さくなり、2種の同濃度 C_A の一塩基酸 H_2A と HA^- の混合物として考えることができる。

【指示薬】

酸塩基滴定ではしばしば指示薬を用いて目視で当量点を判定する。極端に弱い酸(塩基)でないかぎり、当量点付近では pH ジャンプが見られる。適切な指示薬を用いると、その pH ジャンプに伴い変色する。このような指示薬(In)はすべて弱酸 InH あるいはその共役塩基 In^- であり、それらの濃度比は、溶液の pH で決定される。

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[In^-]}{[InH]} \right) \quad (1.2.39)$$

したがって、適切な指示薬とは、 InH の $\text{p}K_{\text{a}}$ が当量点の pH 値に近いものである。しかし、たとえこの考え方で指示薬を選択したとしても、 pH ジャンプが小さければ、変色域が広がり、目視滴定では誤差を生ずる。 pH メータを用いて滴定曲線を測定すればこのような誤差はかなり回避できる。また、滴定曲線の測定により、単に当量点に代表される定量分析的情報のみならず、滴定する物質の酸塩基特性 ($\text{p}K_{\text{a}}$) や他の物質との相互作用も定量的に評価することができる。

1.2.5.6. 滴定曲線測定

pH メータを用いた滴定曲線の一般的測定法は以下のとおりである。

- ① pH 7 と pH 4 の標準液を用いて pH メータを2点校正する(1.2.4.2.節参照)。
- ② ビュレットの水漏れがないことを確認し、滴定標準液を、ビュレットに入れる(1.2.1.3.節参照)。このとき、とも洗いをを行い、濃度が変化しないように注意する。ビュレットの先端部分などに気泡がないことを確認しておく。また、ビュレットにロートを差し込んだまま操作しないように気をつけること。
- ③ 試料溶液の入ったビーカーをスターラ上に置き、洗浄したスターラ・バーを入れ、緩やかに攪拌を開始する。
- ④ pH メータのガラス電極を試料溶液に浸す。このとき、ガラス電極先端が回転子と接触しないように配置すること。
- ⑤ 図 1-2-10 のようにビュレットを配置し、滴定開始前の pH を記録する。標準液を少量ずつ滴下するとき、 pH がある程度 (0.1~0.3) 変化したら、その時点での滴加量と pH を記録する。特に緩衝能がほとんどなくなる当量点付近では、1回の滴下量をごく微量にする。滴定は、液が十分アルカリ側(または酸側)になるまで続ける。
- ⑥ 標準溶液の添下量 (V) を横軸に、溶液の pH を縦軸にプロットして滴定曲線を描く。

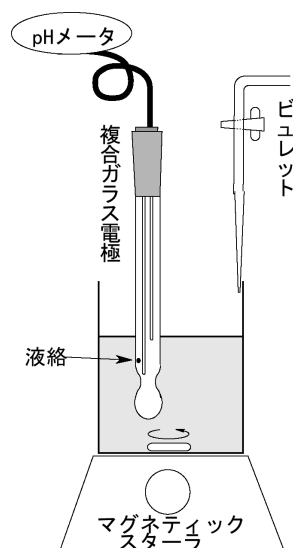


図 1-2-10 滴定装置の概略図

1.2.6. 紫外－可視吸収スペクトル・吸光光度法

1.2.6.1. 原理と特徴

物質に近紫外線(波長 $\lambda = 200 \sim 400 \text{ nm}$)や可視光線($\lambda = 400 \sim 800 \text{ nm}$)を照射すると、その物質の基底状態の分子軌道電子(π, n, d 電子)は光エネルギーを吸収して励起状態に遷移する。光の吸収には、光子と物質の衝突が必要であり、その回数は光強度(光子の数) I と濃度(化学種の数) C [M]に比例する。この比例定数(遷移確率)を k_λ とすると、図 1-2-11 のようにある波長 λ の光を物質層に入射した場合、 $d\ell$ なる薄層部分での光強度の減少($-dI_\lambda$)は次式で与えられる。

$$-\frac{dI_\lambda}{d\ell} = k_\lambda C I_\lambda \quad (1.2.40)$$

物質層の長さ(光路長) ℓ 全体について考えると、入射光の強さ $I_{0,\lambda}$ と透過光の強さ $I_{t,\lambda}$ の比は次のようになる。

$$-\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI_\lambda}{I_\lambda} = k_\lambda C \int_0^\ell d\ell$$

$$\log \frac{I_{0,\lambda}}{I_{t,\lambda}} = \frac{k_\lambda}{2.303} C \ell = \epsilon_\lambda C \ell \quad (1.2.41)$$

ここで ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]を波長 λ におけるモル吸光係数といい、物質固有の値となる。吸光度(A_λ)、透過度(t_λ)並びに透過率(T_λ)を次のように定義する。

$$A_\lambda \equiv \log \frac{I_{0,\lambda}}{I_{t,\lambda}} \equiv -\log t_\lambda \equiv -\log \frac{T_\lambda}{100} \quad (1.2.42)$$

(1.2.41)式と(1.2.42)式より、

$$A_\lambda = \epsilon C \ell \quad (1.2.43)$$

が得られる。この関係はランベルト-ベール(Lambert-Beer)の法則とよばれる。この関係を基に A_λ から濃度 C を求める分析法を吸光光度法とよぶ。また、 A_λ と λ の関係は、物質の分子構造を反映した特有の形を与え(図 1-2-12)、これを紫外-可視吸収スペクトル(あるいは電子スペクトル)とよぶ。吸収スペクトルでピークとなる波長を最大吸収波長(λ_{max})とよび、その ϵ を最大モル吸光係数(ϵ_{max})とよぶ。通常、吸光光度法では、 ϵ_{max} が大きい長波長側の λ_{max} に測定波長を設定して定量分析する。有機化合物の紫外-可視部吸収では、主に $\pi-\pi^*$ 遷移(短波長側から; 芳香環のエチレン性吸収帯: $\epsilon_{\text{max}} > 2000$, ポリエン, エノン[-C=C-CO-]などの共役性吸収帯: $\epsilon_{\text{max}} > 10000$, 芳香族, ヘテロ芳香族のベンゼノイド吸収帯: $\epsilon_{\text{max}} > 100$)と、 $n-\pi^*$ 遷移(-CO, -NO₂など n 電子をもつ発色基に起因するラジカル性吸収帯: $\epsilon_{\text{max}} < 100$)が観測される。また吸収と化学構造との主な関係は次のようにまとめられる。

- ① 共役系が増加すると λ_{max} が長波長側に移動(深色移動)し、 ϵ_{max} が増大する(濃色効果)。[注: 深色移動とは遷移する分子軌道間のエネルギー差 $\Delta E = hc/\lambda$ (ボーア(Bohr)の法則)が減少することであり、濃色効果とは軌道間の電子遷移確率が増加することである。]

