

薬学実験実習

2018年4月1日

学籍番号_____ 氏名_____

まえがき

実験実習では、実験計画作成、実験記録づけからレポート作成までを実践し、基本的実験手順、薬品・機器などの取扱法を習得します。 積極的に実験に参加し、しっかりしたレポートを書くことで、関連領域の知識を身についたものにしましょう。 実験実習は十分な予習・復習を前提に、情報収集能力・問題解決能力を養うことが目的の1つです。そのための信頼できる書籍などの情報源を確保し、常に参照できるようになります。 質問は、先ず教科書、事典、参考書、便覧などを調べてからです。

基本マナー、事故防止やレポート提出のための一般的注意事項

1. 実験ノート、グラフ用紙及び定規を用意すること。 実験を始める前に、実験内容、器具、機器及び操作について理解した上で十分な実験計画を立て、実験ノートに実験手順を整理して記入しておく。 使用した試薬量、観察事項などは、実験中にそのつど記録する。
2. 実験中は安全ゴーグルをつけます。 実習室では白衣を着用し、左胸には氏名票をつけること。白衣はひざ下まであるものを各自で準備する。 氏名票は随時出席確認のためにも利用するのではっきりと太く書くこと。 履物は安全の為つま先が隠れるもので実験作業に適したスニーカーなど、ハイヒール、サンダルなどは不可です。 又、長い髪は束ねること。 実習では、危険な薬品、溶剤、機器なども取り扱う。日常生活では存在しない危険があることを念頭に、十分な準備と理解の下で、慎重に安全に実験に取り組む。
3. 実験が終了後、後片づけをしてから「実験終了」を報告し、指示を受けてから帰ること。
4. 遅刻、無断欠席： 実験開始時には、必ず担当教員よりガイダンスがある。 遅刻をしない習慣を身につけること。 欠席は実験の進行、器具、試薬の準備で教員や共同実験者に迷惑をかけるので、必ず事前に連絡をとる。
5. 実験室内では携帯電話等の使用は禁止。 薬品の誤飲・火災等の事故防止のため飲食、服薬、点眼、喫煙などは厳禁です。 火傷、怪我に気をつけ安全第一とすること。 事故が生じたときは速やかに教員に連絡すること。
6. レポートについて：実験日ごとの所定様式を配布するので、これをレポートの一枚目とし、以降はA4版片面レポート用紙を使用し、合計3～4枚程度にまとめてステープラで左上を綴じて実験番号順に重ねて提出する。

目次

有機化学

実験 1a	中性物質、塩基性物質、酸性物質の分離抽出	1
実験 1b	アミノ基のアセチル化／求核アシル置換反応	5
実験 1c	ベンゼン環のニトロ化／芳香族求電子置換反応	9
実験 1d	カルボニル基のハイドライド還元／立体異性体	11

分析化学

実験 2a	呈色反応による確認試験及び TLC による純度試験	13
実験 2b	アミノ酸の薄層クロマトグラフィー	17
実験 2c	カラムクロマトグラフィーによる葉緑体色素の分離	20
実験 2d	吸光光度法による吸収スペクトルの測定及び検量線の作成	26
実験 2e	中和滴定／サリチル酸の定量	28
実験 2f	酸化還元滴定／アスコルビン酸の定量	32

物理化学

実験 3a	酢酸の中和滴定曲線	35
実験 3b	グリシンの pH 滴定	38
実験 3c	酸触媒エステル化反応の平衡定数の測定	43
実験 3d	酢酸エチルのアルカリ加水分解反応速度の測定	46

生薬学・天然物化学

実験 4a	日本薬局方収載生薬の化学反応による確認試験	54
実験 4b	日本薬局方収載生薬の TLC による確認試験	56
実験 4c	漢方処方構成生薬の鑑定と薬方の判別	61
実験 4d	紫根の成分抽出と加水分解	65
実験 4e	卵黄からコレステロールを単離する	67
実験 4f	卵黄からリン脂質を分離・同定する	70

生物化学

実験 5a	タンパク質の定量	73
実験 5b	酵素反応速度	76
実験 5c	GOD/POD 法による血糖値の測定	81
実験 5d	血清中の AST と ALT の酵素活性測定	83

付録／実験データ、実験器具・装置の取り扱い

A.	実験測定値の取り扱い	87
B.	スチュードントの <i>t</i> 分布を使った推定と検定	89
C.	有効数字	91
D.	SI 単位	92
E.	測容器具	93
F.	標準溶液の調製	94
G.	安全ピペッターの使い方	95
H.	ビュレットの使い方	96
I.	紫外一可視分光法	97
J.	Amersham ultrospec 1100pro の使用法	98
K.	SHIMADZU UVmini-1240pro の使用法	100
L.	pHメーターの使用法	101
M.	pHの計算	103
N.	ロータリーエバポレーターの使い方	106
O.	プロトン核磁気共鳴スペクトル(¹ H-NMR)	107
P.	実験ノートの書き方	111
Q.	レポートの書き方	113

2018年4月1日
編著者 古川 淳



有機化学

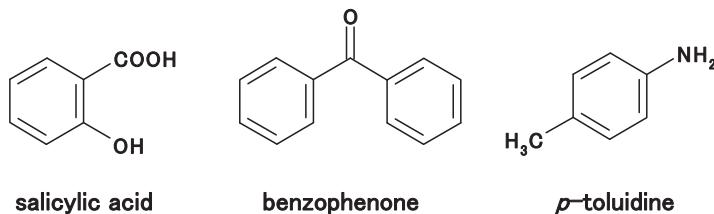
実験1a 中性物質、塩基性物質、酸性物質の抽出分離

分液ロートによる「振り分け」は、天然物や培養菌体の粗抽出物の分画、反応液からの目的産物の分離、あるいは種々の分析検体の前処理などの目的に広く応用される方法である。遊離の有機酸、有機塩基は一般的に有機層に溶け込むが、それらを塩にすれば水層に移行することを、酸塩基平衡定数、分配比などの概念をとおして理解する。また、ここでは分液ロートの使い方と共に、分離したことを確認する手段として薄層クロマトグラフィー(TLC)について学ぶ。

1) 分液ロートによる振り分けとベンゾフェノンの分離

三角フラスコにはサリチル酸 0.30 g、ベンゾフェノン 1.0 g、*p*-トルイジン 2.7 g が 100 mL の酢酸エチルに溶けている。この酢酸エチル溶液の各成分を、分液ロートをつかって分離する。そのためにはまず、酢酸エチル溶液をロートを使って分液ロートに移し、酢酸エチル層から

-トルイジンを5%HCl各20 mLで2回抽出する。次に、酢酸エチル層からサリチル酸を5%NaOH各20 mLで2回抽出する。



分液ロートに残っている酢酸エチル層を各20 mLの水で2回洗浄した後、酢酸エチル層を分液ロートの上の口から200mL三角フラスコに移し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ひだ折りろ紙でろ過する。ろ液からロータリーエバポレーターで酢酸エチルを留去するとベンゾフェノンが得られる。溶媒が充分に除かれていれば、ベンゾフェノンがフラスコ内で結晶化するので、ミクロスパーテルのヘラでカキだして標量し指定の小試験管に移す。ロータリーエバポレーターについては「付録N」を参照のこと。

硫酸ナトリウムによる有機溶媒の脱水：必要な硫酸ナトリウムの量は分液ロート操作の上手下手にも依存するが、スパーテルで山もり約2~5杯程度である。 Na_2SO_4 は水を結晶水として取り込んで $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ となって固まるので、フラスコを振り動かして、まだ結晶水を取り込める粒状の硫酸ナトリウムが残っていれば水は除かれている。5分間ほど置いてから、酢酸エチル層をロートに装着したひだ折りろ紙でろ過してナス型フラスコに移す。三角フラスコに残った硫酸ナトリウムには新たに20mLの酢酸エチル入れてすぎ、この酢酸エチルもひだ折りろ紙を通してナス型フラスコに合わせる。

2) 塩酸層から -トライジンを抽出

先の

-トライジンが溶けている塩酸層を分液ロートに入れ、10%NaOH約30 mLを加えてアルカリ性にし、遊離型になった

-トライジンを酢酸エチル各30 mLで3回抽出する。酢酸エチル層を合わせて分液ロートに入れ、約20 mLの水で洗浄する。酢酸エチル層を分液ロートの上の口から200 mL三角フラスコに移し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ひだ折りろ紙でろ過する。ろ液からロータリーエバポレータで酢酸エチルを留去すると

-トライジンが得られる。（下線部の操作は3箇所ともに同一。）しっかりと分離抽出され、溶媒が除かれていれば結晶化します。抽出したp-トライジンは実験1bの反応原料として使うので、少量の酢酸エチルとパスツールピペットを使い100 mL ナス型フラスコに数回洗いこんでから濃縮し標量する。前もってフラスコの重さを量ること。

3) 水酸化ナトリウム層からサリチル酸を抽出

次にサリチル酸が溶けている5%水酸化ナトリウム層を分液ロートに入れ、10%HCl30 mLを加えてサリチル酸を遊離型として、酢酸エチル各40 mLで3回抽出する。酢酸エチル層を各30 mLの水で2回洗浄した後、酢酸エチル層を分液ロートの上の口から200 mL三角フラスコに移し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ひだ折りろ紙でろ過する。ろ液からロータリーエバポレータで酢酸エチルを留去するとサリチル酸が得られる。（下線部の操作は3箇所ともに同一。）溶媒を溜去すれば、フラスコのガラス面に白くサリチル酸の結晶が付着するので、ミクロスパーテルのヘラのほうでカキ落として薬包紙の上にあけて集めて標量し、小試験管にいれる。

4) 薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離を確認

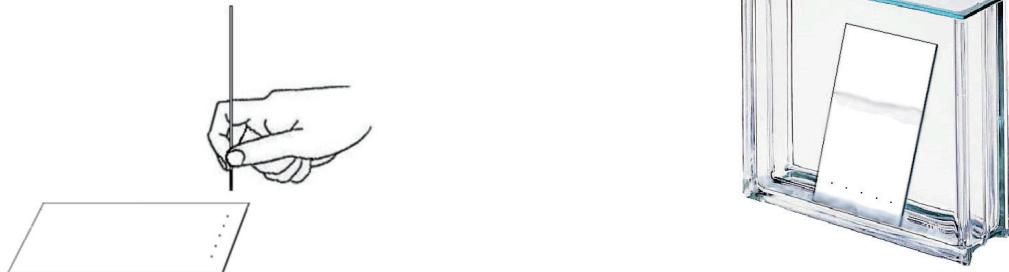
分離抽出した化合物を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開してRfを記録し純度を確認します。TLC操作法は、以下の方法に従うこと。TLCの実験が終了したら分離抽出したベンゾフェノンとサリチル酸の入った小試験管を提出します。

TLC操作法：TLCの固定相はシリカゲル、アルミナなど種類も多く、大きさも3×5 cm～20×20 cmまで色々なものが使われます。ここでは、蛍光化合物入りの5×10 cmのシリカゲルプレートを使い、メタノール1.0%，酢酸0.5%を添加した塩化メチレンを展開溶媒とします。

① 展開溶媒を展開槽に～5 mmの深さに入れる。

② TLC用試料溶液は少量の試料（ミクロスパーテル～0.5杯）をミクロ試験管にとり～0.5 mLのメチレンクロライド（溶解性、と揮発性が高く好都合）に溶解させて作る。液状物質の場合はフラスコの中の検体をミクロスパーテルに絡めて、ミクロスパーテルごとミクロ試験管に差しこんでおいて、塩化メチレンを加えてスパーテルを洗うようにすればよい。あるいは、ミクロスパーテルに絡める代わりに、使い捨てのピペットの先端に少しだけ吸い込ませるのも一法でしょう。

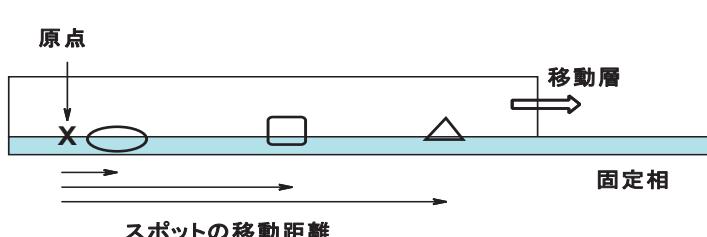
③ TLC板(5×10 cm)の下から 10 mmの位置に、左右は少し余分に空けて、表面を傷つけないように鉛筆で~5個の×印をつける。そこに検体と標品の試料溶液を毛細管現象でキャピラリにすい込み、キャピラリの下を持ってTLC板に垂直に押し当ててスポットします(図を参照)。スポットは直径 3 mm以下になるように、比較すべき検体は隣接させて、必要に応じて同じ検体を複数箇所に量を変えてスポットする。



④ 展開溶媒に浸してフタをする。しばらくして溶媒がTLC板の先端から約 1 cmに達したら取り出し、すばやく溶媒先端に鉛筆で線を入れる。迅速な展開と安定した R_f (実験2a,2b参照)のためには溶媒の蒸気を展開槽内に飽和させが必要ですから、蓋はすぐに閉めます。ろ紙(図には描き込んでいない)を入れるのも溶媒蒸気を飽和させるためです。固定相はろ紙と向かい合わせにします。

⑤ 検出は 254 nm の UV を照射してスポットの位置と形を確認して鉛筆でなぞります。TLCをスケッチし、 R_f を測ります。さらにスポットを可視化し、化合物を特定するために発色試薬(FeCl_3 , $2,4\text{-DNP}$, I_2 , Ninhydrinなど)で呈色させることもあります(実験2b,4b,4e参照)。

TLCの分離機構: 模式図は、移動相に長時間(いいかえれば高濃度で)存在する化合物は、それだけ移動相の流れに乗って先へ進みやすいことを示しています。移動相の移動距離に対するスポットの移動距離が R_f (rate of flow)です。



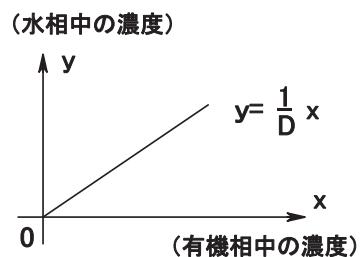
スポットのテーリングとリーディング: 移動相と固定相の物質の濃度比は、物質量が少なければ直線的でスポットは縦長の○形だが、量が多いと直線から外れてテーリング(△形)やリーディング(□形)をおこす。

① (固定相濃度が高い部分ほど、移動相の物質の割合が高い) \Rightarrow (固定相濃度が高い部分ほど、速く移動する) \Rightarrow テーリング

② (固定相濃度が低い部分ほど、移動相の物質の割合が高い) \Rightarrow (固定相濃度が低い部分ほど、速く移動する) \Rightarrow リーディング

課題1a.1 1) 水溶液 40 mL中に存在する分配比 D =(有機相中の濃度 x /水相中の濃度 y)= 3 の物質を有機溶媒 20 mLずつで3回抽出すると何パーセントが抽出されるか. (ヒント:水相中の濃度を c [g/mL]とすれば、有機相中の濃度は $3c$ [g/mL]. したがって有機相20mL中には $20 \times 3c$ [g]、水相40 mL中には $40 \times c$ [g] 存在する. 故に、有機相中の物質量/水相中の物質量= $3/2$.)

2) 有機溶媒60 mL で1回だけ抽出する場合はどうか.



課題1a.2 酸性物質、塩基性物質は pH によって分子型(油溶性)とイオン型(水溶性)の比率が変わります. たとえば、サリチル酸は酸解離定数 $pK_a = 3.0$ ですが、 $pH=2.0$ における分子型(ArCOOH 、油溶性)とイオン型(ArCOO^- 、水溶性)の比はいくつでしょうか. (ヒント: $K_a = [\text{ArCOO}^-][\text{H}^+]/[\text{ArCOOH}]$)

課題1a.3 p -トルイジンは $pK_b = 9.0$ 、アニリンは $pK_b = 9.4$ です. この違いの理由を説明しなさい.

課題1a.4 p -トルイジン、アニリンの pK_a はそれぞれいくつですか..

調製試薬: 10% & 5% HCl 日局 17 に準ずる. 23.6 mLの塩酸(36w/w%, d=1.18, 11.6M)を水で 100mL に薄め 10% 塩酸とし、2 倍希釈して 5% 塩酸とする. 10% & 5% NaOH それぞれ 100 g, 50 g の水酸化ナトリウムを水で溶かして 1000 mL にする.

TLC 標品: サリチル酸、ベンゾフェノン、 p -トルイジン の CH_2Cl_2 溶液.

TLC 展開溶媒: CH_2Cl_2 にその体積の1.0%の MeOH および 0.5%の AcOH を加える.

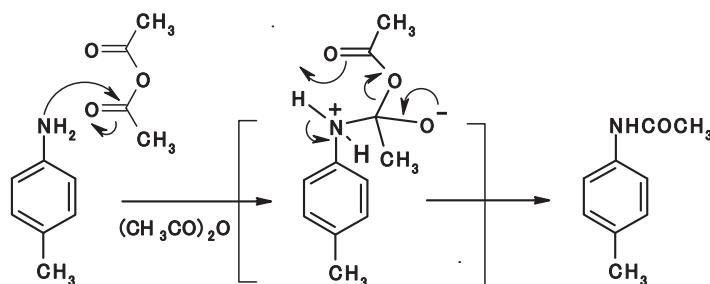
薬品・溶媒: サリチル酸、ベンゾフェノン、 p -トルイジン、硫酸ナトリウム、酢酸エチル.

器具・装置: ロート、ろ紙、分液ロート、三角フラスコ(200mL×4)、200mL ナス型フラスコ、試験管、ロータリーエバポレータ、TLC 板(蛍光剤入り)、TLC 展開槽、スポット用のキャピラリ、紫外照射箱.

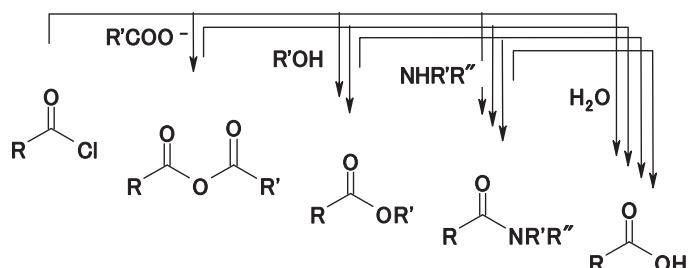
有機化学

実験1b アミノ基のアセチル化／求核アシリル置換反応

N-アセチル化によって、精製しにくいp-toluidineが再結晶で容易に精製できるようになると同時に、実験1c のニトロ化での位置選択性が向上します。この反応は窒素の孤立電子対が無水酢酸のカルボニル炭素を求核攻撃して起きる代表的な求核アシリル置換反応です。ここでは、反応機構を理解するために電子の動きを矢印で表現することを練習します。この矢印が書けるようになると、化学反応を統一的に理解するのに大いに役立ちます。また、再結晶による精製、融点測定と混融による化合物の同定を経験します。



求核アシリル置換反応：図は矢印の方向に反応が容易に進行することを示します。例えば酸ハロゲン化物からは求核試薬を替えることで酸無水物、エステル、アミド、カルボン酸が合成できます。共通して、求核試薬がカルボニル炭素を攻撃して四面体中間体が生成するので、四面体機構の反応と呼ばれます。本実験の反応は酸無水物とアミンの反応に対応します。



1) アセチル化反応

実験1aでp-toluidine約2.7 g (25 mmol) が抽出され100mLのナス型フラスコに入っている。ここに1M塩酸約25mL(メスシリンドーで量る)加えて攪拌し、p-toluidineを溶かす。溶けたら、無水酢酸 3.3 mL (35 mmol)、つぎに酢酸ナトリウム3.3 g (40 mmol)を加えて30分間ほど室温で穏やかに攪拌する。発熱がおさまれば反応が終結したと考えてよい。

2) 吸引ろ過で生成物の粗結晶を得る

結晶が沈殿するのでガラスフィルター上にあけて、アスピレータのゴム管を吸引瓶のゴム口にあてがって(はめ込む必要はない)吸引ろ過する。ろ液を反応容器に戻し、残っている結晶をガラスフィルター上に洗いこむ。この操作を3回ほど繰り返してほとんどの結晶をガラスフィルター上にあつめたら吸引を止めて、ろ過物に冰水約10~15 mLを加え、ミクロスペーテルのヘラ部分でほぐしてかゆ状にしてから、再度吸引する。このようにして結晶を2回洗浄して酢酸などを除く。2回目にはもはや水滴が出なくなるまで結晶を十分に吸引し、粗結晶を得る。

3) 再結晶による精製

再結晶は分子が正確に一定の配列をつくって結晶格子に収まることを利用する精製法です。不純物は分子構造が異なるので排除されて母液に残り、結晶部分の純度は極めて高くなります。再結晶では温度低下による溶解度の低下を利用するのが一般的です。

基本手順：①粗結晶を溶かす。②自然ろ過で不溶不純物を除く。③温度を下げると溶解度が下がり結晶が析出する。④吸引ろ過で結晶を集める。

① 粗結晶を 50 mL 三角フラスコに入れ、エタノール約 10~15 mL を加えてホットプレート上で加熱溶解する。このとき沸とう石を1, 2個入れる。

② 次に 50 mL 三角フラスコにロートとひだ折りろ紙を装着し、素早くろ過して不溶物質やごみを除く。ろ過中にロート内に結晶が析出するのを防ぐために、溶液を充分に熱し、ロートはきれいなものを、ホットプレート上に伏せて暖めておく。引火の危険を考えてホットプレートから充分に離れて行うこと。ろ液は動かさないで静置する。