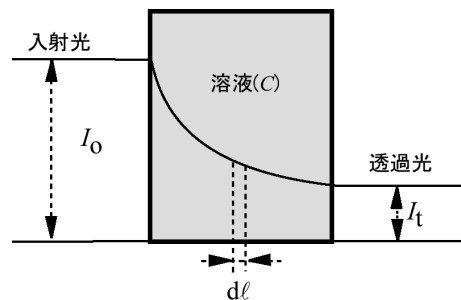


図 1-2-11 光の吸収と透過

- ② ベンゼン環の置換基に π または n 電子があると、深色移動し濃色効果が見られる。また、電子供与基と吸引基の二置換体(特に p 置換体)は、電子遷移に対する相乗効果を及ぼし、深色移動が大きくなる。
- ③ 立体障害があると著しい淡色効果($\epsilon_{\max}$ の減少)が現れる(例:図 1-2-12)。
- ④ 溶媒の極性が高くなると、 $\pi-\pi^*$ 遷移は深色移動し、 $n-\pi^*$ 遷移は浅色移動($\lambda_{\max}$ が短波長側に移動)する。キレーション効果(分子内水素結合等)があると深色移動する。
- ⑤ 金属錯体の電子遷移は、電荷移動吸収帯(配位子の σ , π 電子の金属イオンの d^* 軌道への遷移,あるいは逆に金属イオンの d 電子が配位子の σ^* , π^* 軌道への遷移), 配位子吸収帯(有機配位子自体の遷移), および $d-d$ 遷移吸収帯(金属の d 軌道の準位間での電子遷移:
 $\epsilon_{\max} = 0.1 \sim \text{数百}$)である。金属錯体に特有な可視部に強い吸収($\epsilon_{\max} > \text{数万}$)が現れる場合は、ほとんど電荷移動吸収帯によるものであり、定量分析に多く用いられる。白色光線が可視光線を吸収する物質を透過したとき、吸収された光と溶液の色は、表 1-2-4 に示したような色と余色(補色)の関係で示される。

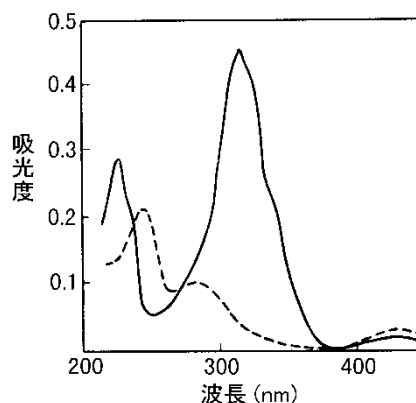


図 1-2-12 トランス(実線)およびシス(波線)アゾベンゼン(0.02mM)の吸収スペクトル, ($\ell = 1 \text{ cm}$)

表 1-2-4 波長と色および余色の関係

$\lambda(\text{nm})$	400– 430	430– 480	480– 490	490– 500	500– 560	560– 580	580– 595	595– 610	610– 750	750– 800
色	紫	青	緑青	青緑	緑	黄緑	黄	橙	赤	赤紫
余色	黄緑	黄	橙	赤	赤紫	紫	青	緑青	青緑	緑

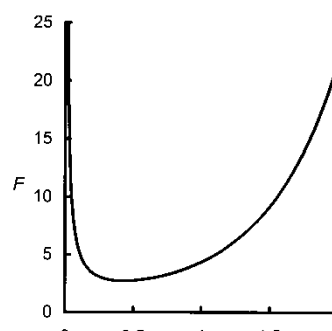
1.2.6.2. 吸光光度法の誤差

吸光光度法では、 $-\log t$ が濃度 C に比例するので、定量誤差は透過度 t に依存して変化する。吸光光度法の相対定量誤差 F は、次式で定義される。

$$F \equiv -\frac{dC/C}{dt} \quad (1.2.44)$$

(1.2.42) (1.2.43) 式より、 dC/C は次のように変形できる。

$$\frac{dC}{C} = \frac{dA}{A} = \frac{d(-\log t)}{-\log t} = \frac{d(\ln t)}{\ln t} = \frac{d(\ln t)}{dt} \frac{dt}{\ln t} = \frac{dt}{t \ln t} \quad (1.2.45)$$



したがって、相対定量誤差 F は次式のように表される。

$$F = \frac{-1}{t \ln t} = \frac{1}{2.303A \exp(-2.303A)} \quad (1.2.46)$$

F 値と吸光度 A との関係は、図 1-2-13 のようになる。相対定量誤差 F が最小となるのは、 $d(t \ln t) / dt = \ln t + 1 = 0$ を満足するとき、すなわち、 $A = 0.434$ のときである。一般的には $A = 0.2 \sim 0.8$ の範囲内に試料濃度を調製する。特に、吸光度 A がこれを上回るときには試料を適当に希釈することが好ましい。

1.2.6.3. 使用方法

【装置】

分光光度計には多種類のものが市販されている。一例として、図 1-2-14 にダブルビーム自記分光光度計の装置構成図を示した。光源から出た光は回折格子(または石英プリズム)で分光され、セル内に導入される。セルを透過した光は光電子増倍管で電圧に変換される。自記分光光度計の場合には、透過度 t は対照セルの透過光の強さに対する試料セルの透過光の強さの比となる。使用法は機種ごとに異なるが、基本的には、ある一定波長のもとで、光を完全に遮った状態で $t = 0$ となるように設定し、つぎにセルホルダーに何も入れない状態で $t = 1$ の目盛りを指すように設定する。これは波長を変えるたびに設定する必要がある。自記分光光度計では、これらの操作を自動的に行うよう設計してある。

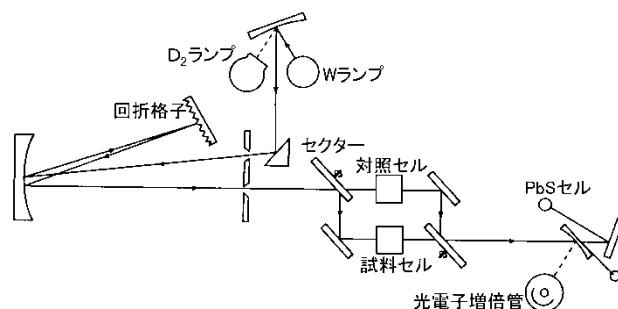


図 1-2-14 分光光度計装置概略図

【光源】

通常の分光光度計は光源としてタングステン(W)ランプ(あるいはハロゲンタングステンランプ)と重水素ランプ(D₂)が備えられている。前者は、 $\lambda > 350 \text{ nm}$ の可視部測定に、後者は $\lambda < 360 \text{ nm}$ の紫外部測定に用いる。このように光源を波長によって選択しなければならないのは、ランプの波長出力特性が異なるためである。自記分光光度計では、光源切り替えは自動に行われる。

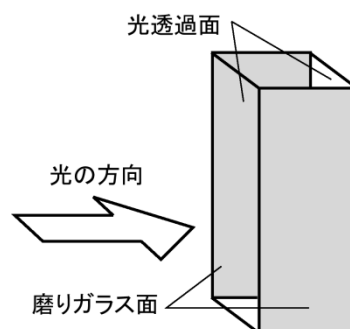


図 1-2-15 角形分光セル

【セル】

セルにもいろいろな形状のものがあるが、最も一般的に用いられているものは、図 1-2-15 に示したような角形セルである。角形セルには、石英、ガラス、プラスチック製がある(ただしプラスチック製セルの光路長の精度は他の2種のものに比べ劣る)。可視部測定はどれも使用できるが、紫外部測定を行う場合には石英セルを用いなければならない(他の材質は紫外線を吸収する)。角形セルを取り扱う際は、必ず磨りガラス面を持ち、透明な光透過面にはふれないようにする。セルを洗浄・乾燥する際も、絶対に光透過面を傷つけないよう留意しなければならない(光透過面を下に向けて置くことは絶対さけること)。

セルは、試料溶液で3回ほど共洗いしてから使用する。試料が微量の場合には、セルを乾燥させてから使用する。また検量線を作成する場合のように、異なる試料濃度が順に並んでいる場合には、低濃度の試料から測定する。このほか、試験管型セルを用いるものもある。この場合、セルの標線とセルホルダーの印が合うように、セルをセルホルダーに挿入する。

ダブルビーム分光光度計の場合には、試料セルと対照セルの2つを用いるが、対照セルには、通常、水(溶媒)(あるいは緩衝液)を入れる。高精度測定では対照セル、試料セルともに溶媒をいれて、吸光度の(自動)補正を行い、セルの挿入方向も一致させて測定することが好ましい。発色反応を利用する吸光光度法においては、測定物質だけが含まれていない溶液をブランクとして対照セルに入れることもあるが、その測定法の検出限界を知るうえでも、また発色試薬の劣化等を調べるうえでも、対照液は水(あるいは緩衝液だけ)を用いることが好ましい。また、短波長側での測定においては、 NO_3^- イオン等や溶媒自体あるいは酸素も光吸収するので、スペクトル解釈には十分注意をはらう必要がある。たとえば 200 nm 付近では、水の光吸収が無視できなくなり、溶質由来の本来の吸収ではないピーク(ゴーストピーク)が現れる。

1.3. 分析化学実験

1.3.1. 化学体積計の補正 (2 人 1 組)

【目的】

ホールピペットおよびマイクロピペット(ピペットマンなど)の体積補正実験を通して、液体試料の計量法および精密天秤の使い方に習熟するとともに、その測定値の検定法について学ぶ。

注：統計処理には Excel を使ってみてください(p.45 参照)。

1.3.1.1. ホールピペットの体積補正

【実験方法】

(各自行うこと)

- ① 秤量瓶を精密電子天秤の上皿にのせ、キャンセル機能を用いて(TARE ボタンを押して)、風袋消去をする(重量を見かけ上 0.0000 g にする)。
- ② 秤量瓶に蒸留水を正確に 10 mL はかりとる(安全ピペットは使わない)。このとき、精密電子天秤(の上皿)には絶対に水をこぼさないよう注意すること。 水の蒸発による減量に注意

- ③ はかりとった水の重量(W_1) [g]を精密に読みとる.
 - ④ 秤量瓶の水を捨て, 再度風袋消去し, ②③の操作を9回繰り返し(計10回), 水の重量($W_2 \sim W_{10}$)を記録する.
 - ⑤ 水温を測定する.
- 注: 以上の操作は, 同じピペットを用いて各自が行う.

【データ処理】

- ① $W_1 \sim W_{10}$ に対して, 異常値と思われるものがあれば 90%信頼度($P = 0.10$)で棄却検定せよ(Dixon 法).
(注: Dixon 法は, 最大値あるいは最小値についてだけ検定するものであり, それ以外のものには適用しない.)
- ② $W_1 \sim W_{10}$ のうち異常値を除いた実験値(データ数 $n \leq 10$)を用いて, 平均値($\bar{W}$)と標準偏差(s)を求めよ.
- ③ 実験時の水温におけるガラス体積計の換算補正值 c (1.2.2.4 節参照)を用い, 10 mL 容ホールピペットの体積 V [mL]を計算せよ.
- ④ 2人の測定値の精密さに有意の差がないか, 95%の信頼度で検定せよ(F 検定). 精密さに有意の差がない場合には, さらに正確さに有意の差がないか, 95%の信頼度で検定しなさい.

[注: ③で評価した V が 10.0 mL から大きくずれている場合や, ④で2人の正確さに有意の差がある場合には担当教官に連絡すること.]

1.3.1.2. マイクロピペットの体積補正

【実験方法】

[注: 1000 μ L 容, 200 μ L 容, 20 μ L 容マイクロピペット(ピペットマン・P-1000, P-200, P-20)について体積補正する. 以下では 1000 μ L 容マイクロピペットを想定して記述する.]

- ① 秤量瓶を精密電子天秤の上皿にのせ, 風袋消去をする.
- ② マイクロピペットで, その最大容量(1000 μ L 容の場合 1000 μ L)の蒸留水を秤量瓶にはかりとる. このとき, 精密電子天秤(の上皿)には絶対に水をこぼさないよう注意すること.
- ③ はかりとった水の重量(W_1) [g]を精密に読みとる.
- ④ 引き続き, 風袋消去し, ②③の操作を9回繰り返し, 水の重量($W_2 \sim W_{10}$)を記録する.
- ⑤ 水温を測定する.

【データ処理】

3種のマイクロピペットについて得られた $W_1 \sim W_{10}$ に対して以下のデータ処理を行う.

- ① $W_1 \sim W_{10}$ に対して異常値と思われるものがあれば 90%信頼度($P = 0.10$)で棄却検定せよ.
- ② $W_1 \sim W_{10}$ のうち異常値を除いた実験値(データ数 $n \leq 10$)を用いて, 平均値($\bar{W}$), 標準偏差(s), および相対標準偏差(coefficient of variation; $CV = s / \bar{W}$; 変動係数ともいう)を求めよ.

CV値を表 1-3-1 の各モデルの再現性の最大許容値と比較し、再現性許容範囲内であるか確認しなさい。
もし、範囲内でなければ測定をやり直す。

- ③ 実験時の水の密度(1.2.2.4.節参照)を用いて、 $\bar{V}$ からマイクロピペットの V [mL]を評価し、相対誤差%
($= 100(V - V_0)/V_0$; V_0 はマイクロピペットの表示値)を求め、その正確さが表 1-3-1 の規格限度内におさまっているか確かめる。正確さが著しく低いものや、CV 値が著しく大きいものは、部品(O-リング)の交換を行い再度検定する。

表 1-3-1 ピペットマン®の性能規格表

モデル	最大容量 (μL)	正確さ (相対誤差%)	精度 (CV)
P-20	20	± 1.0	≤ 0.30
P-200	200	± 0.8	≤ 0.15
P-1000	1000	± 0.8	≤ 0.15

- ④ 化学実験を行う場合、ピペットとマイクロピペットの精度、容量、利便性等の視点から、どのように使い分けたいか考察せよ。また、メスピペットとホールピペットの使い分けについて述べよ。
- ⑤ 出用体積計と受用体積計の使い分けについて例を挙げて述べよ。