③ しばらくすると冷却に伴って溶解度が下がり結晶の析出が始まる。純度の高い結晶をつくるには、急に冷やしたり、搖すったりしないで静置すること。過飽和溶液なのに室温に冷えても結晶が出ない場合はフラスコの底をミクロスパーテルで引っ搔いたり、微量の結晶の種を入れたり、少量の水を加えて溶解度を下げると結晶が出やすくなる。

④ 結晶が充分に熟成してから吸引してろ過する。このとき、ろ液で結晶を洗いこむことはしない。充分に熟成が進んでいないと、結晶化が不十分で収率が著しく低下する。尚、結晶の重量を測定するためにあらかじめガラスフィルターの重量は測定しておきます。

⑤ 結晶のうち少量を使って、TLC による反応生成物の確認と、融点測定をしなさい。

⑥ ガラスフィルターの上の結晶はゴミが入らないようにアルミ箔で軽く覆うなどして一晩以上風乾します。乾燥したのち結晶の重量をはかり反応収率を計算します。乾燥した結晶のうち 1.5 g は実験 1c の反応原料として使い、余りは指定の小試験管に入れて提出します。

4) TLCによる反応生成物の確認

TLCで反応原料、生成物と生成物の標品を並べてスポットして展開(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)します。生成物の標品とRfを比較し、反応生成物の確認と同時に純度確認をする(TLCについては実験1a を参照しなさい)。

5) 融点の測定

結晶では分子配列が高度に規則的で、温度上昇による一部分の破壊は結晶格子全体の破壊に直結する。従って純度の高い結晶性試料は非常にシャープな融点を与える。融点は結晶性物質夫々に特有の定数ではあるが、融点が一致しても同じ融点の別化合物の可能性もあるし、同一の物質であっても結晶形が異なると融点も異なる。混融試験はこのような場合に必要な試験で、「融点降下」が無ければ検体が標品と結晶構造まで含めて同一物質であることを証拠になります。

① ミクロスパーテルに軽く一杯ほどの結晶生成物をガラスフィルタから採って、素焼板の片隅に乗せ、ミクロスパーテルのヘラ部分で細かくつぶす。結晶をすりつぶすことにより、融点測定用キャビラリにに入れやすくなり、結晶中の水分も素焼き板に吸収されて、正確な融点が測定できる。不必要に多量の結晶を使わないこと。入れる量は底から約3mmです。

② 融点測定用キャビラリの口に微結晶粉末をミクロスパーテルで押し込んで、素焼版や実験台に底を軽く打ちつけて詰める。キャビラリの底に微粉末が落としこみにくい時は、約70cmのガラス管が用意されているので、ガラス管を実験台に垂直に立てて、上からキャビラリを落とす。

③ **融点測定：** 使用する融点測定器は2本のサンプルが同時に測れるようになっているので、標品($mp.153^{\circ}\text{C}$)と検体を並べて融点測定します。温度は試料の予想融点の約 20°C 下までは、 $5 \sim 6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速さで上昇させてもよいが、その後は $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ でゆっくりと上昇させるようにする。温度計と試料の融解のようすを観察し、融け始め(湿潤一詰めた結晶の一部に隙間ができる)と融け終わり(液化一完全に融解する)の温度を記録する。記録は $mp145 \sim 151^{\circ}\text{C}$ のように融点範囲を示すようにする。

④ **混融試験：** 素焼き板上で標品と検体を1:1の割合で混ぜて融点測定した場合に「融点降下」が無いことを確認する。

6) アセトアミノフェンの合成

p-aminophenol塩酸塩3.6 g (25 mmol)を100mLナス型フラスコにとり、水25mLに溶かし、無水酢酸3.3 mL (35 mmol)、次に酢酸ナトリウム3.3 g (40 mmol)を加え室温で攪拌。反応容器を氷浴で冷却してから、結晶をガラスフィルターでろ取し冰水で洗う。少量をアセトンに溶かしシリカゲルTLC(トルエン:アセトン=4:1)で生成物標品と比較する。結晶は乾燥させてから、小試験管に入れて提出する。

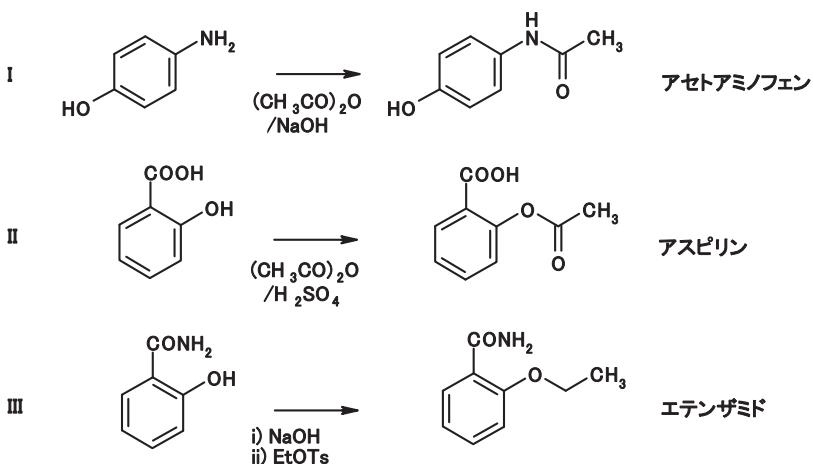
課題1b.1 本実験の1)アセチル化反応について、反応原料を1M塩酸に溶解するところから、反応生成物に至るまでの反応について電子の動きを矢印で書いてみましょう。

課題1b.2 反応 I ~ IIIについて、電子の動きを矢印で書いてみましょう。反応 I 、IIはsp²炭素に対する四面体中間体を経由する求核アシル置換反応です。反応IIIは sp³炭素に対するSN2求核置換反応です。

反応 I : アミノ基だけを選択的にN-アセチル化してアセトアミノフェンを合成する反応です。パラアミノフェノールに対して等モルの無水酢酸を作用させると、NとOの求核反応性が異なるためにはほぼ完全にNがアセチル化されて、Oはアセチル化されません。

反応II： サリチル酸の酸触媒O-アセチル化反応によるアスピリンの合成です。 サリチル酸にはアセチル化できるOHが二つありますが、この場合もサリチル酸に対して等モルの無水酢酸を作用させると、フェノール性OHのみがアセチル化されます。

反応III： EtOTs(エチルパラトルエンスルホン酸エステル)によるフェノールの O-アセチル化反応でエテンザミドが生成します。 Brなどと同様にOTsも脱離基です。 反応機構は三方両錐形(三角錐の底面を合わせた形) の遷移状態を経由する典型的なS_N2反応です。



調製試薬: 1.0 M HCl 86 mL の塩酸(36w/w%, d=1.18, 11.6M)を 1000 mL に希釈する。

TLC 標品: *p*-トルイジン、N-アセチル *p*-トルイジン の CH₂Cl₂ 溶液。

TLC 展開溶媒: ヘキサン:酢酸エチル=2:1

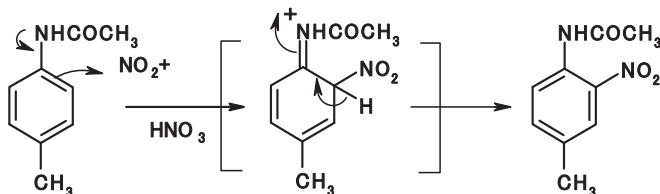
薬品・溶媒: *p*-トルイジン、無水酢酸、酢酸ナトリウム、エタノール(95)。

器具・装置: ナス型フラスコ(100mL)、三角フラスコ(50 mL)、スターラー、攪拌子、ろ紙、ロート、吸引ビン、素焼板、融点測定装置、TLC 板(蛍光剤入り)、TLC 展開槽、スポット用のキャピラリ、紫外照射箱。

有機化学

実験1c ベンゼン環のニトロ化／芳香族求電子置換反応

芳香族求電子置換反応について、置換基による反応の活性化／不活性化および配向性について学ぶ。具体的にはベンゼン環に直結する原子が孤立電子対をもつ-NHCOCH₃、直結原子が+荷電をもち不飽和結合の一部をなす-NO₂、および直結原子がC-H結合をもつCH₃のそれぞれはどのような電子効果をベンゼン環に及ぼすのかを学びます。



1) ニトロ化反応

10 mLの 70% HNO₃(濃硝酸, d=1.4)を200 mLナス型フラスコに入れる。室温でゆっくり攪拌しながら 1.5 g(10 mmol)の*N*-acetyl-*p*-toluidineを少量づつ加える(目安として全部入れるまで約5分間)。加え終わってから20分間攪拌する。反応液は淡褐色～褐色になる。

2) 粗生成物を分離する

反応溶液に氷冷水(50 mL)を少しづつ加えるとニトロ化体が黄色固体として分離していく。5分～10分間攪拌後に固体をガラスフィルター上に吸引ろ過して集める。ろ液は反応容器に戻して残っている固体を洗いこむ。固体をガラスフィルター上に集めたら、固体に氷冷水を加えて細かくほぐしてから吸引する操作を数回行う。最後には水滴が垂れなくなるまでよく吸引する。この操作で、固体が洗浄されて硝酸のほとんどが除かれる。ろ液はかなり濃い硝酸ですからゴーグルを必ず着装すること。

3) 再結晶による精製

生成物の固体を再結晶によって精製する。固体を50 mL 三角フラスコにいれ、エタノール約5～10 mLを加えてホットプレート上で加熱溶解し、不溶物をひだ折ろ紙で除き、ろ液を50 mL 三角フラスコに受ける。このときひだ折ろ紙を熱エタノールで浸しておくと若干、ロスが少なくなる。熱エタノールは三角フラスコにエタノールを入れてホットプレートで温めておいたものを使う。ろ液が冷却すれば溶解度が下がって、結晶が析出してくれる。

4) 反応生成物のTLCと融点測定による確認

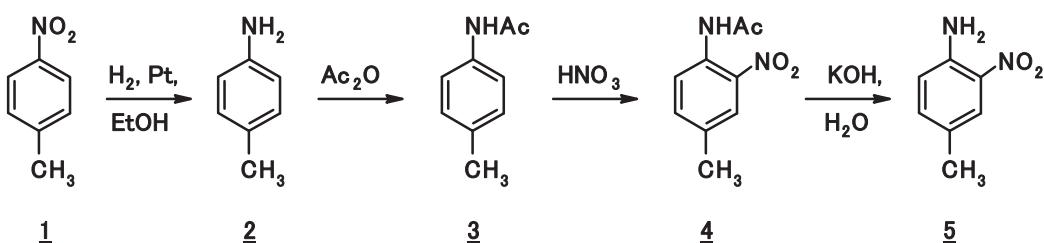
結晶をガラスフィルターで吸引ろ過して集め、少量をとて薄層クロマトグラフィー(トルエン:アセトン=4:1)で原料および生成物の標品と並べて展開して、目的の化合物ができていることを確認します。結晶の融点(mp 91～92°C)も測定します。一晩以上放置して乾燥させてから重量を量り、*N*-acetyl-*p*-toluidine 及びHNO₃に基づく反応収率を計算しなさい。実験が終了したら合成化合物を指定の小試験管に入れて指定の場所に提出します。

課題 1c.1 芳香族のニトロ化反応は芳香族求電子置換反応の代表的なものです。反応機構を電子の動きを示す曲がった矢印で書きなさい。また、ニトロ化反応で濃硫酸を触媒にすることがある理由についても同じように反応機構を示して答えなさい。

課題 1c.2 NHAc および CH_3 それぞれがベンゼン環の反応性と配向性に及ぼす電子効果を調べて、ニトロ基が置換する位置について考えましょう。 NHAc および CH_3 それぞれと同じような効果を持つ置換基として NHAc , OH , OR , OCOR および Et , Pr などがあります。これらに共通する構造上の特徴をあげなさい。

課題 1c.3 NO_2 が一つ置換すると、過剰量の硝酸が存在しても二つめの置換は起きにくい。それは何故ですか。同じような効果を持つ置換基として NO_2 の他に, SO_3H , COOR , CN , CONH_2 , CHO , COR があります。これらに共通する構造上の特徴をあげなさい。

課題 1c.4 実験 1b, 1c は化合物5に至る合成経路の一部です。化合物5を合成するには化合物2を直接ニトロ化すればよいと思いませんか。アセチル化する理由は何でしょうか。(ヒント: $-\text{NH}_2$ のままでは酸と混ぜると $-\text{NH}_3^+$ となり、反応性と配向性に及ぼす電子効果が変化する。)



TLC 標品: N -アセチル-*p*トルイジン、および、そのニトロ化物 の CH_2Cl_2 溶液。

TLC 展開溶媒: トルエン:アセトン = 4:1

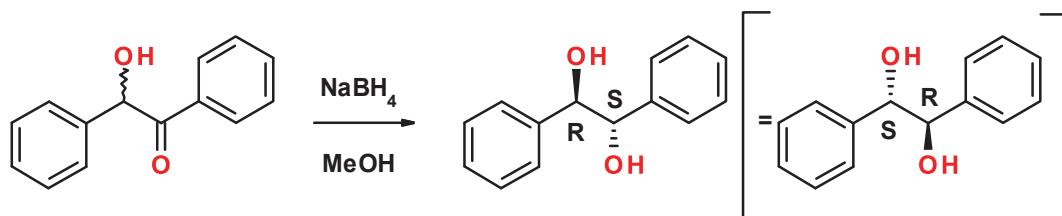
薬品・溶媒: N -acetyl-*p*toluidine、濃硝酸(70% HNO_3)、エタノール。

器具・装置: ナス型フラスコ(200 mL)、ガラスフィルター、ロート、ろ紙、吸引ビン、メスシリダーリー、三角フラスコ(100 mL)、素焼板、融点測定装置、TLC 板(蛍光剤入り)、TLC 展開槽、スポット用のキャピラリ、紫外照射箱。

有機化学

実験1d カルボニル基のハイドライド還元／立体異性体

ベンゾイン(benzoin)をメタノール中で水素化ホウ素ナトリウムで還元すると、「立体選択的」にメソ体のヒドロベンゾイン(hydrobenzon)が生成し、ラセミ体はほとんど生成しない。その反応機構を考察し、また立体化学への理解を深める。また通常のTLCではラセミ体の分離は出来ないが、ジアステレオマーの分離は可能であることを体験する。



1) 水素化ホウ素ナトリウムによる還元

ベンゾイン1.0 g(4.7 mmol)を200 mLのナス型フラスコに入れ、20 mLのMeOHを加えて、室温下、マグネチックスターラーで攪拌する。しばらく攪拌したら、180 mg(4.7 mmol)の水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)を約5分間かけて少しづつ加える。加え終わってから25分後に150 mLの水をゆっくり加える。このとき発泡があるので気をつけること。つぎに2gのNH₄Clをゆっくり加える。発泡があるので気をつける。

2) 生成物の抽出

反応生成物を酢酸エチル各75 mLで2回抽出する。酢酸エチル層を合わせて分液ロートに戻し、水50 mLで洗浄する。酢酸エチル層は200 mL三角フラスコに入れ、硫酸ナトリウムで乾燥(実験1a参照)する。ひだ折ろ紙でろ過し、酢酸エチルをエバポレータで留去(付録N参照)する。生成物(メソ体と微量のラセミ体)は放置すると固体になるので、収率によりエタノール95を5~10 mL加えて再結晶する。氷冷して結晶の析出量を確認しながら、できるだけ少量の溶媒を使用し、メソ体結晶を析出させること。合成した結晶はすべての実験が終了してから提出します。

3) 結晶と母液のTLC分析

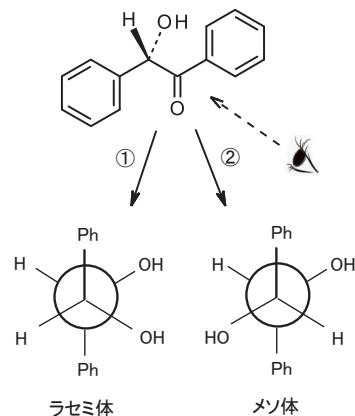
メソ体の結晶を吸引ろ過し、1~2 mLの氷冷エタノールで洗う。収率を算出し、融点(mp 139°C)を測定する。また、結晶、母液、立体異性体標品(1R,2S体、1R,2R体、1S,2S体)についてシリカゲルTLCで比較します(展開溶媒は3%メタノール入りメチレンクロリド)。立体異性体間の小さなRfの違いを検知するには以下の工夫が必要です。

- ① スポットする検体を必要以上に濃くしない。すなわち、結晶については~10 mgをマイクロチューブにとって 0.5 mLのCH₂Cl₂)に溶かしてTLC検体とします。
- ② 母液からEtOHをよく除く。即ち、パストールピペットの先端に~10 mm の母液をとってマイクロチューブに差し込み、次にパストールピペットにバルブをつけてで空気を送りEtOHを揮発除去する。ピペットに付いたサンプルもCH₂Cl₂で洗い込んで母液サンプルとする。

③ 微妙なRfの違いを検出するために、比較対象検体を挟むように2~3mm程に近接させて複数個スポットします。

課題 1d.1 ラセミ体を光学活性体に分離する場合の代表的な方法の実例を3つ挙げ、それについて解説しなさい。

課題1d.2 右図を見る限りでは、ハイドライド(H^-)は立体障害が小さい紙面手前からカルボニル基を攻撃し、ラセミ体が生成するようみえませんか(ルート①)。しかし実際は、立体障害が大きいようにみえる紙面の向こう側からハイドライド還元が起きて、ほぼメソ体のみが生成します(ルート②)。どのように反応が進行しているのかを考えて、メソ体が主生成物になる理由を説明しなさい。(ヒント: 酸性の強いベンゾインの-OHが NaBH_4 と反応し- $\text{O}\cdot\text{BH}_3^-$ となる。この反応中間体をニューマンの投影式で描くのが良いでしょう。)



TLC 標品: ベンゾイン及びその還元体(メソ体、ラセミ体、 $1R,2R$ 体、 $1S,2S$ 体)の CH_2Cl_2 溶液。

TLC 展開溶媒: メチレンクロリドにその体積の3%のメタノールを添加する。

薬品・溶媒: ベンゾイン、メタノール、水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)、塩化アンモニウム、酢酸エチル、硫酸ナトリウム、エタノール(95)。

器具・装置: 分液ロート、グラスフィルター、吸引ビン、ナス型プラスコ(200 mL)、素焼板、融点測定装置、TLC 板(蛍光剤入り)、TLC 展開槽、スポット用のキャピラリ、紫外照射箱。

分析化学

実験2a 呈色反応による確認試験及びTLCによる純度試験

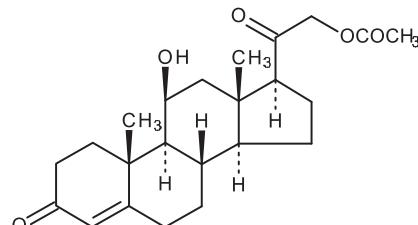
塩化第二鉄試薬によるアスピリンの確認試験、フェーリング試薬を用いたヒドロコルチゾン酢酸エステルの確認試験、および、津田試薬によるスルファメチゾールの確認試験を行う。また、薄層クロマトグラフィーによりイブプロフェンの純度試験を行う。これらはいずれも日局17あるいはその解説書に載せられている試験である。

1) アスピリンの確認試験

アスピリン少量(ミクロスパーーテル1杯)を試験管にとり、駒込ピペットで水約5 mLを加え、直火で5～6分間煮沸する。冷後、塩化鉄(III)試液¹⁾1～2滴加える。液は赤紫色を呈する。

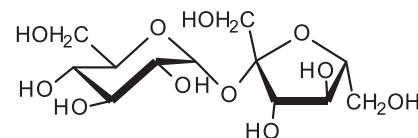
2) ヒドロコルチゾン酢酸エステルの確認試験

本品 0.01 g にメタノール 1 mL を加え、加温して溶かし、フェーリング試液²⁾ 1 mL を加えて加熱するとき、だいだい色～赤色の沈殿を生じる。



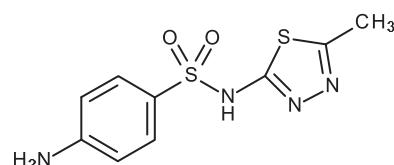
3) 白糖(蔗糖)の確認試験

本品 0.1 g に希硫酸³⁾ 2 mLを加えて煮沸し、水酸化ナトリウム試液⁴⁾ 4 mL 及びフェーリング試液 3 mL を加えて煮沸するまで加熱するとき、赤色～暗赤色の沈殿を生じる。

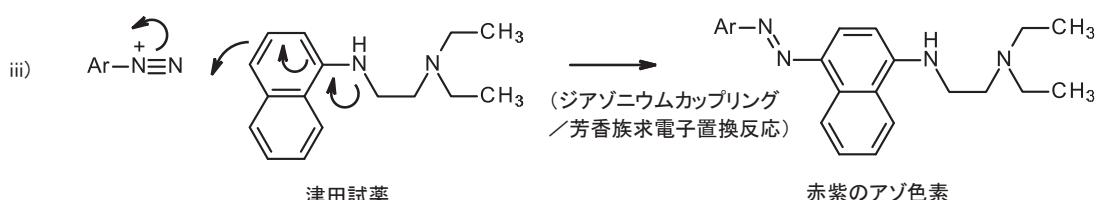
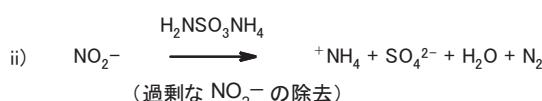
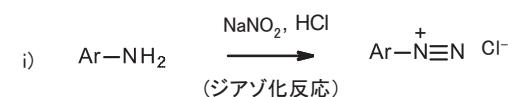


4) スルファメチゾールの確認試験

スルファメチゾールの少量(~10 mg)を試験管にとり、水5 mL及び希塩酸⁵⁾ 2 mLを加える。氷でよく冷却して亜硝酸ナトリウム試液⁶⁾ 3滴を加えて振り混ぜ、2分間放置する。次にアミド硫酸アンモニウム試液⁷⁾ 1 mLを加えてよく振り混ぜ1分間放置した後、ショウ酸N-(1-ナフチル)-N'-ジエチルエチレンジアミン(津田試薬)試液⁸⁾ 1 mLを加えるとき、液は赤紫色を呈する。

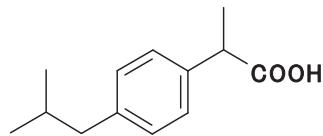


津田試薬による芳香族アミンの定性反応: i) アミンのジアゾ化. ii) 過量の NO_2^- を分解するための反応. NO_2^- を分解してあればアルカリ性にすることなく酸性で iii) ジアゾニウムカップリングで赤紫色のアゾ色素が生成する.