1.3.2. リン酸の電位差滴定（2人1組）

【目的】

リン酸の滴定曲線を測定し、リン酸の定量と酸塩基特性の評価を行う。またこの過程で pH メータの使用法を習熟する。

注:pH メータのメモリー消去法:

茶色の pH メータ: CLR + CAL ボタンを同時に押す。

白色の pH メータ: F + CAL ボタンを同時に押す。

【試薬】

リン酸 (H_3PO_4 ; M_w 98.00) (市販品)・・・液体！

0.1 M 水酸化ナトリウム標準溶液 (ファクター f_B 既知) (市販品)・・・3L 程度

注:用いた標準液のファクターは必ず書き留めること (以下同様)。

pH 標準液 (pH 7及び4) (市販品; 分注済)

メチルレッド試液 (MR 0.1 g + エタノール 45 mL + 水 $\rightarrow$ 50 mL; 25 組分, 調整済)

フェノールフタレイン試液 (PP 0.5 g + エタノール 45 mL + 水 $\rightarrow$ 50 mL; 25 組分, 調整済)

注:調整済みの試液は、特に断らない限り、共通実験台(黒板の前)に準備する(以下同様).

強酸、強塩基を扱う際には安全ピペッターを使用すること !!

【実験方法】

- ① リン酸約 1.2 g を精密にはかりとり、水で正確に 100 mL とし、これをリン酸試料溶液とする(2組分).

注:Fill-up するときは、駒込ピペットを使うこと(P.10 参照).

- ② 100 mL 容ビーカーにリン酸試料溶液 10 mL を正確にはかり、水 40 mL を加える. この液を被検液として、メチルレッド試液 1 滴およびフェノールフタレイン試液を 2 滴加え、0.1 M NaOH 標準溶液で滴定し、滴定曲線を作成する.

注:滴定を開始する前に、ビュレットからロートをはずすこと. 付け忘れは誤差の原因! コックやビュレット先端に気泡が残っていないことを確認すること! 共洗いは少量の標準溶液(1/10~1/5)で行い、洗浄液は廃液とする. 但し、気泡を抜くために流した標準溶液はきれいなビーカーに入れておき、再利用すること! 実験終了後、スターラーバーを流さないように注意(スターラーバーは、柄付き磁石で). プロットしながら測定すること!

【データ処理】

- ① 実験②で得られた滴定曲線で、0.1 M NaOH 標準液の滴定開始から第1当量点までの体積と第1当量点から第2当量点までの体積を求め、その平均値 $\bar{V}_B$ [mL] から、被検液中のリン酸の重量 W [mg] を求めよ. ただし、0.1 M NaOH 標準液表記のファクター f_B を用いること.



$$W = f_B C_B \bar{V}_B M_w = 9.800 f_B \bar{V}_B \quad (1.3.7)$$

さらに、得られた W とリン酸の秤量値 w [mg] から、リン酸の含量 P [w/w%] を求め、1.2.3.3.節の表 1-2-2 の値と比較せよ.

- ② 実験②の第1当量点と第2当量点の midpoint (半当量点) における pH 値から (1.2.30) 式をもとに $\text{p}K_{a,2}$ (H_2PO_4^- の $\text{p}K_a$) を求めよ.
- ③ 実験②の滴定開始から第1当量点まで midpoint (半当量点) における pH 値から、(1.2.31) 式をもとに $\text{p}K_{a,1}$ (H_3PO_4 の $\text{p}K_a$) を求めよ. ただし、(1.2.31) 式の C_A は、①で求めた W とリン酸の分子量、および半当量点での溶液体積から計算すること. ただし実験②で加えた水の体積(40 mL)は正確であったと仮定する.
- ④ 実験②で得られた滴定曲線で、第3当量点となるべき仮想的な位置を求め、第2当量点と仮想的第3当量点までの midpoint (半当量点) における pH 値から (1.2.32) 式をもとに $\text{p}K_{a,3}$ (HPO_4^{2-} の $\text{p}K_a$) を求めよ. ただし、(1.2.32) 式の C_A は③の場合と同様に計算すること.
- ⑤ 滴定の連続する各データ間の ΔpH と ΔV_B を求め、 $\Delta V_B / \Delta\text{pH}$ を pH に対してプロットしなさい.

$$(1.2.20) \text{ 式より, } \beta \equiv \Delta C_B / \Delta\text{pH} \quad (\beta \text{ は緩衝能})$$

$$\Delta C_B = C_B f_B \Delta V_B / V_t \quad (V_t \text{ は被滴定液の全容量 [mL]})$$

従って、 $\beta \cong C_B f_B \Delta V_B / \Delta p H V_t$

となることを理解し、緩衝能－pH 曲線について考察せよ。例えば、緩衝能の大きな pH 領域において緩衝作用を示す酸塩基対、最大緩衝能の理論値と実験値の比較、緩衝作用を示す pH 領域と pK_a の関係等々。

注：滴定曲線やその数値微分曲線は、Excel を使うと容易に作成できます。

⑥ 指示薬の変色域と pH 飛躍の関係について考察し、適切な指示薬の選択について述べよ。

1.3.3. 飲料水硬度測定（2 人 1 組）

【原理・目的】

金属イオンと錯化剤による錯生成反応に基づく滴定を錯滴定とい
い、特に水溶性の多座配位子のエチレンジアミン四酢酸
(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)などを滴定試薬として用いる
錯滴定をキレート滴定 (chelatology) という。

EDTA (H_4Y と表す) は水溶液中ではそのカルボキシル基が4段階に解離 ($H_4Y \rightleftharpoons H_3Y^- \rightleftharpoons H_2Y^{2-} \rightleftharpoons HY^{3-} \rightleftharpoons Y^{4-}$) し、4つの解離カルボキシル基と2つのニトリル基を有する Y^{4-} は、金属イオンの荷電数や配位数に関係なく 1:1 のキレートを生ずる (配位数4の金属イオン (Pt (IV))

等) には四座配位子、配位数6の金属イオン (Fe (III) 等) には六座配位子となる)。このように、 Y^{4-} は Lewis 塩基として振る舞うので、金属イオンと H^+ は Y^{4-} に対して競合的に反応することになる。

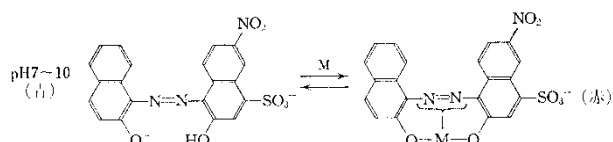
いま、 $[Y]_t \equiv [H_4Y] + [H_3Y^-] + [H_2Y^{2-}] + [HY^{3-}] + [Y^{4-}]$ とすると、金属イオン (M^{n+}) と EDTA の見かけの結合定数 ($K_{MY,app}$) は、次式で表される。

$$K_{MY,app} \equiv \frac{[MY^{n-4}]}{[M^{n+}][Y]_t} = \frac{[MY^{n-4}]}{[M^{n+}][Y^{4-}]\alpha_H} = \frac{K_{MY}}{\alpha_H} \quad (1.3.17)$$

ここで、 K_{MY} は金属イオン (M^{n+}) と Y^{4-} の真の結合定数で、 $\alpha_H (= [Y]_t / [Y^{4-}])$ は、EDTA のそれぞれの酸解離定数を K_1 ($pK_1 = 2.0$)、 K_2 ($pK_2 = 2.67$)、 K_3 ($pK_3 = 6.16$)、 K_4 ($pK_4 = 10.26$) とすると、次のようになる。

$$\alpha_H \equiv 1 + \frac{[H^+]}{K_4} + \frac{[H^+]^2}{K_3 K_4} + \frac{[H^+]^3}{K_2 K_3 K_4} + \frac{[H^+]^4}{K_1 K_2 K_3 K_4} \quad (1.3.18)$$

図 1-3-1 に示すように、 α_H は、pH の増加とともに、急激に減少し、1 に近づく。つまり、 $K_{MY,app}$ は pH が高くなると急激に大きくなる。ところが、金属イオンは、それに特有なある pH を越えると水酸化物を生成し、キレート生成反応が阻害される。このような関係から個々の金属イオンには、それぞれの滴定が可能な範囲がある。



36 図 1-3-2 EBT のキレート生成反応による変色

Mg^{2+} の EDTA キレート の $\log K_{\text{MY}}$ は 8.69 と比較的小さく、pH10 以下では定量的に反応しない。また pH 11 以上では $\text{Mg}(\text{OH})_2$ を生成し沈殿する。このため、 Mg^{2+} は pH 10～11 の範囲でエリオクロムブラックT (EBT) を指示薬として直接滴定する。一方、 Ca^{2+} の $\log K_{\text{MY}}$ は 10.59 とアルカリ土類金属の中では最も大きく、pH 13 までは水酸化物を生成しないので、pH 8～13 で滴定可能である(指示薬: 1-(2-ヒドロキシ-4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸(NN))。このため、 Mg^{2+} と Ca^{2+} が共存する場合、先の Mg^{2+} の滴定条件では、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の含量が得られる。一方、pH 12～13 として共存する Mg^{2+} を水酸化物としてマスキングすれば、 Ca^{2+} のみを滴定できる。また、ここで用いる指示薬とは、EDTA より弱い錯化剤であり、金属イオンと錯形成しているときと、遊離状態との色調が異なる(図 1-3-2)。この性質は pH 指示薬(1.2.5.5.節参照)と類似しており、金属イオンが H^+ の代わりであると考えればよい。

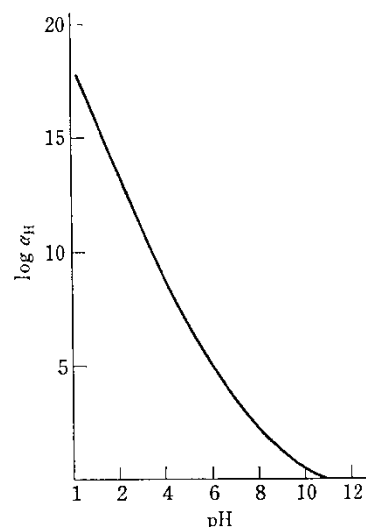


図 1-3-1 EDTA の $\log \alpha_H$ と pH の関係

この原理で、水の硬度を測定できる。水の硬度とは、水中の Ca^{2+} および Mg^{2+} の量を、これに対応する CaCO_3 [M_w : 100.09] の ppm 濃度に換算して表したものである。[ppm = parts per million = 10^{-6}]

【試薬】

0.01 M EDTA 液 (ファクター f_E 既知) ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M_w : 372.24; 3.7224 g + 水 → 1000.0 mL を 6 本; Zn で標定; 25 組分, 調整済) … 6L

0.01 M 塩化マグネシウム液 (ファクター f_{Mg} 既知) ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; M_w : 203.30; 1.0165 g + 水 → 500.0 mL; EDTA で標定; 25 組分, 調整済)

EBT 指示薬 (エリオクロムブラックT 0.1%, エタノール・トリエタノールアミン 1:1 溶液; 市販品; 共通実験台) … 50mL

アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (塩化アンモニウム 14 g + アンモニア水 114 mL + 水 → 200 mL; 25 組分, 調整済)

10% 塩酸ヒドロキシルアミン溶液 (塩酸ヒドロキシルアミン 10 g + 水 → 100 mL; 25 組分, 調整済)

10% 水酸化ナトリウム溶液 (NaOH 20 g + 水 → 200 mL; 25 組分, 調整済)

NN (カールレッド) 試薬 (1-(2-ヒドロキシ-4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸を K_2SO_4 で 200 倍 (重量比) に希釈し、混合した粉末; 市販品; 共通実験台)

【実験方法】

総硬度の測定

飲料水 50.0 mL をとり、0.01 M 塩化マグネシウム液 1.00 mL、アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 10) 1 mL、EBT 指示薬 5,6 滴を加え、0.01 M EDTA 液で滴定し、液の赤色が全く青色になったときを終点 (V_{E_t} [mL]) とする。(2回測定) [通常 Mg^{2+} 濃度が低く、EBT の色調変化が見にくい。このため、一定量の MgCl_2 を

添加してから滴定し、硬度算出の際、この分を差し引く。]

注：アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液は、ホールピペット等で直接吸い上げないこと。一人一サンプルで、一班二名なので2回測定を行う(各自持参した飲料水について測定する)。

カルシウム硬度の測定

飲料水 50.0 mL をとり、10%水酸化ナトリウム溶液 1 mL、10%塩酸ヒドロキシルアミン溶液数滴を加え、よく攪拌し 3～5 分間放置する。NN 試薬 0.05 g を加えて溶かし、0.01 M EDTA 液で滴定し、液の赤色が全く青色になったときを終点 ($V_{E,Ca}$ [mL]) とする。(2回測定)[塩酸ヒドロキシルアミン溶液は、NN の酸化防止のため加える。]

注：NN 希釈粉末は、天秤ではかりとる必要はなく、着色する程度に適当量加えればよい。

注)それぞれ2回測定しても良い。1回目は大体の値を知るために、粗い測定をし、2回目は精密に測定する。あるいは最初から細かく測定しても良い。直接ペットボトルからホールピペットで採取しないこと！

【データ処理】

- ① 総硬度の測定で得られた当量点までの体積 $V_{E,t}$ [mL] から、総硬度を求める。ただし、0.01 M EDTA 液表記のファクター f_E および 0.01 M 塩化マグネシウム液表記のファクター f_{Mg} を用いること。

$$\text{EDTA} \equiv \text{CaCO}_3; 0.01 \text{ M EDTA } 1\text{mL} = 1.0009 \text{ mg CaCO}_3$$

$$\text{総硬度 (ppm)} = 1.0009 (f_E V_{E,t} - 1.00 f_{Mg}) \times (1000/50) \quad (1.3.19)$$