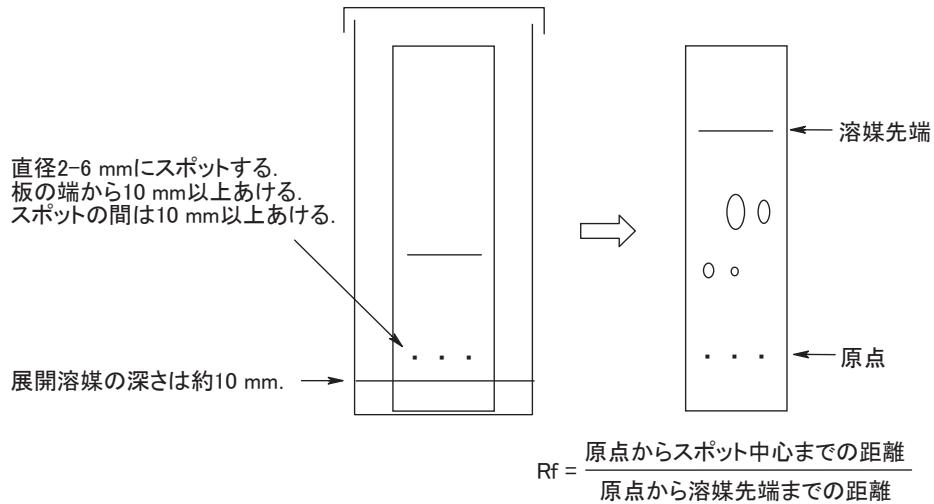
5) イブプロフェンの薄層クロマトグラフィーによる純度試験

この純度試験は合成工程で生成する類縁物質に対する試験である. イブプロフェン0.50 g をとり、アセトン5 mL に溶かし、試料溶液とする. この液 1 mL を正確に量り、アセトンを加えて100 mL とし標準溶液とする. これらの液につき薄層クロマトグラフ法により試験を行う. 試料溶液及び標準溶液 5 μL



ずつを、薄層クロマトグラフ用シリカゲル(蛍光剤入り)を用いて調製した薄層板にスポットする. 次にヘキサン:酢酸エチル:酢酸(100)=15:5:1 を展開溶媒として約10 cm 展開した後、薄層板を風乾する. これに紫外線(主波長 254 nm)を照射するとき、「試料溶液から得た主スポット以外のスポットは標準溶液から得たスポットより濃くない.」

薄層板は20×5 cm のものを用いる. 展開溶媒は展開容器の10 mm の高さまで入れる. スポットは下から20 mm の高さ(展開溶媒の液面から10 mm)に、2~6 mm の円形にマイクロキャビラリ (5 μL) を用いてスポットする. スポットとスポットの間隔は10 mm 以上とする. 約10 cm 展開した後、薄層板を展開容器から取り出し直ちに、溶媒の先端に印をつけて風乾する. これに紫外線(主波長 254 nm)を照射し、得られたスポットのRf値および濃淡を比較する.



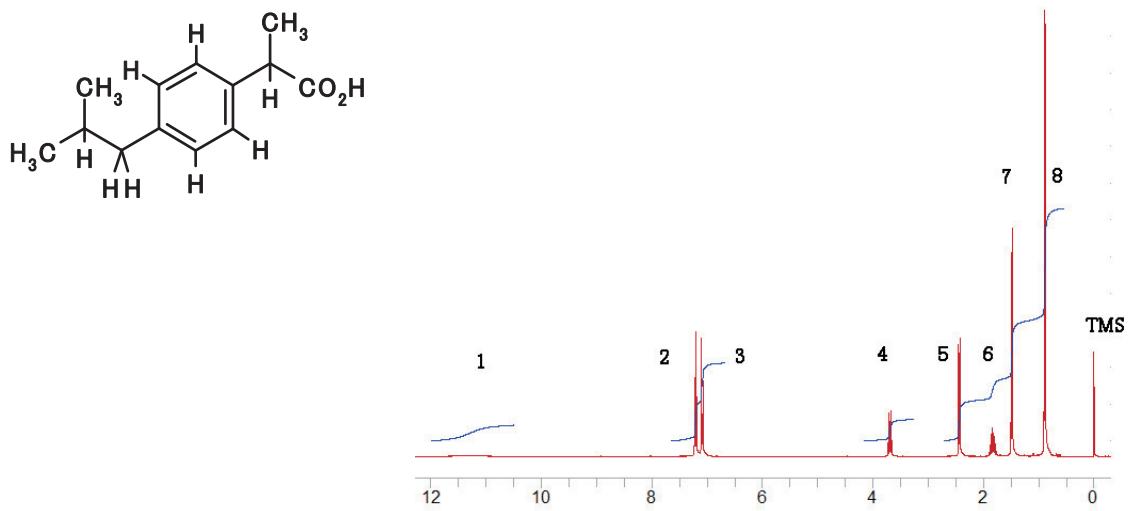
課題2a.1 ヒドロコルチゾン酢酸エステル、蔗糖の各々についてフェーリング試液と反応して沈殿を生じる理由を考えなさい。

課題2a.2 合成工程で生成する不純物の含量の試験をしている。「試料溶液から得た主スポット以外のスポットは標準溶液から得たスポットより濃くない。」はどういう意味か説明しなさい。

課題2a.3 合成工程で生成する不純物としては、4-イソブチルフェニルメチルケトン(1)、2-(4-イソブチルフェニル)エタノール(2)および2-(4-イソブチルフェニル)-2-ヒドロキシプロピオン酸(3)がある。化合物 1~3 の構造式を描きなさい。

課題2a.4 合成工程で生成する化合物の構造確認は核磁気共鳴スペクトルによる場合が多い。下図はイプロフェンのプロトン核磁気共鳴スペクトルである。シグナル1~9について以下の項目について考えなさい。簡単なスペクトルの見方、詳細なスペクトルは「付録O」を参照すること。

- 1) 積分曲線(相対面積).
- 2) 化学シフト(相対的な共鳴周波数).
- 3) スピン結合(シグナルの分裂の型、例えば d, t, q, dt など).
- 4) 水素の帰属とその水素が置かれた環境('オレフィン上の水素'など).



調整試薬: 1) 塩化鉄(III)試液 塩化鉄(III)六水和物 9 g を水に溶かし、100 mL とする (0.33 mol/L).

2) フェーリング試液 用時、下記両液の等容量を混和する.

・銅液：硫酸銅（II）五水和物 34.66 g を水に溶かし、500 mL とする。共栓瓶にほとんど全満して保存する。

・アルカリ性酒石酸塩液 酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 173 g 及び水酸化ナトリウム 50g を水に溶かし、500 mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。

3) 硫酸、希 硫酸 5.7 mL を水 10 mL に注意しながら加え、冷後、水を加えて 100 mL とする (10%).

4) 水酸化ナトリウム試液 水酸化ナトリウム 4.3 g を水に溶かし、100 mL とする (1 mol/L)。ポリエチレン瓶に保存する。

5) 塩酸、希 塩酸 23.6 mL に水を加えて 100 mL とする(10%).

6) 亜硝酸ナトリウム試液 亜硝酸ナトリウム10 g を水に溶かし、100 mL とする。用時製する。

7) アミド硫酸アンモニウム試液 アミド硫酸アンモニウム 1 g を水に溶かし、40 mL とする。

8) *N,N*-ジエチル*N'*-1-ナフチルエチレンジアミンシュウ酸塩試液 *N,N*-ジエチル*N'*-1-ナフチルエチレンジアミンシュウ酸塩 1 g を水に溶かし、1000 mL とする。 (津田試薬)

TLC 展開溶媒: ヘキサン:酢酸エチル:酢酸(100) = 15:5:1

薬品・溶媒: アスピリン、ヒドロコルチゾン酢酸エステル、白糖、スルファメチゾール、メタノール、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル、酢酸。

器具・装置: メスフラスコ(5 mL×1、100 mL×1)、ホールピペット(1mL×1)、ブンゼンバーナー、試験管バサミ、試験管×8、三角フラスコ 50mL、TLC 板(蛍光剤入り、20×5cm)、TLC 展開槽、マイクロキャピラリ(5 μ L)、紫外照射箱。

分析化学

実験 2b アミノ酸の薄層クロマトグラフィー(TLC)

アミノ酸をシリカゲル TLC で分離する。展開溶媒は 1-ブタノール・酢酸・水の混合溶媒である。アミノ酸の Rf 値を測定し、アミノ酸の構造との関係について考察する。

最も一般的な固定相がシリカゲル、移動相が有機溶媒の TLC は、試料の固定層への吸着力の違いで分離する「吸着クロマトグラフィー」である。ここで、移動相に水を加わるとシリカゲルに水が含まれて固定相として働き、固定層と移動相へ溶解性の違いで分離する「分配クロマトグラフィー」に近くなる。このように実際のクロマトグラフィーでは、分離を支配するのは单一の原理ではなく幾つもの分離機構が同時に機能している。吸着や分配のほかにも、シリカゲル表面の水酸基(シラノール基)は弱酸性なので陽イオン交換作用があるし、シリカゲルの孔径に応じた分子ふるい効果が分離に影響をおよぼす場合もある。さらに移動相の pH も溶質の解離に影響する。

1) 展開槽とアミノ酸試料の準備

- ① 二つの展開溶媒を準備する。a) 1-ブタノール 8 mL、酢酸 2 mL、水 2 mL、および b) 1-ブタノール 8 mL、酢酸 1 mL、水 1 mL をそれぞれ 300 mL ピーカーにとり、よく混合した後、ラップ等でしっかりとふたをし、しばらく放置して溶媒蒸気圧を一定にする。
- ② 試料溶液として、アラニン(A1a)、グリシン(Gly)、トリプトファン(Trp)、バリン(Val)、ヒスチジン(His)、フェニルアラニン(Phe) およびプロリン(Pro)の 7 種アミノ酸の 1 mg/mL 水溶液をそれぞれ調整する。

2) TLC による分離

- ③ シリカゲル薄層プレート(5cmx10cm)の下端から 2cm(スポット位置、原点)に鉛筆で等間隔に印をつける。また、展開距離も Rf に影響するので展開距離を 5cm として溶媒先端の予定位 7cm にも鉛筆で印をつける。鉛筆で印をつけたスポット位置に、小さな点状(3mm 径程度以下)になるように、ガラスキャピラリーで各試料溶液スポットする。同じものを 2 枚作成する。
- ④ スポットが乾いたら展開する(図1)。このとき、展開溶媒の飽和状態は Rf に影響するので、薄層プレートを手早く展開槽のピーカーの壁に立てたらすぐにラップでフタをする。展開溶媒 a と b について同様に行う。
- ⑤ 展開溶媒が上昇して展開終了位置に達したら、プレートをピーカーからとり出す。溶媒が乾く前に溶媒先端の位置に手早く印をつけた後、ホットプレートやドライヤーを用いて乾燥する。

3) ニンヒドリンによる検出

- ⑥ ドラフト内でニンヒドリン試薬を噴霧し、100°C 程度のホットプレート上で数分間加熱してアミノ酸を発色させる。ニンヒドリン試薬でのアミノ酸の呈色をわめて鋭敏で少量の噴霧で十分な発色が得られる。多量のニンヒドリン試薬を噴霧すると試料スポットがにじんで Rf 植を求められなくなる。

⑦ 発色後のプレートの状態をスポットの形状や展開状態を含めてノートに写しとる。また、原点から各スポットの中心点(重心)まで、および溶媒先端までの距離を測定し Rf 値を求める(図2)。Rf (rate of flow) は例えば G のスポットについて、

$$Rf = \frac{g}{s} \text{ である。} \quad (s:\text{溶媒の移動距離}, g:G \text{ の移動距離})$$

展開溶媒の飽和状態や展開距離も Rf に影響するが、シリカゲル薄層プレートの吸湿状態などもスポットの形状や Rf 植を変化させる。



図1

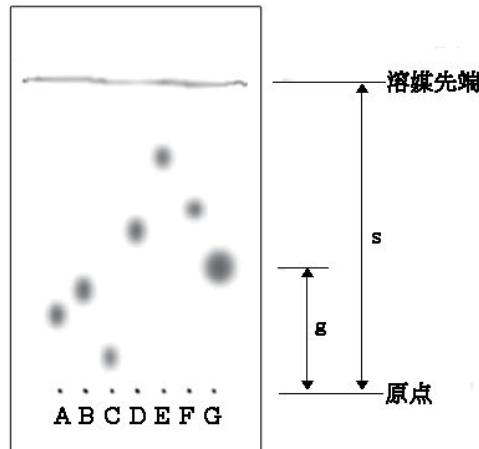


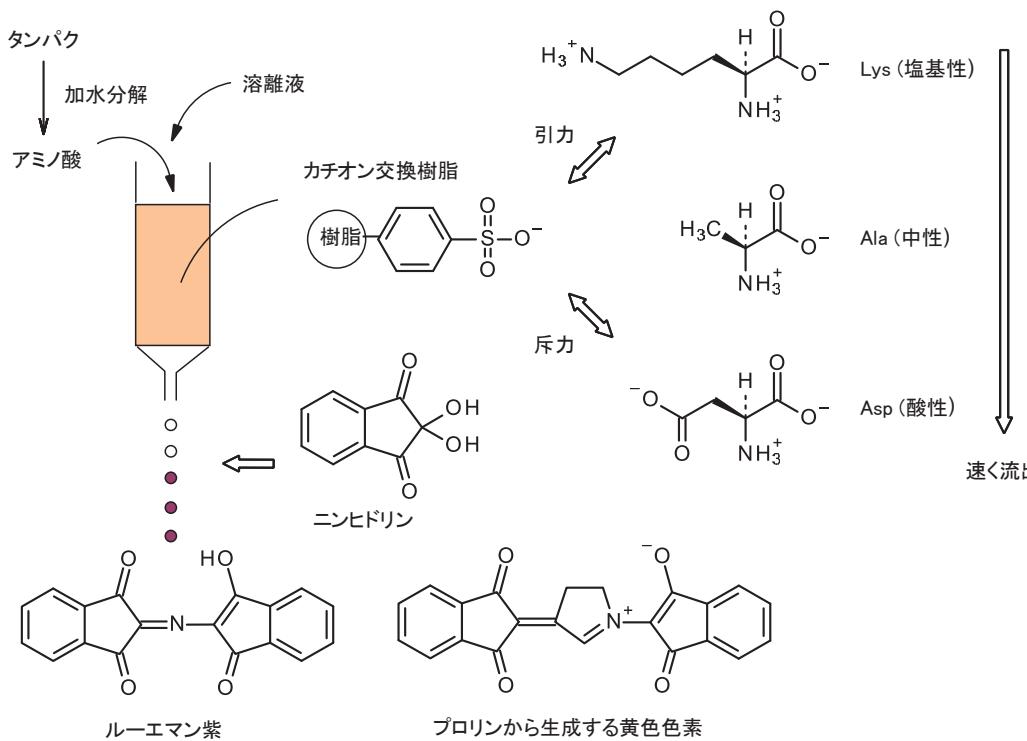
図2

課題 2b.1 ヒスチジンを除く6種のアミノ酸の移動度 (Rf植) に違いが生じる理由を、アミノ酸の構造に基づいて考察しなさい。

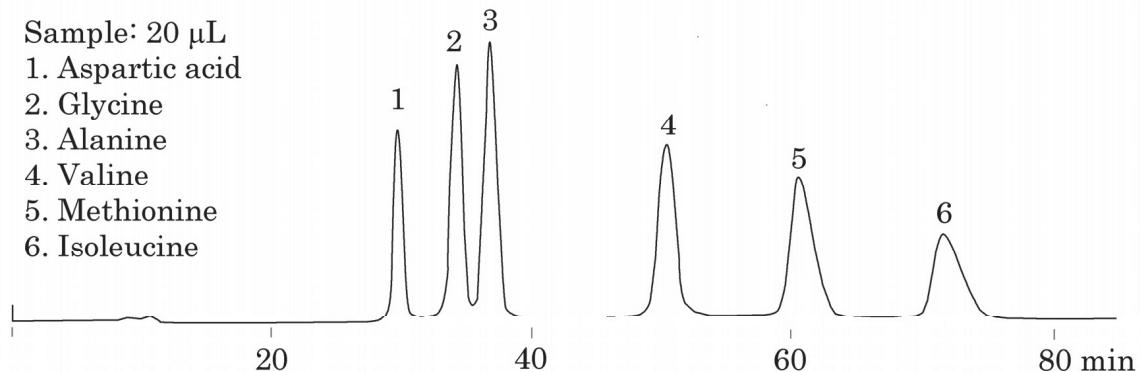
課題 2b.2 ヒスチジンが他のアミノ酸と比べて低い Rf 植を示す理由をシリカゲルの性質と関係づけて説明しなさい。

課題 2b.3 展開溶媒 a と b でどのような差が生じたか、またその理由は何か、考察しなさい。

アミノ酸分析装置のしくみ／イオン交換クロマトグラフィー：



Sample: 20 μ L
 1. Aspartic acid
 2. Glycine
 3. Alanine
 4. Valine
 5. Methionine
 6. Isoleucine



TLC 試料溶液：アラニン(A1a)、グリシン(Gly)、トリプトファン(Trp)、バリン(Val)、ヒスチジン(His)、フェニルアラニン(Phe)およびプロリン(Pro)の7種アミノ酸の1 mg/mL水溶液

薬品・溶媒：ニンヒドリンスプレー、1-ブタノール、酢酸。

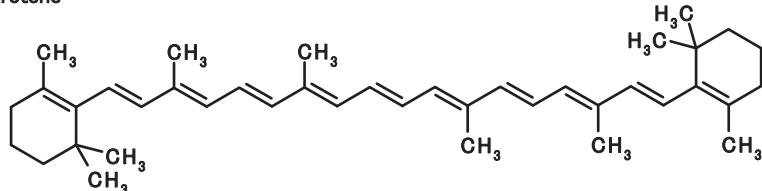
器具：試験管、TLC板(蛍光剤入り、5x10cm)、ビーカー(300mL)、サランラップ、スポット用キャピラリ、紫外照射箱。

分析化学

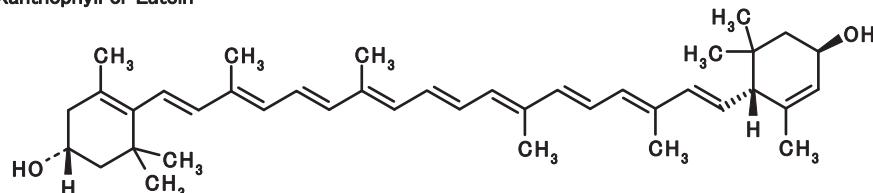
実験 2c カラムクロマトグラフィーによる葉緑体色素の分離

カラムクロマトグラフィーの基本的な技術・理論を習得すると共に、Carotenoid, Chlorophyll などの脂溶性植物色素の性質を学ぶ。これらの色素の構造を以下にしめす。

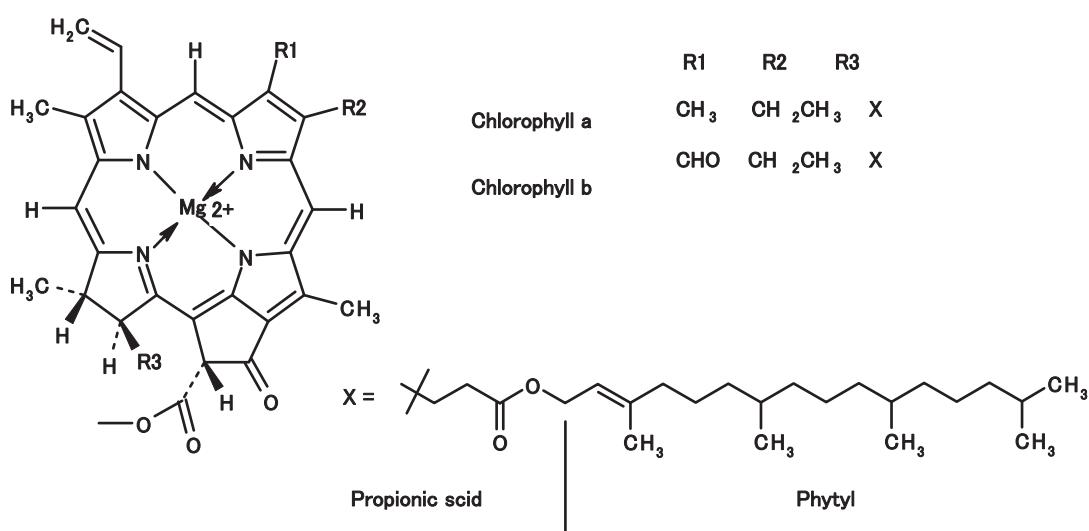
β -Carotene



Xanthophyll or Lutein



Chlorophyll a & b



1) 試料溶液の調製

- ① ホウレン草(*Spinacea oleracea*L. ; アカザ科)の葉 1 枚 (1~1.5g) をはさみで細切して 100mL 三角フラスコに入れる.
- ② 少量の冷メタノールで軽くすすいだ後、再びメタノール 30mL を加え、水浴上で時々振り混ぜながら数分かけて葉が脱色するまで加温抽出する.
- ③ この液をろ紙を用いてろ過し、ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに少量のメタノールを加えて濃縮乾固し試料とする.