- ② カルシウム硬度の測定で得られた当量点までの体積 $V_{E,Ca}$ [mL] から、カルシウム硬度を求めよ。さらに、①の結果とあわせ、マグネシウム硬度を求めよ。ただし、0.01 M EDTA 液表記のファクター f_E を用いること。

$$\text{カルシウム硬度 (ppm)} = 1.0009 f_E V_{E,Ca} \times (1000/50) \quad (1.3.20)$$

- ③ カルシウム硬度の測定の後、その滴定液をしばらく放置すると、着色コロイドが認められる。これは何のコロイドか考えなさい。

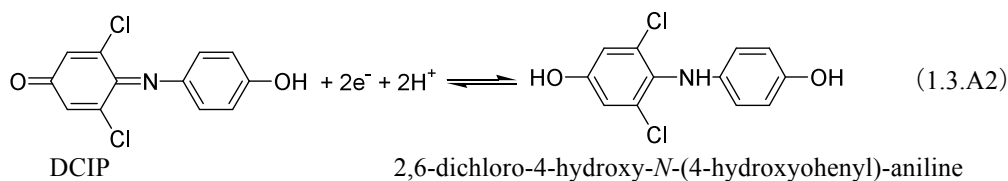
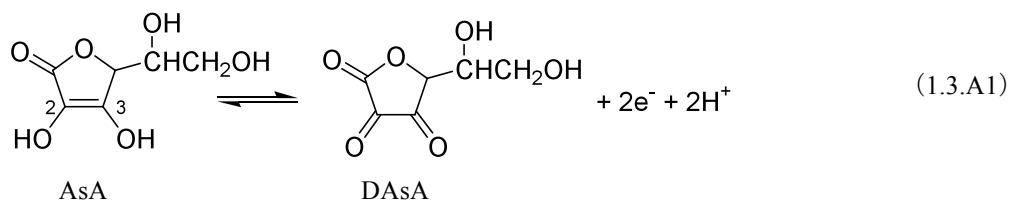
- ④ EDTA と Mg^{2+} および Ca^{2+} の $\log K_{MY}$ と図 1-3-1 の α_H と pH の関係をもとに、それぞれのイオンについてキレート滴定可能な最低 pH を求めなさい。ただし、キレート滴定を行うためには、 $\log K_{MY,app} \geq 8$ であることを条件とする。[(1.3.17)式により、 $K_{MY,app}$ を求めれば良い。]

- ⑤ 硬水、軟水とは何か。また、日本酒の男酒、女酒とは何か。

1.3.4. 市販飲料水中のビタミン C の定量 (2 人 1 組)

【原理・目的】

生体や食品中のビタミン C は還元型(L-ascorbic acid, AsA)とその酸化体(dehydroascorbate; DAsA)として存在する。AsA は 2,6-ジクロロルフェノールインドフェノール (2,6-dichlorophenolindophenol; DCIP) などの酸化剤により容易に酸化される。



DCIP はその共役キノン構造のため青(紅)色を呈するが、還元されると無色になる。DCIP の還元による退色を利用して AsA を定量できる(酸化還元滴定)。当量関係は次のようになる。

$$\text{AsA} \equiv \text{DCIP} \quad (1.3.A3)$$

このように DCIP は酸化還元酵素反応の電子受容体として生化学で汎用されている試薬である。本実験では市販の飲料水中の AsA を定量することを目的とする。ただし DCIP やアスコルビン酸は標準試薬ではないので、まず標準試薬である KIO_3 を用いてアスコルビン酸標準液を標定し、続いて DCIP 溶液を標定し、その DCIP 溶液で試料中の AsA を定量する。

IO_3^- は酸性溶液中、弱い還元剤により 5 電子還元される(当量数 5)。



しかし、強い還元剤を用いると 6 電子還元される(当量数 6)。



[なお 3 M 以上の塩酸酸性中では、4 電子還元される ($\text{IO}_3^- + 4\text{e}^- + \text{Cl}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{ICl} + 3\text{H}_2\text{O}$)]

AsA は I_2 によっても酸化されることから、 KIO_3 による酸化反応は次のようになる。



滴定液に KI を加えておくと、過剰になった KIO_3 は KI と反応し、 I_2 を生成する。



終点の判断は I_2 の生成を確認することになる。 I_2 は水に不溶であるが KI 溶液中では、 I_3^- となり赤褐色を呈する。 I_3^- の希薄溶液の色は識別しにくいですが、ヨードデンプン反応により I_2 の生成を明瞭に確認できる。以上が、 KIO_3 によるアスコルビン酸標準液の標定原理である。

【試料の準備】

AsA が含まれていると思われる市販飲料水を準備する。ただし、お茶などのようなポリフェノールを多く含む

飲料水は避けることが望ましい。(注:ポリフェノールは還元剤である。)

【試液の調製】

5% **メタリン酸溶液**: 特級棒状メタリン酸(HPO_3 ; M_w 79.98, 純度約 37%) 150g を水 2.85 L に溶解. 冷所保存 (25 組分, 調整済).

2% **メタリン酸溶液**: 各組毎に, 5%メタリン酸溶液 40 mL を水 60 mL で希釈. 用事調整.

AsA 標準液 (4mg/100mL; 約 0.2 mM):

AsA ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; M_w 176.13) 20 mg を 2%メタリン酸溶液 500 mL に溶解 (100 mL のメスシリンダーにて体積を計量) (4組分). (注: AsA は空気酸化されやすいが酸性溶液中では比較的安定である.)

6% KI 溶液: KI (M_w 166.00) 6 g を水 100 mL に溶解. 遮光保存 (25 組分, 調整済).

5 mM KIO_3 溶液: 容量分析用標準試薬 KIO_3 (M_w 214.001) 約 0.5 g ($214 \times 0.005 \times 0.5 = 0.535$) を精密に量り (W [g]), 水で正確に 500 mL とする (5 mM KIO_3). W 値は, 試薬瓶に表記 (25 組分, 調整済). $f(\text{KIO}_3) = W/214.001/0.005/0.5$.

0.2 mM KIO_3 溶液: 5 mM KIO_3 溶液 20 mL を正確に量り, 水で正確に 500 mL とする (4組分).

0.5% **デンプン溶液**: デンプン 0.5 g を水 100 mL に加熱溶解 (25 組分, 調整済).

0.5 mM DCIP 溶液: DCIP- $\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_2\text{NNaO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M_w 326.11) 0.45 g を水で 3 L に溶解. 必要であればろ過 (25 組分, 調整済).