2) 分離カラムの作製

- ④ 内径 1cm、長さ 30cm のクロマトグラフィー用ガラスカラムに少量の溶離液（石油エーテル : 2-プロパノール = 25 : 1）を入れる。溶離液は試料を吸着させて展開するまで繰り返して使用する。必要量は 1 班当たりの約 100mL である。石油エーテルは引火しやすいので取扱いに注意すること。
- ⑤ 小量の脱脂綿を軽く丸めて落とし、ガラス棒で気泡が入らないように下部につめる。
- ⑥ あらかじめ量りとったシリカゲル約 5g に溶離液を加え、空気が入らないように注意してかき混ぜながらカラムに流し込む。カラムから流出した溶離液を繰り返し用いてシリカゲル全量をカラムに流し込み分離カラムとする（高さ約 15cm）。

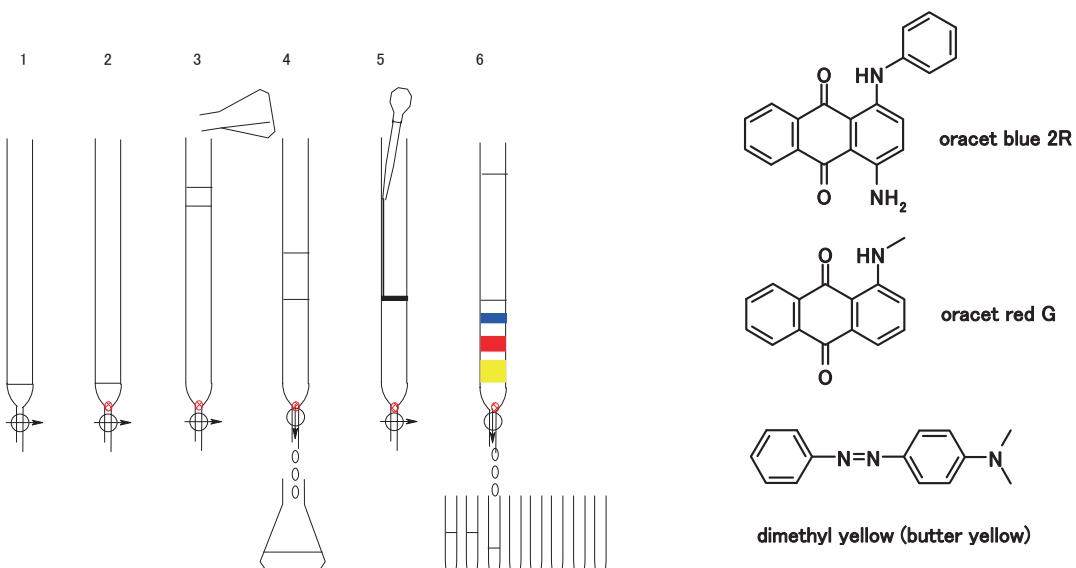
3) 分離操作

- ⑦ 試料に溶離液 1 mL を加えて溶かし、シリカゲルの上面を乱さないように静かにカラムに流し込み吸着させる。試料液を吸着させる時は、溶媒を固定相の上面すれすれまで下げて、少量の溶離液でカラムの壁に付着した試料を洗い落すことを数回繰り返す。その後、溶離液少量ずつを加えて展開する。
- ⑧ 溶出順にカロチン(黄色)、クロロフィル a(青緑色)、クロロフィル b(青緑色)、ルテイン(キサントフィル、黄色)の順に分離される。
- ⑨ カロチン溶出後、クロロフィル a、b、ルテイン が十分に分離したら展開を止めて、分離された色素の様子を観察する。
- ⑩ 使用済の有機溶媒はドラフト内の廃有機溶媒だめに、カラム固定相のシリカゲルはドラフト内のバットに捨てること。

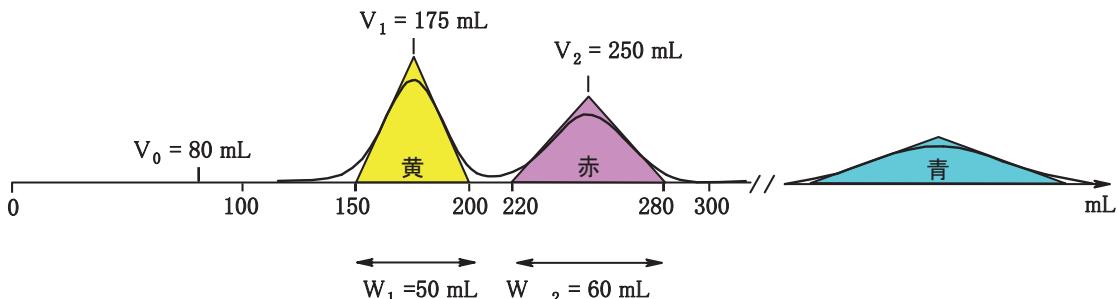
課題 2c.1 カラムクロマトグラフィについての以下の文章をよく読み 1)~3) の間に答えなさい。

シリカゲル吸着カラムクロマトグラフィー： 反応生成物や植物抽出物などの分離精製にはカラムクロマトグラフィがよく使われる。ここではシリカゲル／トルエンのカラムを使って 3 種類の色素(右下図を参照)を分離する。

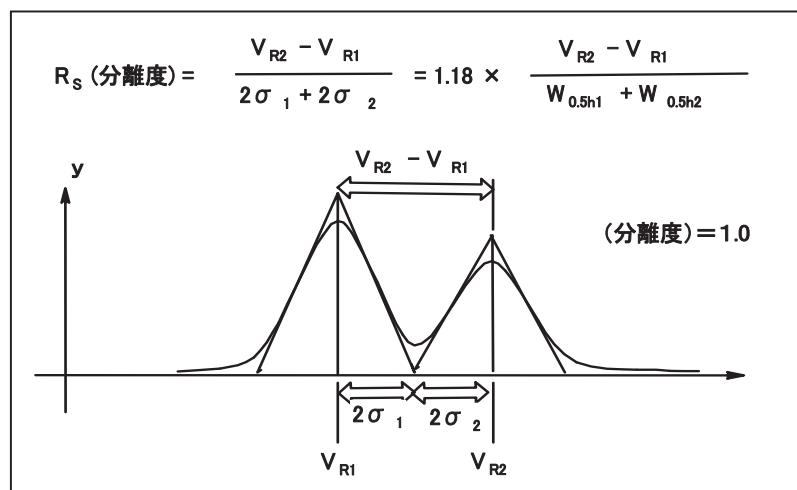
1. 先ず、少量の溶媒をいれる。こうすると 2 で綿が空気泡を含まない。
2. 脱脂綿をいれてガラス棒などでフィルターにする。
3. シリカゲル／溶媒を空気泡が入らないように静かに入れる。
4. コックを開けて溶媒を流し、シリカゲルを均一に充填する。
5. 管壁を伝わらせて静かに試料をシリカゲルに吸着させる。
6. シリカゲルが舞い上がるないように注意して移動層溶媒を流して分画する。



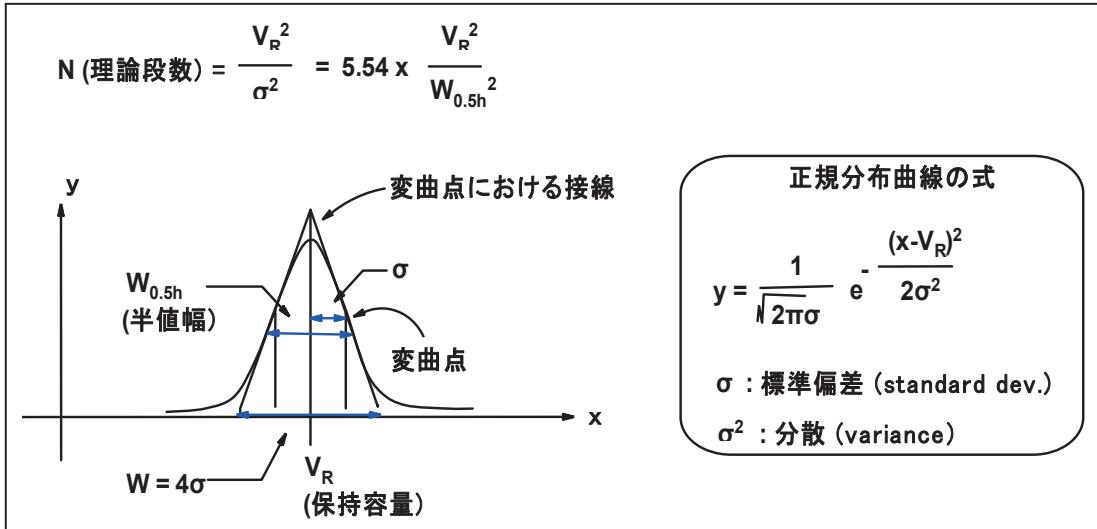
クロマトグラフィーの原理：シリカゲル(固定相)50 g では、カラム体積は約 100 mL で、その約 80%を占める間隙(空隙容積、 V_0)を溶媒のトルエン(移動層)が流れます。物質によって固定相／移動層の分配モル比(容量比、 k')が異なるので移動速度に差が生じて混合物は分離します。この実験系ではクロマトグラムは下図の様です。



「分離度」：分離の尺度。



「理論段数」：カラムの性能を表す。



シリカゲルを 50 g から 100 g に 2 倍にすると、 50 g のカラムを二本接続したことになり、このとき、 V_R は 2 倍、 W は $\sqrt{2}$ 倍になるので、理論段数は 2 倍になります。

参考：理論段数 N のカラムを直列接続した n 本のカラムと考え、それぞれ部分カラムの理論段

数を $N_i = \frac{V_i^2}{\sigma_i^2}$ ($i = 1, 2, \dots, n$) としたとき、 N は N_i の単純な総和ではなく次式で表される。

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma^2} = \frac{(V_1 + V_2 + \dots + V_n)^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2}$$

ここで高校数学でもなじみ深いコーチー・シュワルツの絶対不等式：

$$(a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n)^2 \leq (a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_n^2)(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2)$$

に於いて、 $a_i = \sigma_i$, $x_i = \frac{V_i}{\sigma_i}$ と置き換えれば、次の不等式が得られる。

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma^2} = \frac{(V_1 + V_2 + \dots + V_n)^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2} \leq \frac{V_1^2}{\sigma_1^2} + \frac{V_2^2}{\sigma_2^2} + \dots + \frac{V_n^2}{\sigma_n^2} = N_1 + N_2 + \dots + N_n$$

即ち、 $N \leq \sum_{i=1}^n N_i$ である。

1) 赤い色素 (oracet red G) について、カラムの理論段数 N を計算し、有効数字 2 桁で答えなさい。

$$N = \underline{\hspace{2cm}}$$

2) 黄色の色素(methyl yellow)と赤い色素 (oracet red G) の分離度を有効数字 2 桁で答えなさい。

$$R_s = \underline{\hspace{2cm}}$$

3) シリカゲルを半分の 25 g にした場合、黄色の色素(methyl yellow)と赤い色素 (oracet red G) の分離度はいくつになるでしょう。有効数字 2 桁で答えなさい。

$$R_s' = \underline{\hspace{2cm}}$$

材料・薬品・溶媒： ホウレンソウ、シリカゲル、メタノール、石油エーテル、2 - プロパンノール

器具： クロマトグラフィー用カラム 1 cm ϕ × 30cm、脱脂綿、100mL 三角フラスコ、ガラス棒、はさみ、ろ紙、ロート、水浴。

分析化学

実験2d 吸光光度法による吸収スペクトルの測定及び検量線の作成

ケトプロフェン、ベンゾフェノン、およびアセトアミノフェンの紫外吸収スペクトルを測定する。ケトプロフェンについては日局17の参考スペクトルと比較する。また、アセトアミノフェンにつき極大波長 λ_{\max} における吸光度 A を測定し検量線を作成する。

比吸光度とモル吸光係数: 吸光度 A は $k \cdot c \cdot \ell = A$ (ランバート・ベールの法則) で表される。 c は濃度、 ℓ は光路長で通常は $\ell = 1 \text{ cm}$ のセルを使用する。 c を $w/v\%$ で表したときの k を比吸光度といい、次の式で求められる。比吸光度を求めるときの濃度の数値は $w/v\%$ であるので分子量を知る必要はない。(「付録I」を参照)

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{c \times \ell}$$

一方、 c を mol/L で表したときの k をモル吸光係数 ϵ といい、次の式に数値を代入して求めることができる。

$$\epsilon = \frac{A}{c \times \ell}$$

吸光度 A は分子の数に比例するので、よく定量に利用されるが、希薄溶液で測定する必要がある。濃度が高いと、溶液中の分子数と励起状態の分子数が比例しなくなるからである。

1) ケトプロフェンの紫外吸収スペクトルの測定

ケトプロフェンのメタノール溶液(1→200000)につき、紫外吸収スペクトルを測定すると254 nm 附近に吸収の極大が現れることを確認する。また日局17の参考スペクトルと比較し、一致することを確認する。さらに、吸収極大に置ける吸光度を測定し、モル吸光係数を算出すること。

1→200000 の希釀は、1回で行うことは困難であるので2段階で行う。ケトプロフェン0.01 gを正確に量り、100 mL メスフラスコに入れメタノールで正確に100 mL にする。この液1mL をホールピペットでとり、20 mL メスフラスコに入れ、メタノールで正確に20 mL とし、この液について、紫外吸収スペクトルを測定する。

2) ベンゾフェノンの紫外吸収スペクトルの測定

ベンゾフェノンのメタノール溶液(1→200000)につき、ケトプロフェンと同様に操作する。

3) アセトアミノフェンの紫外吸収スペクトルの測定

アセトアミノフェン0.02 g を精密に量り、メタノール2 mLに溶かした後、水を加えて正確に100 mL とし、この液3 mL を正確に量り、水を加えて正確に100 mLとした液につき、紫外吸収スペクトルを測定する(244 nm に吸収極大がある)。また吸収極大に置ける吸光度を測定し、モル吸光係数を算出すること。吸光度、モル吸光係数の計算は表にし、吸収スペクトルもコピーをレポートに添付する。

No.	化合物	分子量(u)	採取量(mg)	吸光度	モル吸光係数
1	ケトプロフェン	254.28			
2	ベンゾフェノン	182.22			
3	アセトアミノフェン	151.16			

No.1についての計算例:

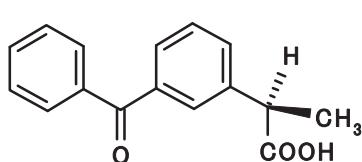
$$\text{吸光度} =$$

$$\text{モル吸光係数} =$$

4) 検量線の作成

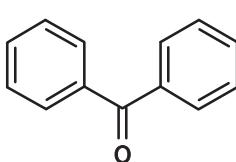
上述(3)のアセトアミノフェン 0.02 g をメタノール 2 mL および水に溶かして 100 mL とした液、1, 2, 3, 4, 及び 5 mL (メスピペット使用)をそれぞれ 50 mL のメスフラスコに取り、水を加えて正確に 50 mL とし、これらの液につき、水を対照として 244 nm における吸光度を測定する。

グラフ用紙を用い、縦軸に吸光度、横軸に濃度($\mu\text{g/mL}$)を取って検量線を作成し、直線性が成り立つことを確認せよ。



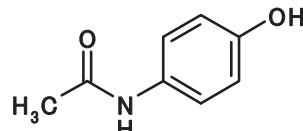
ケトプロフェン

$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3 : 254.28$



ベンゾフェノン

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O} : 182.22$



アセトアミノフェン

$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2 : 151.16$

課題2d.1 極大波長 λ_{max} 及びモル吸光係数 ϵ について構造式との関係を考察せよ。

薬品・溶媒: ケトプロフェン、アセトフェノン、アセトアミノフェン、メタノール。

器具・装置: メスフラスコ(100mL×4, 20mL×2, 50mL × 5)、ホールビペット(1mL×2, 3mL×1)、メスピペット(5 mL)、駒込ビペット、石英セル、分光光度計。

分析化学

実験2e 中和滴定／サリチル酸の定量

中和滴定法によりサリチル酸の定量を行う。



サリチル酸

C₇H₆O₃:138.12

pK_{a1} = 2.98,

pK_{a2} ≈ 13

1) 標準液の調製

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液を日局 17 に準じて調整する。水酸化ナトリウム 2.0 g を水 480 mL に溶かし (500 mL 三角フラスコ)、これに新たに製した水酸化バリウム試液¹⁾を沈殿がもはや生じなくなるまで滴下し、液をよく混ぜて密栓し、15 分間放置した後、上澄み液を傾斜してとり、次の標定を行う。保存には 500mL プラスチックボトルを用いる。

2) 標定

アミド硫酸(標準試薬)をデシケーター(減圧、シリカゲル)で約 48 時間乾燥し、その約 0.15 g を精密に量り、水 25 mL に溶かし、調製した水酸化ナトリウムで滴定し、ファクターを計算する。指示薬としてプロモチモールブルー試液²⁾ 2 滴を加える。ただし、滴定の終点は緑色を呈するときとする。滴定は 3 回以上行い、ファクターの平均値を求める。

$$0.1 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム液 } 1 \text{ mL} = 9.709 \text{ mg HOSO}_2\text{NH}_2$$

ファクター：次の式を用いて標準液のファクター *f* を求める。ファクターは規定された濃度からのずれを表す数値であり、これを求めることが標定である。

$$f = 1000 \text{ m/VMn}$$

M : 標準液の調整に用いた物質 (例えば、0.1 mol/L NaOH であれば NaOH) の 1mol に対応する標準試薬の質量(g)

m : 標準試薬の採取量(g)

V : 調製した標準液の消費量(mL)

n : 調製された標準液の規定されたモル濃度を表す数値 (この場合は 0.1)

測定値、計算結果などは、表に判り易く整理してまとめる。計算例についても付記して、レポートにコピーを貼り付けるとよい。なお、平均値 \bar{x} 、標準偏差 s 、相対標準偏差 $100s / \bar{x} (\%)$ は「付録 A」を参照して計算すること。有効桁数については「付録C」を参照しなさい。

アミド硫酸		0.1M NaOH	ファクター f			
No.	採取量(mg)	滴定値(mL)	計算値	平均値 \bar{x}	標準偏差 s	相対標準偏差
1						
2						
3						

No.1 についての計算例：

$$\text{標準偏差 } s =$$

$$\text{相対標準偏差 } 100s / \bar{x} (\%) =$$

3) サリチル酸の中和滴定

サリチル酸の 約0.5 g を精密に量り、中和エタノール³⁾ 25 mL に溶かし、フェノールフタレン試液⁴⁾ 3滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液で滴定する。液が淡赤色を呈した時が滴定の終点である。

$$0.1 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム液 } 1 \text{ mL} = 13.812 \text{ mg C}_7\text{H}_6\text{O}_3$$

3回の定量から得られた定量値(%)に関し、平均値 \bar{x} (%)、標準偏差 s (%)、相対標準偏差 $100s/\bar{x}$ (%) を算出する。実験のデータは下表にまとめ、計算例も付記する。

		定量値					
No.	採取量(mg)	滴定値(mL)	定量値(mg)	定量値(%)	平均値 \bar{x}	標準偏差 s	相対標準偏差
1							
2							
3							

0.1M 水酸化ナトリウムのファクター： $f =$

No.1 についての計算例：

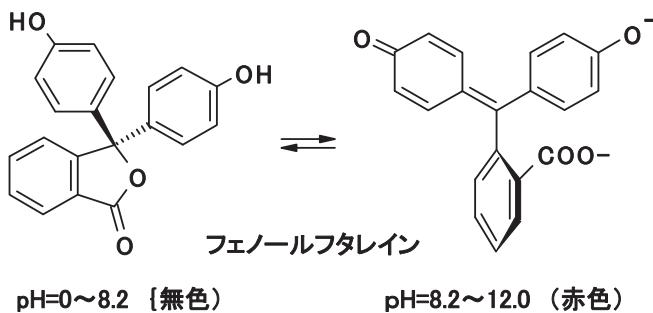
$$\text{定量値(mg)} =$$

$$\text{定量値(%)} =$$

$$\text{標準偏差 } s (\%) =$$

$$\text{相対標準偏差 } 100s/\bar{x} (\%) =$$

フェノールフタレインの当量点付近の構造： 下図に示すとおり、赤色に変化するとき共役系が伸びていることがわかります。



課題2e.1 日局17「サリチル酸」の含量規定は99.5%以上である。定量結果より適否を判定せよ。またバラツキの大きさとその原因を考察しなさい。

課題 2e.2 サリチル酸の滴定の終点付近で、 pH はフェノールフタレインの変色域を一気にジャンプして超える。フェノールフタレインが変色する時、サリチル酸の水酸基の解離度はどれほどか。サリチル酸の pK_{a1} , pK_{a2} は其々 2.98, 13.6 である。

調整試薬： 1) 水酸化バリウム試液 水酸化バリウムウハ水和物を新たに煮沸して冷却した水に飽和する。用時製する(0.25 mol/L)。日局 17 に準じて作成。

2) プロモチモールブルー試液 プロモチモールブルー0.1 g を水：エタノール(95)の混液(1:1) 100 mL に溶かし、必要ならばろ過する。

3) 中和エタノール エタノール(95)適量(この実験では約100 mL)にフェノールフタレイン試液2～3滴を加え、これに0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液を、液が淡赤色を呈するまで加える。用時製する。

4) フェノールフタレイン試液 フェノールフタレイン 1 g にエタノール(95)を 100 mL 加えて溶かす。

薬品・溶媒： サリチル酸、アミド硫酸、水酸化ナトリウム、エタノール(95)。

器具：ビューレット、コニカルビーカー(100 mL)、ビーカー(100 mL)、三角フラスコ(100 mL & 500 mL)、メスシリンダー、プラスチックボトル、秤量ビン、ガラス棒、駒込ピペット。

分析化学

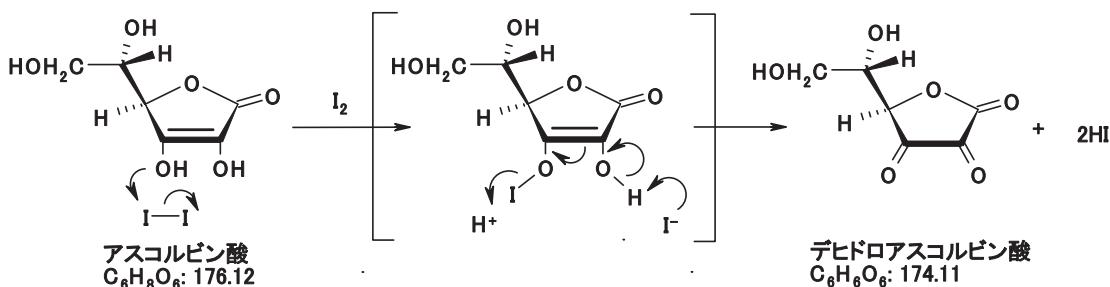
実験2f 酸化還元滴定／アスコルビン酸の定量

ヨウ素滴定法によりアスコルビン酸を定量する。

1) ヨウ素滴定

アスコルビン酸約0.2 gを精密に量り、200 mL コニカルビーカーに入れる。メタリン酸溶液(1→50)¹⁾ 50 mLを加えて溶かし、デンプン試液²⁾ 1 mLを加え、0.05 mol/L ヨウ素液で滴定する。溶液の色は無色であるが、終点では青色に着色する。

$$0.05 \text{ mol/L} \text{ ヨウ素溶液 } 1\text{mL} = 8.806 \text{ mg アスコルビン酸}$$



1molのアスコルビン酸が1molのヨウ素(I₂)で酸化されてデヒドロアスコルビン酸になる。反応は定量的に進行する。3回の定量を行い、得られた定量値(%)に関して、平均値 \bar{x} (%)、標準偏差 s (%)、相対標準偏差 $100s / \bar{x}$ (%) を算出して表にまとめ、計算例も付記する。計算に当たっては有効桁数に配慮すること。

		定量値					
No.	採取量(mg)	滴定値(mL)	定量値(mg)	定量値(%)	平均値 \bar{x}	標準偏差 s	相対標準偏差
1							
2							
3							

0.05 M ヨウ素液のファクター: $f =$

No.1についての計算例:

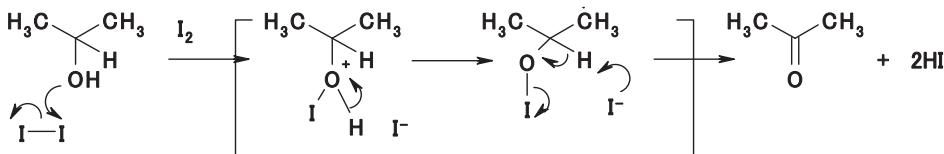
$$\text{定量値(mg)} =$$

$$\text{定量値(\%)} =$$

$$\text{標準偏差}s(\%) =$$

$$\text{相対標準偏差}100s/\bar{x}(\%) =$$

酸化剤としてのヨウ素: ヨウ素はイソプロピルアルコールをアセトンに酸化します。この反応は日局17のイソプロピルアルコールの確認試験(ハロホルム反応によるメチルケトンの検出)の一部を構成しています。アスコルビン酸ではエノール型ではなくてケト型の互変異性体のアルコールが同じ様にヨウ素酸化されると考えてもよいでしょう。

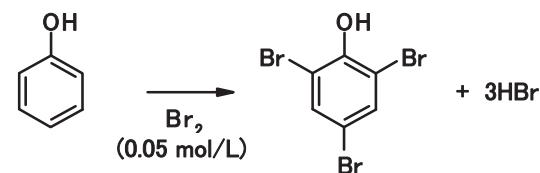


課題2f.1 日局17の「アスコルビン酸」の含量規定は99.0%以上である。定量結果より適否を判定せよ。またバラツキの大きさとその原因を考察せよ。

課題 2f.2 日局17の「フェノール」は純度試験で98%以上をであることが要求される。フェノールの純度試験は酸化還元滴定の少し複雑な例である。以下の事例について、フェノールの純度を計算せよ。

フェノール約1.5 gを精密に量り、水に溶かして精密に1000 mLとし、この液25 mLを正確に量り、正確に0.05 mol/L臭素液30 mLを加えて、室温で30分間振り混ぜて反応させる。

$$0.05 \text{ mol/L 臭素溶液 } 1 \text{ mL} = 1.569 \text{ mg フェノール}$$

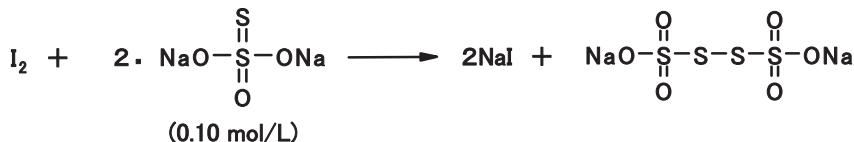


フェノール C ₆ H ₅ OH=94.11	1,3,5-トリブロモフェノール C ₆ H ₂ Br ₃ OH=330.80
---	---

次にKIを加えると、ハロゲンは電気陰性度 $I < Br < Cl < F$ が大きいほど酸化力が強いので、残存している過剰量の Br_2 は I^- を酸化し、等モルの I_2 を生成する。



最後に、生成した I_2 をデンプンを指示薬とし 0.10 mol/L チオ硫酸ナトリウム $Na_2S_2O_3$ で滴定する。



はじめに量りとったフェノールが 1.500 g であり、滴定で 0.10 mol/L チオ硫酸ナトリウム液 6.5 mL を要したとき、フェノールの純度を計算しなさい。 (ヒント : 0.05 mol/L 臭素液の消費量は $30 - 6.5 = 23.5$ mL.)

調整試薬: 1) メタリン酸溶液 アスコルビン酸は不安定で金属が触媒となって容易に変化するのでメタリン酸を添加する。メタリン酸は金属のマスキング剤として作用する。

2) デンプン試液 デンプン 1g を冷水 10mL とよくすり混ぜ、これを熱湯 200mL 中に絶えずかき混ぜながら徐々に注ぎ込み、液が半透明になるまで煮沸し、放置した後、上澄液を用いる。用時製する。

薬品: アスコルビン酸、ヨウ素液(0.05 mol/L)、

器具: ビューレット、秤量瓶、メスシリンドー、コニカルビーカー(200 mL)、ビーカー(100 mL)、駒込ピペット(2mL & 5 mL)

物理化学

実験 3a 酢酸の中和滴定曲線

酢酸の中和滴定曲線を描き、酸解離定数を決定する。また pH の計算法を学ぶ。

弱酸の強塩基による中和滴定： 中和反応を用いる滴定を中和滴定、あるいは酸塩基滴定という。酸標準液やアルカリ標準液を使用し、それぞれアルカリ性試料、酸性試料を滴定して濃度を決定するものである。一般に試料が強い酸、強い塩基で濃度が低い場合は、当量点での pH ジャンプは大きくなる。したがって指示薬の変色で当量点が判明する。一方、弱い酸、弱い塩基の場合は pH ジャンプが小さいので指示薬での判別がやや難しい。そこで、本実験では pH メーターによつて pH を測定し、滴定曲線を描いて、作図によって当量点を求め、さらに酢酸の酸解離定数を求める。

弱酸 HA は溶液中で下記のような解離平衡関係が成り立っている。



酸解離定数を K_a 、 $[\text{H}_3\text{O}^+]$ を $[\text{H}^+]$ として、

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1)$$

$$\text{両辺の対数をとれば、} -\log[\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\text{したがって、} \quad pH = pK_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (2)$$

この式により弱酸の pK_a がわかれば、ある pH のときの $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ の比が計算から求められる。また逆に、 $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ がわかれば、その溶液の pH が計算から求められる。

弱酸 HA を強塩基(たとえば NaOH)で滴定した場合、中和によって弱酸 HA が消費され A^- (生じた NaA は完全に Na^+ と A^- にイオン化される)が生じる。したがって、当量点がわかれば、当量点までの滴下量の半分のところでは、 $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ となり、この pH がわかれば、(2) 式から $pH = pK_a$ となり、弱酸 HA の pK_a の値が求められる。(弱酸—強塩基、または強酸—弱塩基の滴定曲線から弱酸または弱塩基の解離定数を求めることができる。ここでは弱酸を扱う)。

1) 酢酸の酸解離定数の測定

① 0.1 mol/L 醋酸溶液をホールピペットで 20mL とり、300 mL ピーカーに入れる。蒸留水を加え全容を 200mL にする。

② pHメーター、pHメーターの電極、マグネットスターラー、かくはん子の入ったピーカー、ビュレットを図1のようにセットする。ビュレットは少量の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で 2 回共洗いした後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を入れる。pHメーターは滴定を始める前に必ず pH調整用の標準液で校正を行う。

③ かくはん子をスターラーで回転させながら(急激に回転せるとかくはん子が躍って電極を破壊する恐れがある)、ビュレットから 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 0.5mL ずつ滴下し、pHメーターの針が落ち着くのを待ってビュレットの目盛と pHメーターの表示を小数点以下2桁まで記録する。ビュレットの最小目盛りは 0.1 mL であるが、この目盛りを目測で 10 等分し、小数点以下 2 桁まで読みとる。終点の前後 2 mL の範囲(水酸化ナトリウム溶液の滴下量に対する pH の変化が大きいところ)では滴下量を小刻み(0.1 mL ずつ)にすると、なめらかな滴定曲線が得られる。水酸化ナトリウム溶液の滴下は終点の約2倍量まで続ける。

④ 得られた滴定結果より、水酸化ナトリウム溶液の滴下量を X 軸に pH 値を Y 軸にプロットして滴定曲線を描く。実験的に得た滴定曲線と式(2)から酢酸の酸解離定数を求める。滴定曲線から終点(等量点とほぼ同じと考えられる点)を求める方法には以下のように中点法と微分法がある。

中点法による終点の決定: 三角定規2枚を使って、図2のように滴定曲線に対し等間隔に平行線を3本引く。上下の線は接線である。中央の線と滴定曲線の交点を終点とする。終点から X 軸に向かい垂線を引き X 軸との交点が、終点までに滴下した NaOH 量 (end point: EP) になる。図に示したように EP 点の半分のところ($1/2EP$)から滴定曲線に向かって横軸に直角に線を引き、滴定曲線との交点の pH 値を読む。この値が、酢酸の酸解離定数 (pK_a) に相当する値になる。

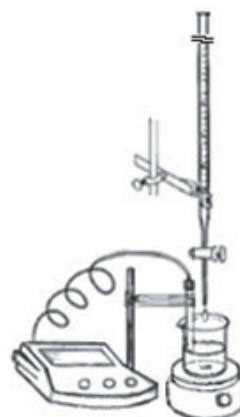


図1 pH メーターによる滴定

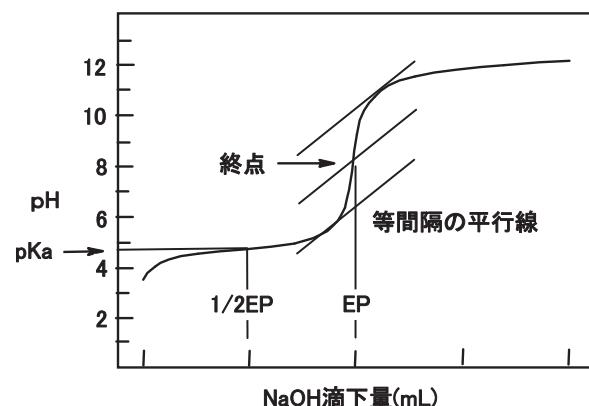


図2 中点法による終点の決定

微分法による終点の決定: 図3のように縦軸に滴定曲線の傾き($\Delta pH / \Delta V$)を、横軸に滴定液の滴下量(V mL)をプロットし、得られた曲線の極大値における滴下量を読みとる。

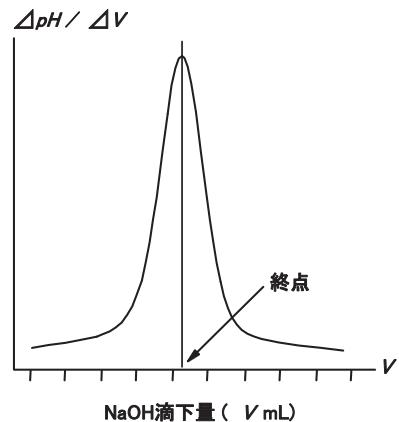


図3 微分法による終点の決定

☞ 本日の実験の終わりに、「実験 3c 酸触媒エステル化反応の平行定数の測定、1) 酸触媒エステル化」の項を参照して反応を仕込んでおくこと。

課題 3a.1 K_a の実験値および文献値($K_a=1.75 \times 10^{-5}$)それこれから、**1)** 0.0, **2)** 0.5EP, **3)** 1.0EP [mL] における pH を計算しなさい。計算方法は「付録M」の「 pH の計算」および下記の「ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式」も参考にしなさい。

ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式: 弱酸とその塩を水に溶かしたとき、それぞれのモル濃度 C_{acid} , C_{salt} が充分に大きければ、 $[HA] \approx C_{acid}$ $[A^-] \approx C_{salt}$ であるから、式(2)より次式が導かれる。

$$pH = pK_a + \log \frac{C_s}{C_a} \quad (\text{Henderson-Hasselbalch の式})$$

この式によれば、溶液の pH は、溶かした酸とその塩の濃度比の対数に依存しており、この比を変化させると任意の pH の溶液を調製できることを意味している。

薬品: 水酸化ナトリウム(0.1 mol/L)、酢酸(0.1 mol/L)

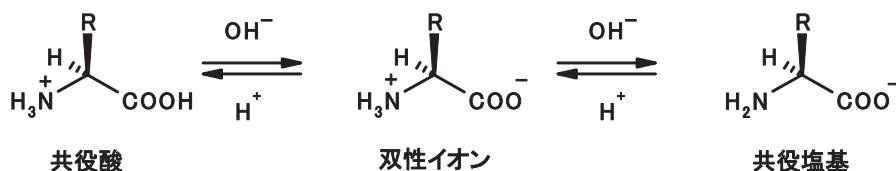
器具・装置: ビュレット(50 mL)、マグネットスターラーと攪拌子、ホールピペット(10mL)、ビーカー(300 mL)、 pH メーター、秤量皿

物理化学

実験 3b グリシンの滴定曲線

双性イオン形のグリシンの酸・塩基による滴定曲線を描き、緩衝液について学ぶ。

中性アミノ酸と緩衝作用：アミノ酸はアミノ基($-\text{NH}_2$)とカルボキシル基($-\text{COOH}$)の両者を同一分子内にもつ有機化合物である。アミノ基がカルボキシル基を結合している炭素(α -炭素)に直接結合しているものを α -アミノ酸と呼ぶ。アミノ酸は有機溶媒にはほとんど不溶である。アミノ酸の結晶は融点が高く、融解する前に分解して分解点を示す。これらの物理的性質は、アミノ酸が固体状態で双性イオン(zwitterion)を形成していることに由来する。



水溶液中での中性 α -アミノ酸の双性イオンと共役酸の平衡(1)に於いて、 K_{a1} を解離定数とする」と、



$$K_{a1} = \frac{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COOH}]} \quad (2)$$

また、双性イオンと共役塩基の平衡(3)について、平衡定数 K_{a2} を解離定数として、



$$K_{a2} = \frac{[\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-]} \quad (4)$$

式(2)(4)の両辺の常用対数をとり変形すると、

$$pH = pK_{a1} + \log \frac{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COOH}]} \quad (5)$$

$$pH = pK_{a2} + \log \frac{[\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{COO}^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-]} \quad (6)$$

式(5)に注目してみると、 $[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-]/[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COOH}] \approx 1$ のとき対数項 ≈ 0 となり $pH \approx pK_{a1}$ である。式(6)でも同様で、 $[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-]/[\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{COO}^-] \approx 1$ のとき対数項 ≈ 0 となり $pH \approx pK_{a2}$ である。このような状態にある溶液は微量の酸(H^+)や塩基(OH^-)を添加しても溶液の pH が変わりにくい。このような溶液を緩衝溶液(buffer solution)という。

グリシンでは2つの pK_a に対応して2つのpHで緩衝液を作ることができる。グリシン濃度が充分に大きければ、(5)(6)はともに Henderson-Hasselbalch の式： $pH=pK_a+\log(C_{salt}/C_{acid})$ と同じになる。この式は、溶液のpHが酸と塩基の濃度ではなく濃度比の対数に依存しておりこの比が変化しなければpHが変わらないことを示している。

緩衝液：緩衝作用は $pH = pK_a$ で最大値を示し、その近辺では良好な緩衝能を示す。従つて、あるpHの緩衝液を調製するときには、目的のpHに近い pK_a を持つ酸を選ぶ必要がある(下表を参照)。そうすれば、酸と塩基の比がほぼ1となり緩衝作用が最大となる。

よく使われる緩衝剤と pK_a (25°C)：

グリシン	$pK_{a1}=2.35$	リン酸	$pK_{a2}=7.20$
リン酸	$pK_{a1}=2.15$	HEPES	$pK_a=7.62$
フタル酸	$pK_{a1}=2.95$	トリス (Tris)	$pK_a=8.06$
クエン酸	$pK_{a1}=3.13$	ホウ酸	$pK_a=9.23$
バルビツール酸	$pK_a=4.04$	グリシン	$pK_{a2}=9.78$
コハク酸	$pK_{a1}=4.21$	炭酸	$pK_{a2}=10.33$
クエン酸	$pK_{a2}=4.76$	リン酸	$pK_{a3}=12.33$
酢酸	$pK_a=4.76$		
フタル酸	$pK_{a2}=5.41$		
コハク酸	$pK_{a2}=5.64$		
炭酸	$pK_{a1}=6.35$		
クエン酸	$pK_{a3}=6.40$		

HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane, 共役酸の pK_a の値

アミノ酸の等電点：水溶液中でのアミノ酸の構造は、pHの違いによって異なる。中性アミノ酸は低いpHにおいては、正電荷を持つ化学種($^+H_3N-CH(R)-COOH$)が主に存在し、高いpHでは、負電荷を持つ化学種($H_2N-CH(R)-COO^-$)が主に存在する。これらの正あるいは負の電荷をもつ化学種の濃度が等しくなる溶液のpHを等電点(isoelectric point)とよび pI で表わす。すなわち、 $[^+H_3N-CH(R)-COOH] = [H_2N-CH(R)-COO^-]$ のとき(2)(4)より、

$$pI = \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2}) \quad (7)$$

中性アミノ酸を水に溶かすと $pH \approx 6 = pI$ を示す。このときアミノ酸は主に双性イオン($^+H_3N-CH(R)-COO^-$)として存在し、正あるいは負の電荷をもつ化学種の濃度は等しく、平衡混合物の電荷量が全体として0となっている。

多くのアミノ酸は $pK_{a1} < 7 < pK_{a2}$ であるから、中性に近い生体内では、主として双性イオンとして存在することになる。また、 $pH = pI$ では、電気的に中性な成分が最も多くなるので、極性物質である水への溶解度は最小になり、また全体として電気泳動を示さない。

酸性アミノ酸のアスパラギン酸では、 $\alpha - \text{COOH}$ の $pK_{a1} = 1.9$ 、側鎖の酸性基($-\text{COOH}$)の $pK_{a2} = 3.7$ 、 $\alpha - \text{NH}_3^+$ の $pK_{a3} = 9.6$ である。アスパラギン酸の $\alpha - \text{NH}_3^+$ は酸性側ではほとんど解離していないので、二つのカルボン酸の半分量が解離する pH が等電点になる。すなわち、 $pI = 1/2(pK_{a1} + pK_{a2}) = 2.8$ である。