【実験方法とデータ解析】

(A) AsA 標準液の標定

- ① 100 mL 容ビーカーに AsA 標準液 20 mL を正確にはかり, 6% KI 溶液 1 mL とデンプン溶液 3~4 滴を加え, 0.2 mM KIO_3 溶液で滴定する. ヨードデンプン反応の青色が出た点を終点 ($V(\text{KIO}_3)$ [mL]) とする. AsA 標準液の AsA 濃度 (C [mg/mL]) を求める ($f(\text{KIO}_3)$ を考慮すること).

$$0.2 \text{ mM } \text{KIO}_3 \text{ 1 mL} = (3 \times 0.2 \times 176.13 / 1000 = 0.1057) \text{ mg AsA} \quad (1.3.A8)$$

$$C \text{ [mg/mL]} = 0.1057 f(\text{KIO}_3) V(\text{KIO}_3) / 20.0 \quad (1.3.A9)$$

(B) DCIP 溶液の標定

- ② 100 mL 容ビーカーに AsA 標準液 20 mL を正確にはかり, DCIP 溶液で滴定し, (DCIP 溶液 1mL に対する AsA 量 A [mg/mL]) を求める (①の結果を考慮すること). ただし, DCIP の青(紅)色が現れた点を終点 ($V(\text{DCIP})$ [mL]) とする.

$$A \text{ [mg/mL]} = 20.0 C / V(\text{DCIP}) \quad (1.3.A10)$$

注: 微妙な変化なので注意深くみること. それぞれ2回測定しても良い. 1回目は大体の値を知るために, 粗い測定をし, 2回目は精密に測定する. あるいは最初から細かく測定しても良い.

(C) AsA の定量

- ③ 市販飲料水試料の一定量を 5%メタリン酸溶液および場合によってはさらに水で正確に希釈し、メタリン酸の終濃度がほぼ 2% になるように測定試料を調整する。(例えば飲料水 2.0 mL に 5%メタリン酸溶液 7.0 mL および水 8.0 mL 加える. このときの試料希釈率 $d = 2/17$).
- ④ 100 mL 容ビーカーに、測定試料一定量 V_S [mL] を正確にはかり、②と同様に滴定する (V_S (DCIP) [mL]). AsA 濃度が推測される場合、測定試料中の全 AsA 量が 0.5~1 mg 程度になるよう V_S を設定する.
- ⑤ ③, ④の結果より、飲料水中の AsA 含量を mg/100 mL 単位で求める.

$$\text{AsA 含量 [mg/100 mL]} = AV_S(\text{DCIP}) 100 / dV_S \quad (1.3.A11)$$

注: 直接ペットボトルなどからホールピペットで吸い上げないこと!

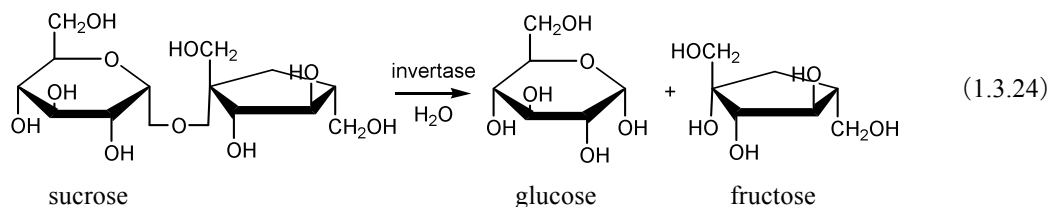
【考察】

- ① AsA の酸化および DCIP の還元において、酸化数の変化する原子とその変化について述べよ.
- ② AsA の空気酸化を防ぐ際、塩酸ではなくメタリン酸を用いた理由について考察せよ.
- ③ AsA を I_2 溶液によって酸化還元滴定することもできる. その場合、その当量関係および終点検出法について考察せよ.
- ④ 食品や飲料水中の AsA を、直接 KIO_3 標準液によって酸化還元滴定しない理由を考察せよ.
- ⑤ 市販飲料水に AsA 含量が記載されている場合、その値と定量結果とを比較せよ. また、それらに大きな違いがある場合のどのような妨害反応が考えられるか考察せよ.

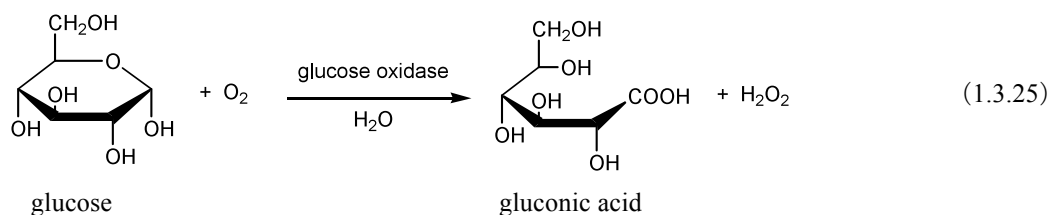
1.3.5. 市販飲料水中のショ糖とグルコースの定量 (2 人 1 組)

【原理・目的】

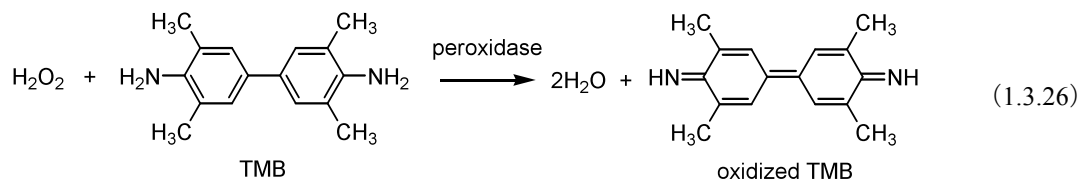
ショ糖(別名:スクロース, サッカロース)は、生体中および食品中に多く含まれている. ショ糖はインベルターゼ(別名:フルクトシダーゼ, サッカラーゼ)によりグルコースとフルクトースに加水分解される.



生成したグルコースは、グルコースオキシダーゼ存在下で、酸素により2電子酸化され、過酸化水素(H_2O_2)を生成する.



H₂O₂ はペルオキシダーゼ存在下で 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)のような還元物質を2電子酸化する。



TMB の酸化体は可視部領域の光を強く吸収する(共役キノン構造のため π - π^* 遷移エネルギーが小さくなり、長波長吸収する)ので、その生成量を吸光光度法により定量できる。この性質を利用してショ糖とグルコースを、高選択的かつ高感度に分析できる。このような酵素を用いた分析法を**酵素分析法**とよぶ。このような酸化酵素とペルオキシダーゼを組み合わせた反応に基づく酵素分析法は、食品分析、臨床分析で非常に数多く利用されている。

ここでは、この酵素分析法により、市販飲料水中のショ糖とグルコースを定量する。また、この過程で検量線作成法およびデータの統計処理について習熟することを目的とする。

【試薬の調製】

ショ糖標準溶液(0.20 mg/mL)：ショ糖(C₁₂H₂₂O₁₁ : Mw = 342.30)約 0.1 g を精密にはかり、水で正確に 500 mL にする(25 組分, 調整済)。はかりとった重量からファクターを計算し、各組毎に、これを約 5 mL ずつファルコンチューブに分注する。

グルコース標準溶液(0.1 mg/mL)：グルコース(C₆H₁₂O₆ : Mw = 180.16)約 0.1 g を精密にはかり、水で正確に 1000 mL にする(25 組分, 調整済)。はかりとった重量からファクターを計算し、各組毎に、これを約 5 mL ずつファルコンチューブに分注する。

0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)：0.1 M リン酸緩衝液(pH6.0)を 1000 mL 調製する(25 組分, 調整済)。

インペルターゼ溶液：インペルターゼ約 150 mg(2000 U)をはかり、100 mL の 0.1 M リン酸緩衝液(pH6.0)に溶かす。十分溶かした後、ろ過後、3本に分け、冷蔵保存する(25 組分, 調整済)。各組毎に、これを 2~3 mL ずつファルコンチューブに分注し、冷蔵保存する。

ペルオキシダーゼ溶液：ペルオキシダーゼ約 45 mg を 9 mL の 0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)に溶かし冷蔵保存する(25 組分, 調整済)。

TMB 溶液：TMB・2HCl(Mw 313.26)約 45 mg を 9 mL の水に溶かし冷蔵保存する(25 組分, 調整済)。

グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ(GPO)溶液：グルコースオキシダーゼ約 36 mg を 90 mL の 0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)で溶かした後、ペルオキシダーゼ溶液 9 mL, TMB 溶液 9 mL を加えて、さらに 0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)で 900 mL とし、よく攪拌後、冷蔵保存する(25 組分, 調整済)。各組毎に、これを約

20 mL ずつファルコンチューブに分注し、冷蔵(氷冷)保存する。

1 M H₂SO₄ 溶液: 約 190 mL の水に H₂SO₄ を 11 mL (= 200 mL × 1 M/18 M)加える(25 組分, 調整済)。
各組毎に、これを約 3 mL ずつファルコンチューブに分注する。

【試料の前処理】

市販飲料水(ショ糖かグルコースを含んでいるものを選択すること)に、不溶物や濁りがある試料はあらかじめ濾過する。

ショ糖あるいはグルコースの含有量がある程度わかる場合には、グルコース濃度として 0.1 mg/mL 程度になるよう水で希釈する(ショ糖濃度としては 0.2 mg/mL 程度)。

【実験方法およびデータ処理】

注:吸光度は濃度に比例するので溶液量を一定にする必要がある。このため、試料だけでなく試薬の体積も正確にはかること。量りとる体積に応じてメスピペットとマイクロピペットを使い分けること。併用することもある。P-20 のピペットマンの精度が低い場合には、その使用選択に注意。

- ① ワッセルマン試験管に表 1.3.8 にしたがって、グルコース標準溶液、ショ糖標準溶液、飲料水希釈溶液、およびインベルターゼを加えよく混和し、約 37 °C の恒温槽(ミンダー)に 30 分間放置する。

注:他のグループの試験管に水が入らないよう注意すること！他のグループと区別がつくようにテープを貼り氏名・試料番号を明記すること！

- ② これらにGPO 溶液と水を、表 1.3.8 にしたがって加えよく混和し、室温下(20~25°C)15 分間放置する。
- ③ これらに 1 M H₂SO₄ 溶液をそれぞれ 0.1 mL 加え、よく混和した後、450 nm で吸光度を測定する。
- ④ 試料番号1から6の吸光度 A を加えたグルコース標準溶液の体積に対してプロットし、検量線を作成する。最小二乗法により、検量線の線形回帰式と相関係数 r を求める。このとき $r > 0.995$ とならなければ再度検量線作成実験を行う(p.46)。
- ⑤ 試料番号7と8の吸光度をそれぞれ試料番号3と5のそれと比較し、ショ糖の定量が出来ているか考察せよ。
- ⑥ 試料番号9~14の吸光度が、いずれも適切な範囲にない場合には、市販飲料水の希釈度を改め、再度実験を行う。得られた吸光度から、④で得た検量線を用いて、市販飲料水中のショ糖とグルコースの濃度をそれぞれ mg/100 mL 単位で求めよ(検量線の横軸を体積から濃度に変換する際に、グルコース標準溶液のファクター等を考慮すること)。
市販飲料水中に、これらの含有量が記載されている場合には、その値と比較検討せよ。
- ⑦ グルコースオキシダーゼが触媒するグルコースの酸化反応において、どの炭素原子の酸化数が、どのように変化するか述べよ。

表 1.3.8 反応液の量(単位 μL)

	①	②	③
--	---	---	---

試料 番号	glc 試料	suc 試料	希釈飲料 水試料	インバーター ゼ溶液	水	GPO 溶液	H ₂ SO ₄ 溶液
1	0	0	0	0	2300	1000	100
2	20	0	0	0	2280	1000	100
3	40	0	0	0	2260	1000	100
4	60	0	0	0	2240	1000	100
5	80	0	0	0	2220	1000	100
6	100	0	0	0	2200	1000	100
7	0	40	0	200	2060	1000	100
8	0	80	0	200	2020	1000	100
9	0	0	20	200	2080	1000	100
10	0	0	20	0	2280	1000	100
11	0	0	40	200	2060	1000	100
12	0	0	40	0	2260	1000	100
13	0	0	100	200	2000	1000	100
14	0	0	100	0	2200	1000	100

Excel®を使った統計処理入門（分析化学実験）

0) [ソルバーアドイン]および[分析ツール]のインストール (Office のディスクが必要)

[ツール]→[アドイン]→[ソルバー]と[分析ツール]にチェックを入れ

OK→指示に従いインストール

1) 異常値の棄却検定

データの並べ替え

データ範囲指定→

[データ]→[並べ替え] (or [A/Z]コマンド)

最大最小値の差

[= Max-Min] (Max, Min とは最大, 最小データセル)

Q_0 の計

[= (data 2 - data1) / (Max-Min)]

(data1, data2 とは1番目と2番目のデータセル)

Max-Min のセルの列名の前後に \$ を入れる. (or F4)

ドラッグする.

Q と Q_0 の比較検討

2) 平均値, 標本標準偏差

=AVERAGE (開始セル名: 終了セル名); =STDEV (開始セル名: 終了セル名)

セル内で「=」を入力後, 関数プルダウンから AVERAGE や STDEV を選択する.

これらの関数が見当たらない場合には, 「その他の関数」から選ぶ.

「数値1」の右の表マークをクリックして範囲指定する.

3) F検定

[分析ツール]→[F検定] 範囲指定

注意: 分散 (あるいは標準偏差) の大きい方をデータ1とすること!

「観測された分散比」= F_0 , 「F 境界値片側」= F

F_0 と F の比較検討

4) t 検定

[分析ツール]→[t 検定: 等分散を仮定した2標本による検定] 範囲指定

「t」= t_0 , 「t 境界値両側」= t

t_0 と t の比較検討

表示の t_0 は絶対値を利用

(データ1とデータ2の選び方によっては t_0 が負の値になることがある)

5) 線形最小二乗法

データ範囲指定→[挿入]→[グラフ] (あるいはグラフウィザード)
→[散布図]→[散布図指定]→[次へ]→[タイトルとラベル]→名前を入力
→[完了]→図の中のデータポイントを右クリック→[近似曲線の追加]→[線形近似]
→[オプション]→[自動]→
[グラフに数式を表示する]と[グラフに R²乗値を表示する]を選択
R²乗値とは r(相関係数)のこと

Memo