1) 水酸化ナトリウムによるグリシンの滴定

- ① 使用前に pH メーターの補正を行なう。
- ② 次に 50mL のビュレットに 1.00 mol/L NaOH 水溶液を入れてセットする。
- ③ 0.100 mol/L グリシン水溶液 ($\text{H}_3\text{N}^+ \text{CH}_2\text{COO}^-$)¹⁾ 100mL を 50mL のホールピペットを用いてとり、200mL のビーカーに入れる。この溶液中にかくはん子を入れてマグネチックスターラーに乗せ、 pH メーターをセットする。
- ④ まず、最初に滴定前の溶液の pH を読んだ後、ビュレットから 1.00 mol/L NaOH 水溶液を 1.00mL までは 0.20mL ずつ加え、その後は 0.50mL ずつ加えて、合計 20 mL を加える。1.00 mol/L NaOH 水溶液を加えたときの各 pH を記録する。ビュレットのは最小目盛の 1/10 すなわち小数点以下 2 術まで読み取り、 pH メーターのデジタル表示は丸めて小数点以下 2 術まで読み取る。

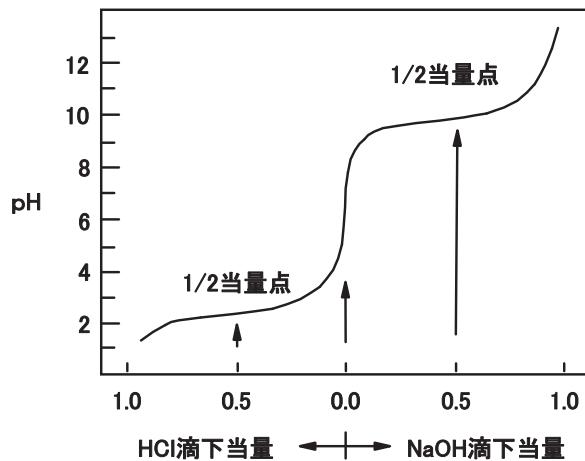


図1 グリシンの滴定曲線

2) 塩酸によるグリシンの滴定

⑤ 1.00 mol/L NaOH 水溶液を入れたビュレットは水道水で 2 回、次に蒸留水で一回洗った後、少量の 1.00mol/L HC1 水溶液で内面をよく共洗いした後に、1.00mol/L HC1 水溶液を入れて次の実験に備える。

⑥ 新たに 0.100 mol/L グリシン水溶液 100mL をホールピペット(50mL)を用いてビーカー(200mL)にとり、前述と同様に、滴定前の pH を記録した後、ビュレットから 1.00 mol/L HC1 水溶液を 1.00mL までは 0.20mL ずつ加え、その後は 0.50mL ずつ加えて、合計 20mL を加える。1.00 mol/L HC1 水溶液を加えたときの各 pH を記録する。ビュレットのは最小目盛の 1/10 すなわち小数点以下 2 衔まで、pH メーターの表示も小数点以下 2 衔まで読む。

3) グリシンの滴定曲線の作成

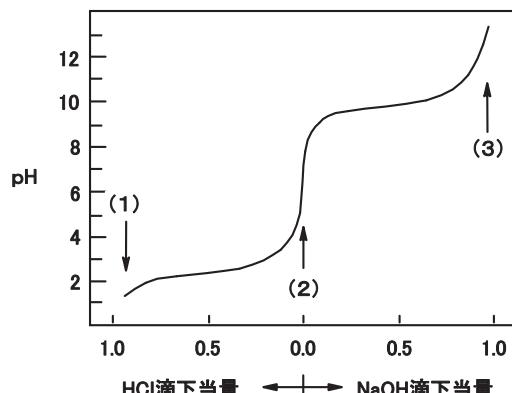
⑦ 滴定結果より、構軸の 0 点より右向きに NaOH の滴下量(mL)、左向きに HC1 の滴下量(mL)、縦軸に pH をプロットして、グリシンの滴定曲線のグラフを作成する。グリシンを酸及び塩基で滴定し、pH メーターの読みをプロットすることによって得られる滴定曲線からグリシンのカルボキシル基とアンモニウム基の pK_{a1} と pK_{a2} 、と pI 値を決定する。

課題 3b.1 グリシンのカルボキシル基の pK_{a1} (2.35)を、酢酸の pK_a (4.76)、ニトロ酢酸の pK_a (1.46)、メキシ酢酸の pK_a (3.6) と比べて置換基の電子効果の点から論じなさい。

課題 3b.2 実験で得た滴定曲線からグリシンの pK_{a1} , pK_{a2} , および pI を求め、文献値と比較しなさい。

課題 3b.3 水溶液中でグリシンがとっている主なイオン構造式を滴定曲線(右図)の(1)(2)(3)に対応させて描きなさい。

課題 3b.4 アスパラギン酸は酸性アミノ酸である。アスパラギン酸の $\alpha - \text{COOH}$ の $pK_a = 1.9$, $\alpha - \text{NH}_3^+$ の $pK_a = 9.6$, 側鎖の酸性基($-\text{COOH}$)の $pK_a = 3.7$, 等電点 $pI = 2.8$ である。アスパラギン酸は $pH = 1, 3, 7, 12$ の各水溶液中ではどのような構造をとるか。



調整試薬: 1) 0.100 mol/L グリシン水溶液 グリシン($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$:MW.75.07) 1.8768 g を正確に秤量皿に量りとる。このとき天秤からグリシンを出し入れは静かに行なう。また、一度びんから取り出したグリシンはもとのビンには戻さない。この量りとったグリシンを 250 mL のメスフラスコに入れ、八分目程度の蒸留水でグリシンを完全に溶かした後、標線まで蒸留水を満たし、よく振り混ぜる。

薬品: 1.0 mol/L NaOH 溶液、 1.0 mol/L HCl 溶液

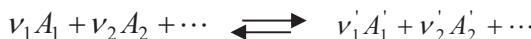
器具・装置: ホールピペット(50mL)、 ビュレット(50mL)、攪拌子、マグネットックスターラー、*pH*メーター、ビーカー(200mL)

物理化学

実験 3c 酸触媒エステル化反応の平衡定数の測定

酸触媒(塩酸、硫酸など)の存在下、アルコールとカルボン酸が脱水縮合してエステルを合成する酸触媒エステル化反応は、フィッシャーのエステル化とも呼ばれます。本実験では、この平衡反応を通して、質量作用の法則、平衡定数、ファントホップの式を学ぶ。

化学平衡: 気体の間に起こる反応や溶液の中で起こる反応のような均一系の可逆反応を



とすると、系の反各成分 $A_1, A_2, \dots, A'_1, A'_2 \dots$ の濃度をそれぞれ $C_1, C_2, \dots, C'_1, C'_2 \dots$ とすれば、この反応が平衡状態達したとき、これらの間に次の関係式がなりたつ

$$\frac{(C'_1)^{v'_1} (C'_2)^{v'_2} \cdots}{(C_1)^{v_1} (C_2)^{v_2} \cdots} = K$$

この関係を質量作用の法則(law of mass action)という。 K は平衡定数(equilibrium constant)で温度に依存するが濃度には無関係な定数である。

酢酸 a mol に エタノール b mol と 水 c mol を混ぜて平衡状態に達したとき、酢酸が x mol あるとすれば、平衡状態にある各物質のモル濃度は、系の全体積を V [L] とすると次のようになる。



$$x/V \quad \{b - (a - x)\}/V \quad (a - x)/V \quad \{c + (a - x)\}/V$$

したがって、平衡定数はつきのようになる。

$$K = \frac{(a - x)\{c + (a - x)\}}{x\{b - (a - x)\}}$$

1) 酸触媒エステル化

① 反応容器として使用するネジロつき試験管に、酢酸、エタノール(99%)、3.0 M 塩酸 1) の順番で、表に指定する量をホールピペットで量り入れる。

② 試験管にしっかりとキャップをして静かによく混ぜる。

③ 密栓して室温に 1 週間放置する。

容器番号	酢酸	エタノール	塩酸
#1	5 mL	1 mL	1 mL
#2	5 mL	2 mL	1 mL
#3	5 mL	5 mL	1 mL
比重	1.049	0.789	1.05

2) 残存している酢酸の滴定

1週間後、化学平衡状態に達した#1~#3の反応混合物について、残存している酢酸を滴定する。水酸化ナトリウム溶液(1.0 M)で滴定することが可能なのは、酸性～中性では酢酸エチルの加水分解速度は極めて遅くて無視出来るからです。

- ④ 反応容器中の溶液を滴定に使う 300mL ビーカーの中に開ける。
- ⑤ 容器に残った溶液を蒸留水でビーカーの中に洗いこんで全量を約 100 mL にする。
- ⑥ フェノールフタレン試液²⁾ 3 滴を加え、水酸化ナトリウム溶液(1.0 M)で滴定する。
- ⑦ 滴定結果から平衡定数 K をもとめる。触媒の 3.0 M HCl の 1 mL 分を差し引くこと。

ファントホップの式: 热力学の基本式 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ および $\Delta G^\circ = -RT\ln K$ より、 ΔG° を消去すると、 $-RT\ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ である。

$$\therefore \ln K = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

ここで、右肩記号「[°]」は 1 気圧、25°C の標準状態をしめす。

反応熱 ΔH° は圧力によりあまり変化しないので $\Delta H^\circ = \Delta H$ としてよいので、 $\Delta S^\circ / R = C$ とおけば、ファントホップの式が得られる。

$$\therefore \ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + C \quad \dots \text{ (van't Hoff の式)}$$

課題 3c.1 実験 3c の平衡定数はあまり温度に関係しない理由を説明しなさい。

課題 3c.2 酢酸エチルと水を混ぜたときも平衡定数は変化しない。この事実(質量作用の法則)を熱力学的に説明しなさい。(ヒント: 上記のファントホップの式を参照すること。)

課題 3c.3 フィッシャーのエステル化反応: $\text{AcOH} + \text{EtOH} = \text{AcOEt} + \text{H}_2\text{O}$ について、標準生成エンタルピー($\Delta_f H^\circ$)および標準エントロピー(S°)のデータ(下表)をつかって、以下の1)~7)に答えなさい。右肩記号「 $^\circ$ 」は1気圧、25°Cの標準状態をしめす。

物質	状態	$\Delta_f H^\circ$	S°
		kJ mol^{-1}	$\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
H ₂ O	Liq.	-285.83	69.91
EtOH	Liq.	-277.0	160.1
AcOH	Liq.	-485.6	157.2
AcOEt	Liq.	-479.3	259.4

化学便覧より抜粋

- 1) 標準エンタルピー変化 ΔH° を求めなさい。
- 2) この反応は発熱反応か、吸熱反応か。
- 3) 温度を上昇させるとこの反応の平衡はどちらに動くか。
(ヒント: ファント・ホップの式、又は ル・シャトリエの原理による。)
- 4) 標準エントロピー変化 ΔS° を求めなさい。
- 5) ギブス標準自由エネルギー変化 ΔG° を求めなさい。
(ヒント: $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$)
- 6) 平衡状態にあるときのギブス自由エネルギー変化 ΔG はいくらか。
(ヒント: $\Delta G = \Delta G^\circ + RT\ln K$)
- 7) 平衡定数 K を求めなさい。
(ヒント: $\Delta G^\circ = -RT\ln K$)

調整試薬: 1) 塩酸試液, 3 mol/L 塩酸 270 mL に水を加えて 1000 mL とする。

2) フェノールフタレン試液 フェノールフタレン 1g にエタノール(95)を 100mL 加えて溶かす。

薬品: 酢酸、エタノール(99)、水酸化ナトリウム(1.0M)。

器具: ビュレット、ホールピペット、ビーカー(300 mL)、ねじ口試験管。

— · — · — · — · — · — · — · —

物理化学

実験 3d 酢酸エチルのアルカリ加水分解反応速度の測定

二次反応の速度定数を測定して反応の活性化エネルギーを決定する。アルカリ加水分解の反応機構、反応速度定数、活性化エネルギー、アレニウスの式などについて理解を深める。(データ処理の計算にはパソコンないし関数電卓が必要なので持参すること。)

2次反応速度の解析: 液相中の反応物 A と B の濃度を $[A]$, $[B]$ 、生成物 C と D の濃度を $[C]$, $[D]$ で表わせば、反応 $A + B \rightarrow C + D$ の進行速度: $v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = \frac{d[D]}{dt}$

が、 $v = k[A][B]$ と表せる場合、この反応は二次反応であるといふ。

比例定数 k はこの反応の与えられた温度における反応速度定数である。表1に示すように、A と B の初期濃度を a , b 、一定時間 t 後の濃度を $a-x$, $b-x$ とすると、次のようにして微分方程式①が得られる。

$$\begin{aligned} v &= -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] \\ \therefore \frac{d(a-x)}{dt} &= k(a-x)(b-x) \\ \therefore -\frac{da-dx}{dt} &= k(a-x)(b-x) \\ \therefore \frac{dx}{dt} &= k(a-x)(b-x) \quad (\because da=0) \quad \cdots \quad \textcircled{1} \end{aligned}$$

時間	0 [s]	t [s]
成分 A	a [mol L ⁻¹]	$a-x$ [mol L ⁻¹]
成分 B	b [mol L ⁻¹]	$b-x$ [mol L ⁻¹]

表 1

変数を分離して、

$$\frac{dx}{(a-x)(b-x)} = k \cdot dt$$

左辺を部分分数に分解し、

$$\frac{1}{b-a} \left(\frac{1}{a-x} - \frac{1}{b-x} \right) \cdot dx = k \cdot dt$$

両辺を積分すると、

$$\begin{aligned} \frac{1}{b-a} \int \left(\frac{1}{a-x} - \frac{1}{b-x} \right) \cdot dx &= k \int dt \\ \therefore \frac{1}{b-a} \left(\int \frac{dx}{a-x} - \int \frac{dx}{b-x} \right) &= k \int dt \end{aligned}$$

$$\therefore \frac{1}{b-a}(-\ln(a-x) + \ln(b-x)) = k \cdot t + C \quad \dots \quad ②$$

②の右辺の積分定数 C は、境界条件($t = 0$ のとき $x = 0$)より求めることができて、

$$\frac{1}{b-a}(-\ln a + \ln b) = C \quad \therefore C = \frac{1}{a-b} \ln \frac{a}{b}$$

$$\text{②式へ代入して、 } \frac{1}{b-a}(-\ln(a-x) + \ln(b-x)) = k \cdot t + \frac{1}{a-b} \ln \frac{a}{b}$$

$$\therefore \frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} = k \cdot t \quad \dots \quad ③$$

ここで、反応開始時の A 成分の濃度が B 成分に比べ過剰な場合、 $t=\infty$ における成分 A の濃度を a_∞ とすれば、 $b = a - a_\infty$ なので(表2を参照)、これを③に代入して b を消去すると、

$$\therefore \frac{1}{a_\infty} \ln \frac{(a-a_\infty)(a-x)}{a(a-a_\infty-x)} = k \cdot t \quad \dots \quad ③'$$

時間	0	t	∞
成分 A	a	$a-x$	a_∞
成分 B	$b = a - a_\infty$	$a - a_\infty - x$	0
成分 C	0	x	$b = a - a_\infty$
成分 D	0	x	$b = a - a_\infty$

表 2

反応速度定数をもとめる： 二次反応速度定数 k は図 1 に示すように ③ あるいは③' 式の左辺を縦軸に、時間 t を横軸に目盛れば直線の傾きとして求められる。

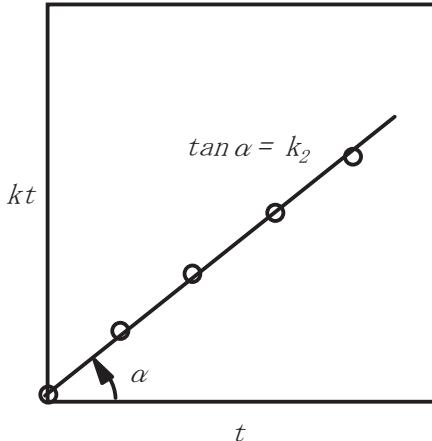


図 1 二次反応速度定数の決定

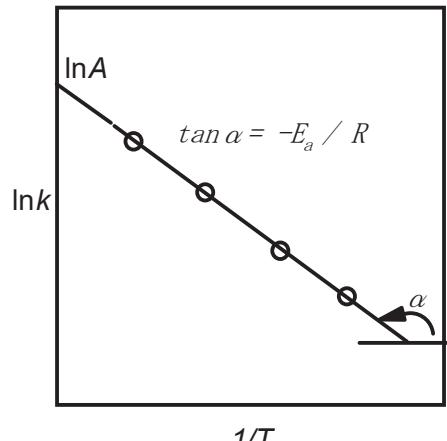


図 2 速度定数と温度の関係

アレニウスの式とアレニウスプロット：アレニウス(Arrhenius)の式(④または④')は反応速度定数の温度依存性を表している。

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \dots \quad ④ \quad \text{又は} \quad \ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad \dots \quad ④'$$

ここで、

- k 反応速度定数
- E_a 活活性エネルギー「反応を起こすための必要最小限のエネルギー」
- A 「活性分子の反応確率」であって、反応速度定数 k と同じ単位を持つ。
- $\exp(-E_a/RT)$ 「活性分子($E \geq E_a$)の割合」を表す。

式④'によれば、いろいろな温度において決定された速度定数の対数を縦軸にし、測定温度(絶対温度)の逆数を横軸にプロットする(アレニウスプロット、図 2)と直線になる。その直線の傾き($\tan \alpha$)から気体定数 $R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ の値を用いれば反応の活性エネルギー E_a が求められ、縦軸を切る点(y 切片)から頻度因子 A が求められる。ただし、アレニウス式は十分に広い温度範囲にわたって必ずしも成り立つとは限らないので、 E_a の値にはその決定を行った温度範囲を書き添えることが望ましい。

1) 各温度における反応速度の測定

酢酸エチルのアルカリ加水分解反応: $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 + \text{NaOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COONa} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ について、水酸イオン濃度 $[\text{OH}^-]$ の時間的変化から二次反応速度定数が決定できる。すなわち、各時刻に一定量の反応液を取出し、これを過剰の塩酸の中に入れて加水分解反応を「止」めてから、逆滴定で反応液中に含まれていた水酸化ナトリウムの量をもとめる。この実験では、酸によるエステルの加水分解がアルカリの場合に比べるとはるかに遅いことを利用している。即ち、アルカリ加水分解が進行している反応系を過剰の塩酸の中に投入して反応を「止」めるのである。そうはいっても、加水分解が完全に停止する訳ではないので逆滴定は手際よくおこなうこと。以下に実際の実験手順を示す。

500 mL ガラスビンの一方に、メスシリンダーを用いて 200mL の蒸留水とメスピペットを用いて 1.20 mL の酢酸エチル($d=0.90$, MW=88.11)を入れてよく振って溶かす、また他方には 0.1 M の水酸化ナトリウム溶液 200 mL を入れる。2 本のガラスビンは浮き上がって倒れないようにおもりをのせ恒温槽中に立てて置く。ガラスビンは反応液を取り出す時も恒温槽に入れておく。測定を 0°C , 10°C , 20°C , 30°C において各温度について 2~3 班づつで分担して行う。分担については教員の指示に従うこと。一方、200 mL のビーカーに 0.1 M の塩酸 25.0 mL を正確にホールピペットでとり、これを 6 個恒温槽のそばに並べておく。

20 分以上経過して酢酸エチル溶液および水酸化ナトリウム溶液の温度が恒温槽の温度に等しくなったならば、酢酸エチル溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を開始する。これより以降、時刻を正確に時・分・秒まで記録する。約 3 分後に反応液より 25.0mL をホールピペットで吸い出し、塩酸の入っているビーカーに注ぎ込む。そしてピペットの中の液が約半分流れ出たときの時刻を測定開始時、 $t=0$ とする。ビーカー中の残りの塩酸の量を 0.1M 水酸化ナトリウムで滴定し、 $t=0$ における反応液中の水酸化ナトリウムの濃度 $a-x=a$ (このときは $t=0$ なので $x=0$) を算出する。このようにして第 1 回目の測定が終わったならば、以後、 0°C , 10°C , 20°C の班は約 5 分ごとに、 30°C の班は約 3 分毎に反応液 25.0mL をとりだして上記と同様に、水酸化ナトリウム濃度 $a-x$ をもとめる。5 回の測定後、残った溶液の入ったガラスビンはゆるくキャップをして 70°C の水浴中で 45 分以上加熱する。こうするとエステルは完全に加水分解されるので、室温に戻してから残存する水酸化ナトリウム濃度を求め、これを a_∞ とする。

2) 反応速度定数とアレニウスプロット

はじめに、各温度の反応速度定数 k を求めます。次ページの計算表の空欄を埋めていって kt 、即ち式③'の左辺を算出するのが、間違いも少なく能率的です。 kt を求めたら、時間 t を横軸に、 kt を縦軸にプロットすると直線が得られる。反応速度定数 k はその直線の傾き k として求めることができます。濃度の単位には M(=mol/L)、時間の単位には sec(秒)を選ぶのがふつうです。(図1参照)。

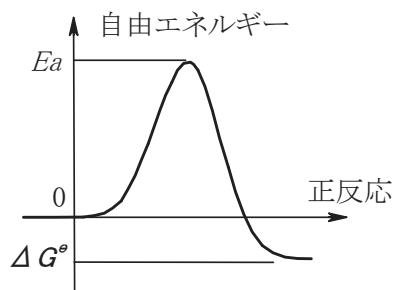
次に、各班が異なる温度において求めた k の値を持ち寄ってアレニウスプロットを描きます。使用するデータは教員の指示に従うこと。測定温度(絶対温度) T の逆数($1/T$)を横軸に、 k の自然対数($\ln k$)を縦軸にプロットする。直線の傾きと縦軸切片から、それぞれ活性化エネルギー E_a と頻度因子 A を求めます。(図2参照)。

酢酸エチルの酸加水分解反応速度: 酢酸エチルのアルカリ加水分解は2次反応で反応速度は $v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$ ($A, B = AcOEt, OH^-$) であるのに対し、酸加水分解は3次反応で、反応速度は $v = -\frac{d[A]}{dt} = k[H^+][A][B]$ ($A, B = AcOEt, H_2O$) です。しかしながら、この式で触媒 H^+ と溶媒 H_2O に濃度変化は無いとして、 $k[H^+][H_2O] = k'$ とおけば1次反応として取り扱えます。このような反応を偽1次反応と呼びます。酢酸エチルの酸加水分解反応の偽1次反応定数 k' は継続的に反応液を一部とて水で希釈して反応を「止」め、水酸化ナトリウム溶液で生成する酢酸を滴定(実験3c)すれば実験的に求められます。

課題 3d.1 酢酸エチルの酸加水分解反応について、成分 A を酢酸エチル、成分 B を溶媒の水と考え、偽1次反応定数を k' ($=k[H^+][H_2O]$) としたとき、①に対応する微分方程式を作り、そこから③に対応する偽1次反応速度式を導きなさい。

アレニウスの式からファントホップの式を導く： 平衡反応の正と逆方向の速度定数、頻度因子がそれぞれ k_f, kb, Af, Ab , エネルギー差が $\Delta G^\circ (= \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ)$ のとき、次のようにしてアレニウスの式からファントホップの式⑤が導かれる。即ち、図より正方向（左から右）の反応と逆方向（右から左）の反応の速度定数 k_f, kb は、

$$k_f = A_f e^{\frac{-Ea}{RT}}, \quad k_b = A_b e^{\frac{-(Ea-\Delta G^\circ)}{RT}}$$



と表すことができる。ここで、右肩記号「 $^\circ$ 」は 1 気圧、25°C の標準状態をしめす。反応熱 ΔH° は圧力によりあまり変化しないので $\Delta H^\circ = \Delta H$ として、

$$K = \frac{k_f}{k_b} = \frac{A_f e^{\frac{-Ea}{RT}}}{A_b e^{\frac{-(Ea+\Delta G^\circ)}{RT}}} = \frac{A_f}{A_b} e^{\frac{-(\Delta H^\circ - T\Delta S^\circ)}{RT}} \quad \therefore \quad \ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + C \quad \dots \quad ⑤$$

ファントホップの式⑤は平衡定数の温度変化を表す。

課題 3d.2 ファントホップの式⑤を使って次の問い合わせに答えなさい。

$N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3$ なる反応に対する平衡定数は 400°C で $K_p = 1.64 \times 10^{-4} \text{ atm}^{-2}$, 500°C で $K_p = 0.144 \times 10^{-4} \text{ atm}^{-2}$ である。この温度範囲における NH_3 1 モルの生成熱を計算せよ。（ヒント： ファントホップの式⑤に 400°C, 500°C のときの K_p の値を代入して辺々を引く。計算される ΔH は NH_3 2 モルに対応することに注意せよ）

アレニウスの式からクラウジウスークラペイロンの式を導く： 液相と気相が平衡にある場合を考える。アレニウスの式において、活性化エネルギー E_a は「反応を起こすための必要最小限のエネルギー」であり、指数関数項 $\exp(-E_a/RT)$ は「活性分子 ($E \geq E_a$) の割合」を表すので、 E_a が「蒸発に要するエネルギー」すなわち「蒸発熱 ΔH 」のとき、 $\exp(-E_a/RT)$ は「蒸気分子の割合」に対応する。従って、 T_1, T_2 での蒸気圧を p_1, p_2 とすれば、

$$\frac{p_2}{p_1} = \frac{e^{\frac{-\Delta H}{RT_2}}}{e^{\frac{-\Delta H}{RT_1}}} = e^{\frac{-\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right)} \quad \therefore \quad \ln \frac{p_2}{p_1} = \frac{-\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad \dots \quad ⑥$$

式⑥は、液相と気相(例えば水と水蒸気)の平衡に関するクラウジウスークラペイロンの式である。

課題 3d.3 クラウジウスークラペイロンの式⑥を使って、つぎの間に答えなさい。

- 1) あなたは今、エベレスト(海拔 8848m)の頂上直下の最終キャンプ地で、お湯を沸かしています。気圧計は 40.0 kPa を示しています。水は何度で沸騰しますか。水の蒸発熱は $\Delta H=44.0 \text{ kJmol}^{-1}$ 、気体定数は $R=8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ です。(ヒント：式⑥に $\Delta H, R, p_1 = 101.3 \text{ kPa}, p_2 = 40.0 \text{ kPa}, T_1 = 373 \text{ K}$ を代入し、 T_2 を計算する。)
- 2) 手元の即席ラーメンは沸騰水で調理します。即席ラーメンの“活性化エネルギー”が 70.0 kJmol^{-1} であるとして、最終キャンプ地では、 $p_1 = 101.3 \text{ kPa}$ の地上を比べて、“反応速度定数”は何倍になるか。(ヒント：アレニウスの式④に E_a, R, T_1, T_2 の数値を代入して比をとる。)
- 3) 即席ラーメンのレシピに「3 分間沸騰させる」とあります。“反応速度定数”的比がそのまま調理時間に反映するならば、何分間煮れば食べ頃になるか。

アレニウスの式、ファントホップの式、クラウジウスークラペイロンの式は同形に表現できる：アレニウスの式④' は $\ln p = (-\Delta H/RT) + C$ で、ファントホップの式⑤と同形である。また、式⑥で $T_1 = 373 \text{ K}, p_1 = 1 \text{ atm}$, である場合には、 T_2, p_2 をそれぞれ T, p に書きかえれば、クラウジウスークラペイロンの式⑥も $\ln p = (-\Delta H/RT) + C$ となることがわかる。

調整試薬： フェノールフタレン試液 フェノールフタレン1gにエタノール(95)を 100mL 加えて溶かす。

薬品・溶媒： 0.1M 塩酸、0.1M 水酸化ナトリウム、酢酸エチル。

器具・装置： ガラスビン(500 mL×2)、ビーカー(200 mL×6)、ビュレット、ホールピペット(25 mL)、恒温槽(温度の変動±0.1°C)。

NaOH(成分A)		AcOEt(成分B)	
初期濃度	最終濃度	初期濃度	最終濃度
$a [M]$	$a_\infty [M]$	$b = a - a_\infty [M]$	$b_\infty [M]$
			0

時間 t [sec] における中和に必要な 0.1M NaOH の容量 y [ml] から $[\text{OH}^-]$ および kt を計算する。					
t [sec]	y [ml] of 0.1M NaOH	$[\text{OH}^-] = (a-x) [M]$	$(a - a_{\infty})(a - x)$	$a (a - a_{\infty} - x)$	$\frac{(a - a_{\infty})(a - x)}{a(a - a_{\infty} - x)}$
0	a				$\frac{1}{a_{\infty}} \ln \frac{(a - a_{\infty})(a - x)}{a(a - a_{\infty} - x)} [M]^{-1}$
∞	a_{∞}				-

生薬学・天然物化学

実験 4a 日本薬局方収載生薬の化学反応による確認試験

日局 17 記載の方法に従って化学反応により生薬を確認(≒鑑定)する。呈色試薬、溶媒などは共用実験台上に準備してある。生薬は多種多様な成分を含む天然物であり、有効成分が特定されていないことも多い。確認試験も特定成分に特異的というより一定の部分構造に共通な反応や、生薬の有効成分以外に基づくものもある。

1) オウゴン末／塩化第二鉄反応

本品 0.5 g を 50 mL ナス型フラスコに入れ、ジエチルエーテル 20 mL を加えて、還流冷却器を付けて水浴上で 5 分間穩やかに煮沸し、冷後、ろ過する。ろ液を蒸発して得た残留物をエタノール(95) 10 mL に溶かし、その 3 mL に希塩化鉄(III)試液¹⁾ 1~2 滴を加えるとき、液は灰緑色を呈し、後に紫褐色に変わる。

2) オウレン末／過酸化水素－塩酸による呈色反応

本品 0.5 g を試験管に入れ、水 10 mL を加えて、時々振り混ぜながら 10 分間放置した後、ろ過する。ろ液 2~3 滴に塩酸²⁾ 1 mL を加え、過酸化水素試液³⁾ 1~2 滴を加えて振り混ぜるとき、液は赤紫色を呈する。

3) ケツメイシ／アルカリによるアントラキノンの呈色

デシケーター(シリカゲル)で 48 時間乾燥した本品の粉末 0.1 g をスライドガラス上にとり、内径、高さ各 10 mm のガラスリングをのせ、水で潤したろ紙でふたをし、徐々に加熱する。ろ紙の上面が黄色を呈したとき、ろ紙をとり、昇華物の付着する面に水酸化カリウム試液⁴⁾ 1 滴を加えるとき、赤色を呈する。

4) ゴシュユ／ドラーゲンドルフ試薬、エールリッヒ試薬による呈色反応

本品の粉末 1.0 g を試験管に入れ、メタノール 20 mL に加えて、水浴上で 5 分間加熱し、冷後、ろ過する(100 mL ナスフラスコに受ける)。ろ液を蒸発乾固し(ロータリーエバポレータを使う)、残留物に希酢酸⁵⁾ 3 mL を加え、水浴上で 2 分間加温し、冷後、ろ過する。ろ液を試料溶液とし、次の試験を行う。

(1) 試料溶液 1 滴をろ紙上に滴下し、風乾した後、噴霧用ドラーゲンドルフ試液⁶⁾を噴霧して放置するとき、黄赤色を呈する。

(2) 試料溶液 0.2 mL に希酢酸⁵⁾ 0.8 mL を加えた液に 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液⁷⁾ 2 mL を穩やかに加え、水浴中で加温するとき、境界面に紫褐色の輪帯を生じる。

5) チンピ／フラボノイドのマグネシウム－塩酸反応

本品の粉末 0.5 g にメタノール 10 mL を加え、水浴上で 2 分間加温した後、ろ過する。ろ液 5mL にリボン状のマグネシウム⁸⁾ 0.1 g 及び塩酸¹⁾ 1 mL を加えて放置するとき、液は赤紫色を呈する。

課題 4a.1 生薬の確認試験 1)~5)の 6 つの反応は、そらぞれ直接的にはどのような化合物を検出しているのか名称と構造を調べなさい。(ヒント:名称は日局 17 解説書。)

調整試薬: 1) 塩化鉄(III) 試液, 希 塩化鉄(III)試薬 2 mL に水を加えて 100 mL とする。用時製する。(塩化鉄(III) 試液 塩化鉄(III)六水和物 9 g を水に溶かし, 100 mL とする(0.33 mol/L))

2) 塩酸 HCl [K 8180, 特級] (いわゆる特級濃塩酸(35~37%))

3) 過酸化水素試液 過酸化水素(30) 1 容量に水 9 容量を加える。用時製する(3%)。(過酸化水素(30) H₂O₂ [K 8230, 過酸化水素, 特級, 濃度 30.0~35.5%])

4) 水酸化カリウム試液 水酸化カリウム 6.5 g を水に溶かし、100 mL とする(1 mol/L)。ポリエチレン瓶に保存する。

5) 酢酸、希 醋酸(100) 6 g に水を加えて 100mL とする(1 mol/L)。

6) TLC 噴霧用ドラーゲンドルフ試薬 塩基性硝酸ビスマス(1 g)を濃塩酸(2 mL)に溶かし、ヨウ化カリウム(3 g)を水(3 mL)に溶かした溶液と、70%酢酸(45 mL)を加える(非日局処方)。BiI₄⁻がアミノ基などと錯化合物を形成して呈色する。

7) 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド 10 g を硫酸 90 mL および水 10 mL の冷混液に溶かす。用時製する。

8) リボン状のマグネシウム …表面を紙やすりなどできれいにしてから使う。

薬品・溶媒: 生薬各種、ジエチルエーテル、エタノール、メタノール。

器具・装置: ナス型フラスコ(50mL)、還流冷却器、水浴、スライドグラス、ガラスリング、試験管、ロート、ろ紙、駒込ピペット

生薬学・天然物化学

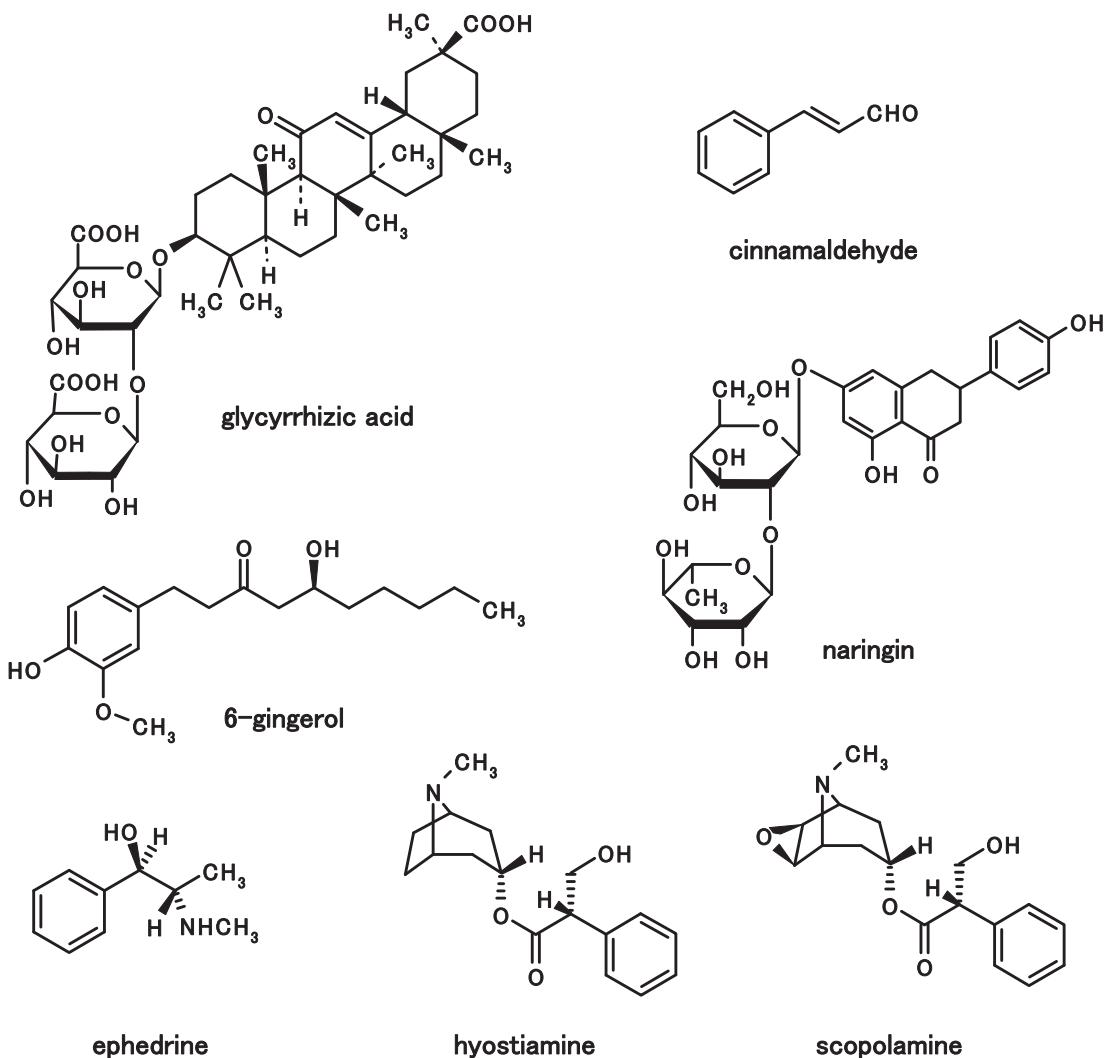
実験 4b 日本薬局方収載生薬の TLC による確認試験

日局 17 記載の方法に従って TLC による生薬の確認試験を行い、TLC のスポットを含有成分に関連付ける。含有成分の標準溶液、展開溶媒、呈色試薬などは共用実験台上に準備されているものを使用すること。

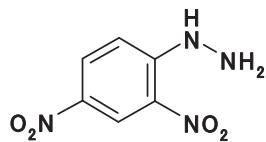
薄層板は $10 \times 5\text{cm}$ のものを用いる。展開容器の 10mm の深さまで展開溶媒を入れる。スポットは下から 20mm の位置(溶媒の上端から 10mm)に、 $2\sim6\text{mm}$ の円形に $5\mu\text{L}$ キャピラリを用いてスポットする。スポットとスポットの間隔は 10mm 以上とする。約 10cm 展開した後、薄層板を展開容器から取り出し直ちに、溶媒の先端に鉛筆で印をつけてから乾燥させる。スポットを検出したら、Rf 値および濃淡を比較する。

実験 4b で取り上げた確認試験の検出化合物と呈色試薬の構造を以下に示す。

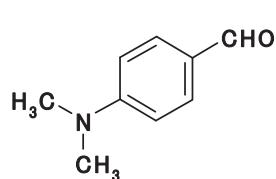
検出化合物:



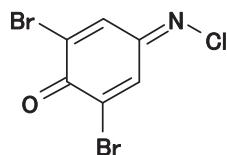
呈色試薬:



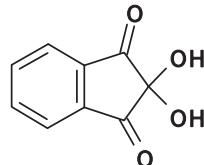
2,4-dinitrophenylhydrazine



4-dimethylaminobenzaldehyde
(Ehrlich reagent)



2,6-dibromo-N-chloro-1,4-benzoquinone monoimine
(BQC reagent)



nynhydrin

1) カンゾウ末／紫外線による glycyrrhizinic acid の検出

本品 2 g にエタノール (95) / 水混液 (7 : 3) 10 mL を加え、水浴上で 5 分間振り混ぜながら加熱し、冷後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準溶液が用意されている。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μ L ずつを蛍光剤入り薄層板にスポットする。次に 1-ブタノール / 水 / 酢酸 (100) 混液 (7 : 2 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た暗紫色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

2) ケイヒ末／紫外線、及び 2,4-DNPH 試薬による cinnamaldehyde の検出

本品 2.0 g にジエチルエーテル 10 mL を加え、3 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 10 μ L を蛍光剤入り薄層板にスポットする。次にヘキサン / 酢酸エチル 混液 (2 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、 R_f 値 0.4 付近に紫色のスポットを認める。このスポットは、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液¹⁾ を均等に噴霧するとき、黄だいだい色を呈する。

3) ショウキョウ末／エールリッヒ試薬による 6-gingerol の検出

本品 2 g にジエチルエーテル 5 mL を加え (試験管), 10 分間振り混ぜた後, ろ過し, ろ液を試料溶液とする. 別に [6]-ギングロール標準溶液が準備されている. これらの液につき, 薄層クロマトグラフィーにより試験を行う. 試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄層板にスポットする. 次に酢酸エチル／ヘキサン混液 (1:1)を展開溶媒として約 10 cm 展開した後, 薄層板を風乾する. これに噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液²⁾を均等に噴霧し, 105°C(ホットプレート)で 5 分間加熱した後, 放冷するとき, 試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは, 標準溶液から得た緑色のスポットと色調及び R_f 値が等しい.

4) トウヒ／BQC 試薬(ギブス試薬)による naringin の呈色

本品の 1.0 g にエタノール(95) 10 mL を加え (試験管), 時々振り混ぜながら 30 分間放置した後, ろ過し, ろ液を試料溶液とする. 別にナリンギン標準溶液が準備されている. これらの液につき, 薄層クロマトグラフィーにより試験を行う. 試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄層板にスポットする. 次に酢酸エチル／エタノール(99.5)/水 混液 (8:2:1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後, 薄層板を風乾する. これに希 2, 6-ジブロモ-N-クロロ-1, 4-ベンゾキノンモノイミン試液³⁾を均等に噴霧し, アンモニアガス中に放置するとき, 試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは, 標準溶液から得た灰緑色のスポットと色調及び R_f 値が等しい.

5) マオウ／ニンヒドリンによる ephedrine の呈色

本品の粉末約 0.5 g にメタノール 10 mL を加え (試験管), 2 分間振り混ぜた後, ろ過し, ろ液を試料溶液とする. この液につき, 薄層クロマトグラフィーにより試験を行う. 試料溶液 10 μ L を薄層板にスポットする. 次に 1-ブタノール／水／酢酸(100) 混液 (7:2:1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後, 薄層板を風乾する. これにニンヒドリンのエタノール (95) 溶液(1-50)⁴⁾を均等に噴霧し, 105°C(ホットプレート)で 5 分間加熱するとき R_f 値 0.35 付近に赤紫色のスポットを認める.

6) ロートコン／ドラーゲンドルフ試薬による atropine/hyoscyamine と scopolamine の呈色

本品の粉末 2.0 g を共栓遠心沈殿管に入れ, アンモニア試液⁵⁾ 30 mL を加え, 5 分間超音波を照射した後, 遠心分離する. 上澄液を分液漏斗にとり, 酢酸エチル 40 mL を加えて振り混ぜる. 酢酸エチル層を分取し (100 mL 三角フラスコ), 無水硫酸ナトリウム 3 g を加えて振り混ぜ, 液が澄明となった後, ろ過する. ろ液をとり (100 mL ナス型フラスコ), 減圧下で酢酸エチルを留去し, 残留物をエタノール (95) 1 mL に溶かし, 試料溶液とする.

別にアトロピン及びスコポラミン標準溶液が準備されている。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液、標準溶液(1)及び標準溶液(2)5 μ Lずつを薄層板にスポットする。次にアセトン／水／アンモニア水(28)混液(90:7:3)を展開溶媒として約10cm展開した後、薄層板を80°C(ホットプレート)で10分間乾燥する。冷後、これに噴霧用ドーラーゲンドルフ試液⁶⁾を均等に噴霧するとき、試料溶液から得た2個の主スポットは、標準溶液から得たそれぞれの黄赤色のスポットと色調及びR_f値が等しい。

課題 4b.1 生薬の確認試験 1)～6) に使われている検出方法は、いろいろな目的で一般的に使われている。それぞれがどのような化合物群を検出するために使われているか調べなさい。

調整試薬： 1) **2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液** 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン5gを85%リン酸60mLに加温して溶かし、95%エタノール39.5mLでうすめろ過して用いる(非日局処方)。

2) **4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液、噴霧用** 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド1.0gを希硫酸20mLに溶かす。用時製する。(硫酸、希硫酸5.7mLを水10mLに注意しながら加え、冷後、水を加えて100mLとする(10%))

3) **2,6-ジプロモ-N-クロロ-1,4-ベンゾキノンモノイミン試液、希** 2,6-ジプロモ-N-クロロ-1,4-ベンゾキノンモノイミン0.2gをメタノールに溶かし100mLとする。

4) **ニンヒドリンのエタノール(95)溶液(1-50)** 市販のスプレーを使用。

5) **アンモニア試液** アンモニア水(28)400mLに水を加えて1000mLとする(10%)

6) **TLC噴霧用ドーラーゲンドルフ試薬** 塩基性硝酸ビスマス(1g)を濃塩酸(2mL)に溶かし、ヨウ化カリウム(3g)を水(3mL)に溶かした溶液と、70%酢酸(45mL)を加える(非日局処方)。BiI₄⁻がアミノ基などと錯化合物を形成して呈色する。

標準溶液： グリチルリチン酸標準溶液 グリチルリチン酸標準品5mgをエタノール(95)／水混液(7:3)1mLに溶解。

6-ギングロール標準溶液 薄層クロマトグラフィー用 [6]-ギングロール1mgをメタノール2mLに溶解。

ナリンギン標準溶液 薄層クロマトグラフィー用ナリンギン二水和物10mgをエタノール(95)10mLに溶解。

アトロピン標準溶液 アトロピン硫酸塩標準品2mgをエタノール(95)1mLに溶解。

スコポラミン標準溶液 スコポラミン臭化水素酸塩標準品1mgをエタノール(95)1mLに溶解。

TLC展開溶媒： 1-ブタノール／水／酢酸(100)混液(7:2:1), 用時調整、

ヘキサン／酢酸エチル混液(2:1) 及び (1:1),

酢酸エチル／エタノール(99.5)／水混液(8:2:1), 用時調整、

アセトン／水／アンモニア水(28)混液(90:7:3), 用時調整。

薬品・溶媒: 生薬各種、硫酸ナトリウム、ジエチルエーテル、エタノール(95)、メタノール、酢酸エチル。

器具・装置: 50 ml 三角フラスコ、ロート、ろ紙、マイクロキャピラリ($5 \mu\text{L}$)、TLC 板(蛍光剤入りおよび無し)、TLC 展開槽、温調付きホットプレート。

—•—•—•—•—•—•—•—

生薬学・天然物化学

実験 4c 漢方処方構成生薬の鑑定と薬方の判別

一般漢方製剤として、服薬に便利なエキス剤が多く市販されています。しかしながら本来は、1日分の生薬分量を量り 500 mL 程度の水を加え、半量になるまで煎じて、3回に分けて食間に服用します。丸剤や散剤の処方を煎液とするときは処方名の後ろに通常は「料」の文字をつけますが、市販エキス剤などで「料」は省略していることがあります。

1) 生薬の観察、味見

原形と刻み生薬を展示しておく。形態を観察して特徴をメモし、スケッチする。微量の生薬の味見をしてもよい。ハンゲは口の中がえぐくなるが、ショウキョウをかじるか煎じたショウキョウを服用すればえぐみはとれる。

2) 漢方処方の判別

未知検体として漢方処方(薬方)を渡すので、始めに全量を秤量し、構成生薬(薬味)をピンセットで分けて秤量する。生薬の秤量比から下記処方のどれかを判別しなさい。班の代表は判別内容を担当教員に報告し、それが正しいことを確認してから煎じ始める。煎じ方は①自動煎じ器のガラスポットに 600 mlまで蒸留水を入れる。②処方の検体を入れる。③ダイヤルを 40 分に合わせて煎じる。放置冷却後、少量を紙コップにとって味見をする。

いくつかの漢方処方(単位は g) と 効能・効果

葛根湯(かっこんとう)

カッコン	6.0
マオウ	4.0
ショウキョウ	1.0
タイソウ	4.0
ケイヒ	3.0
シャクヤク	3.0
カンゾウ	2.0
以上 7 味	23.0
カット.	500→250 煎

感冒、鼻かぜ、頭痛、肩こり、筋肉通、手や肩の痛み

桂枝湯(けいしとう)

ケイヒ	3.0
シャクヤク	3.0
タイソウ	4.0
ショウキョウ	1.0
カンゾウ	2.0
以上 5 味	13.0
カット.	500→250 煎

体力が衰えた時のかぜの初期

小柴胡湯(しょうさいことう)

サイコ	6.0
ハンゲ	5.0
オウゴン	3.0
ニンジン	3.0
タイソウ	3.0
ショウキョウ	1.0
カンゾウ	2.0
以上 7 味	23.0

カット. 500→250 煎

吐き気、食欲不振、胃炎、胃腸虚弱、疲労感および
かぜの後期の症状

小青龍湯(しょうせいりゅうとう)

マオウ	3.0
シャクヤク	3.0
カンキョウ	3.0
カンゾウ	3.0
ケイヒ	3.0
サイシン	3.0
ゴミン	3.0
ハンゲ	6.0
以上 8 味	27.0

カット. 500→250 煎

気管支炎、気管支喘息、鼻水、薄い水の様な痰を伴う咳、鼻炎

麦門冬湯(ばくもんどうとう)

バクモンドウ	10.0
ハンゲ	5.0
タイソウ	3.0
ニンジン	2.0
カンゾウ	2.0
コウベイ	5.0
以上 6 味	24.0

カット. 500→250 煎

痰の切れにくい咳、気管支炎、気管支喘息

五苓散料(ごれいさんりょう)

チョレイ	3.0
ブクリョウ	4.0
タクシャ	4.0
ケイヒ	2.5
ビヤクジュツ	3.0
以上 5 味	16.5

カット. 500→250 煎

尿量減少し。口渴、めまい、頭痛、浮腫などをともなうもの、腎炎ネフローゼの浮腫

補中益気湯(ほちゅうえつきとう)

ニンジン	4.0
ビヤクジュツ	4.0
オウギ	4.0
トウキ	3.0
チンピ	2.0
タイソウ	2.0
サイコ	1.0
カンゾウ	1.5
ショウキョウ	0.5
ショウマ	0.5
以上 10 味	22.5

カット。500→250 煎

元気が無く、胃腸の働きが衰えて疲れやすいものの次の緒症：虚弱体质、病後の衰弱、食欲不振、ねあせ

半夏厚朴湯(はんげこうぼくとう)

ハンゲ	6.0
ブクリョウ	5.0
コウボク	3.0
ソヨウ	2.0
ショウキョウ	1.0
以上 5 味	17.0

カット。500→250 煎

気分がふさいで、咽頭・食道部に異物感があり、時にどうき、めまい、吐き気などを口もなう次の緒症：不安神経症、神経性胃炎、つわり、咳、しづがれ声

苓桂朮甘湯(りょうけいじゅつかんとう)

ブクリョウ	4.0
ケイヒ	3.0
カンゾウ	2.0
ビヤクジュツ	2.0
以上 4 味	11.0

カット。500→250 煎

立ちくらみ、頭重、胃内停水感などがあるもの。心悸亢進症、めまい、胃下垂、胃アトニー

当帰芍薬散料(とうきしゃくやくさんりょう)

トウキ	3.0
ショクヤク	6.0
ブクリョウ	4.0
タクシャ	4.0
センキュウ	3.0
ビヤクジュツ	4.0
以上 6 味	24.0

カット。500→250 煎

比較的体力に乏しく、冷えまたは貧血の傾向があるもので、排尿回数多くて尿量少ないもの、あるいは冷えて下腹部に圧痛のあるものの次の緒症：冷え性、頭重、めまい、月経不順、婦人更年期障害

加味逍遙散料(かみしょうようさんりょう)		桂枝茯苓丸料(けいしぶくりょうがんりょう)	
トウキ	3.0	ケイヒ	4.0
ビャクジュツ	3.0	ブクリョウ	4.0
サイコ	3.0	ボタンピ	4.0
サンシン	2.0	トウニン	4.0
ショウキョウ	1.0	シャクヤク	4.0
シャクヤク	3.0	以上 5 味	20.0
ブクリョウ	3.0	カット. 500→250 煎	
ボタンピ	2.0		
カンゾウ	1.5		
ハッカ	1.0		
以上 10 味	22.5		
カット. 500→250 煎			

体質虚弱な女性で、肩がこり、疲れやすく、精神不安などの精神神経症状、時に便秘の傾向のある次の緒症：冷え性、虚弱体质、月経不順、月経困難、更年期障害、血の道症（女性のホルモンの変動に伴って現れる精神、身体の緒症状）

のぼせ症で、血色良く、頭痛、肩こり、めまい、下腹部痛、足腰の冷え、あるいは鬱血などを伴うもの。月経不順、月経困難症、打撲傷、婦人更年期障害

課題 4c.1 上記漢方処方でつかわれている生薬：大棗、葛根、芍藥、麦門冬、牡丹皮、山梔子、生姜、粳米、陳皮、蘇葉、半夏、薄荷 の基原植物は、少なくともごく近縁の植物が身近にあります。公園や庭、家庭菜園かもしれないし、雑草もあります。生薬のヨミガナ、基原植物の一般名称、生薬としての使用部位などについて調べなさい。

薬品： 生薬各種、漢方処方各種

器具・装置： 紙コップ、自動煎じ器

生薬学・天然物化学

実験 4d 紫根の成分抽出と加水分解

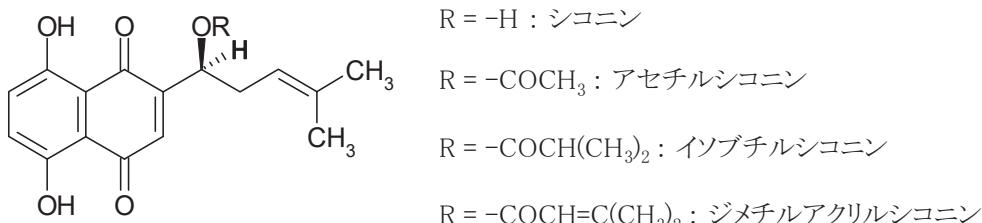
薬用植物成分抽出とその成分の性質を調べ、同定する。フェノールとカルボン酸は pK_a にかなり差があり抽出操作で分離できることを学ぶ。

1) 紫根から成分の抽出

紫根(粗切品)約 0.5g を 100mL のナスフラスコに入れ、トルエン 20mL を加える。ナスフラスコにジムロートをつけて、マントルヒーターで約 30 分間、加熱還流する。溶媒をこぼしたり、蒸気が漏れたりすると引火するので充分に注意すること。冷後、抽出液をひだ折りろ紙でろ過して 100 mL 三角フラスコにとる。ろ液の約半量を 50mL のナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターでトルエンを除き、残留物にトルエン 0.5mL を加えて溶かし試料(1)とする。

2) エステルのアルカリ加水分解

100 mL 三角フラスコに残っている 1) のろ液の残り半量に 0.2mol/L 水酸化ナトリウム液 10mL を加え、10 分間ときどき振り混ぜてシコニンの脂肪酸エステルを加水分解する。次いでフラスコに 0.2mol/L NaH_2PO_4 30mL を加えてから、内容物を 100mL の分液ロートに移す。フラスコをトルエン 10 mL で 2 回洗い、その洗液は分液ロートに合わせる。分液ロートをよく振って、リング上に静置して水層をぬき、のこったトルエン層を水 10 mL で 1 回洗う。トルエン層を分液ロートの上の口から 100 mL 三角フラスコに移し、少量の無水硫酸ナトリウムで脱水してから、トルエン層を 50mL のナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターでトルエンを除き、残留物にトルエン 0.5mL を加え試料(2)とする。



シコニンとその誘導体

3) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

5 × 20 cm シリカゲル薄層板を用い、上の操作で得た試料(1)、(2)及びシコニン標準品のトルエン溶液を 5 μL をスポットし、トルエン:酢酸エチル(20:1)混液を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行う。スポット位置：下端から約 20 mm、展開溶媒の深さ：約 10 mm、展開距離：10 cm、検出：目視。

課題 4d.1 加水分解の機構を曲がった矢印で電子の動きを描いて示しなさい。

課題 4d.2 シコニンとそのエステルはRf値の大きさはどのように変わるか？シリカゲル薄層クロマトグラフィーの原理と構造式から考えなさい..

課題 4d.3 トルエンで抽出されたのはシコニンのエステル類のみと考えて、NaOHで加水分解した後と NaH₂PO₄を加た後では、トルエン層と水層には何か溶解しているか。（ヒント：シコニンのエステル類の量が限られているので NaOH の消費はほとんどないと考えてよい。したがって、加水分解後、0.2 mol/L NaH₂PO₄ 30 mL を加えると、水層は NaH₂PO₄ と Na₂HPO₄からなる $pH \approx 6.5$ のリン酸緩衝液になる。シコニンは $pK_{a1} \approx 8.4$ で、脂肪族カルボン酸の pK_a は何れも 4.8 前後である。）

調整試薬： 0.2mol/L 水酸化ナトリウム液、0.2mol/L リン酸二水素ナトリウム液、

薬品・溶媒： 紫根(粗切品)、シコニン標準品、無水硫酸ナトリウム、トルエン.

器具・装置： ナス型フラスコ 100 mL、還流冷却器、水浴、ロート、50mL 分液ロート、ロータリーエバポレーター、TLC 展開槽、マイクロキャビラリ 5 μL、シリカゲル薄層板 5×10cm、ろ紙.

ムラサキソウ： 紫根（シコン）の原料のムラサキソウは白い小さな花をさかせる高さ 30 センチほどの多年草で、その根は、古来より染めものに使われました。江戸時代、武藏野に自生するムラサキソウの根を使って江戸で染めたものは青みが強く、赤みが強い京紫（古代紫）に対して、江戸紫（今様紫）の名で呼ばれています。武藏野のムラサキソウについては古今和歌集（読み人知らず）にもよまれています。京の都から武藏野に派遣されて来た役人の歌でしょうか。武藏野にきてムラサキソウをみつけたことがきっかけで、新任地の風土や人々に親近感を覚えてゆく様子が伝わります。群がって咲くからムラサキ。「紫のひともと」とは多くのなかの特定の「一人の女性」でしょう。なお、中央線三鷹駅の南のむらさき橋周辺にはムラサキソウが群生していたといわれています。

紫の ひともとゆえに 武藏野の 草はみながら あはれとぞ見る

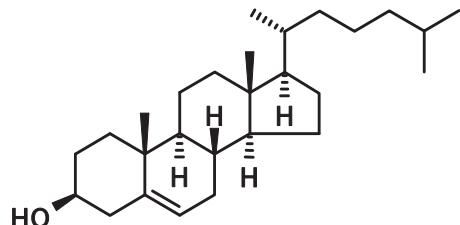
拙訳：ひと株の紫草がもとで、武藏野の草の全てに、いとしさを感じるようになりました。

生薬学・天然物化学

実験 4e 卵黄からコレステロールを単離する

卵黄中の脂質にはトリアシルグリセロール(65.5%), リン脂質(28.3%), コレステロール(5.2%), カロチノイドや脂溶性ビタミン(微量)などがある。このような各脂質の溶媒に対する溶解度の差を利用して、コレステロールとリン脂質を抽出・分離する。実験 5b ではコレステロールを単離し、融点測定と薄層クロマトグラフィーで同定と純度確認を行う。中くらいの鶏卵(サイズ M、約 60 g)では 250 mg のコレステロールが卵黄に含まれている。

コレステロールは高等動物に広く分布し、脳神経組織と副腎にとくに多く含まれている。ヒトでは肝臓を中心として1日あたり 500 mg ほどが合成される。コレステロールは体内では遊離型のほかエステル型で存在する。コレステロールは胆汁酸やビタミン D、副腎皮質ホルモンなどの前駆物質であり、細胞膜や細胞小器官の構成成分でもある。血液中の総コレステロール量の正常値は 180~230 mg/100 mL で、その高値は動脈硬化症の原因(高脂血症)とされており、1日あたりのコレステロール摂取量は 500 mg 程度以下にすることが推奨されている。



cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol)

1) コレステロールの単離

- ① ゆで卵(教員が用意する)の卵白を除いて卵黄だけをビーカー(200 mL)に入れ、これにエタノール／エーテル混液(2:1)70 mL を加えて、スペーテルで卵黄を細かく砕き、更に 5 分かけてドロドロになるまでよく混ぜ合わせる。エーテルは特に引火しやすいので充分に注意すること。
- ② この混合物を、ひだ折ろ紙でろ過し、ナスフラスコ(300 mL)にろ液を集める。ろ紙上の沈殿をエタノール／エーテル混液(2:1)30 mL で洗い、ろ液と洗液は合わせて、エバポレーターで濃縮する。濃縮中、泡立って突沸があるので、減圧に注意しながらできるだけ濃縮する。
- ③ ナスフラスコ内の残渣にエーテル 10mL を加えて溶かす。この液を、ビーカー(100 mL)の中でかくはんしているアセトン 30 mL の中へゆっくり滴下すると沈殿が生成する。生じた沈殿は主にリン脂質で、その主成分はホスファチジルコリン(レシチン)で、通常は粘着性の球状である。この沈殿をひだ折りろ紙でろ過して集め、ろ紙に包んで冷凍庫内に保存する(実験 4f で使用する)。一方、ろ液からはコレステロールを単離する。
- ④ ろ液をナスフラスコ(300 mL)に移して、ペースト状になるまでエバポレーターで濃縮する。ペースト状の残渣に 10% アルコール性 KOH 15 mL を加えて溶かし、この溶液をときどきかくはんしながら沸騰水浴中で 30 分間加熱する。エタノールが蒸発するので、途中でエタノール 2~3mL を加えて加熱する。ナスフラスコが冷えてからエバポレーターでエタノールを除く。

⑤ 残った溶液は室温まで冷却してからエーテル 50mL を加える。この溶液をひだ折りろ紙でろ過し、ろ液を分液ロート(100 mL)に移す。エーテルは蒸気圧が高いためガラス栓が飛ぶことがある。したがって、エーテルを分液ロートに入れたら、まず分液ロートを逆さまにして圧力を抜く。次に、穩やかに振り混ぜては圧力を抜く操作を2度ほど繰り返す。この実験ではエーテル層と水層が分離困難なエマルジョンになりやすいので激しく振り混ぜないこと。分液ロートを静置して2層に分離したら下層の水を除く。分液ロートのエーテル層には水(10mL)を加えて稳やかに振り混ぜて、下層の水を除く操作を3回繰り返す。(図1)

⑥ エーテル層は(少量のこった水層が混ざらないように上の口から、乾いた)三角フラスコ(100 mL)に入れ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。この溶液をひだ折りろ紙でろ過してナスフラスコ(100 mL)にいれ、エバボレーターで濃縮すれば、壁面にコレステロールの結晶が析出する。

⑦ 得られた粗結晶を加熱しながらメタノールを少量ずつ加えて完全に溶かした後、温時ろ過する。メタノールを加えすぎると結晶が析出しないか、その量が少なくなる。

⑧ ろ液が冷めれば結晶が析出する(再結晶)。生じた結晶は駒込ピペットでロート上のろ紙の中央に入れて集めると約 20 mg 程度のコレステロールがとれる。得られたコレステロールの結晶は乾燥して収量および融点(文献値 148.5°C)を求める。このコレステロールの結晶について薄層クロマトグラフィーで分析する。

2) コレステロールの融点測定と薄層クロマトグラフィー

⑨ 薄層プレート上への試料のスポット: 試料少量(ミクロスパークル半分位)を小サンプルチューブにとり、トルエン 0.5 mL に溶かし試料溶液とする。シリカゲルプレート(4 cm x 10 cm)の下端より 1.5 cm の中央部分に、0.7 cm ぐらいの間隔で、試料をキャピラリーでスポットする。スポットの大きさは 3 mm 以下になるようにする。比較の為、卵黄から分離したコレステロール試料(A)と標品のコレステロール試料(B)とを隣り合わせにして、各 2ヶ所に量を変えてスポットする。(図2)

⑩ 展開: ビーカー(200 mL)に展開溶媒 トルエン:エーテル(9:1 v/v)を深さ 0.5~1.0 cm まで入れてサランラップでふたをする。ビーカー内が溶媒の蒸気で飽和してからプレートを入れ、またサランラップでふたをしておく。展開溶媒がプレートの上端から 1 cm 付近まで上昇したら、ビーカー内からプレートをとり出してすばやく溶媒の先端に鉛筆で印をつける。展開溶媒 石油エーテル:エーテル:酢酸(80:20:2 v/v/v)についても同様に実験する。(図3)

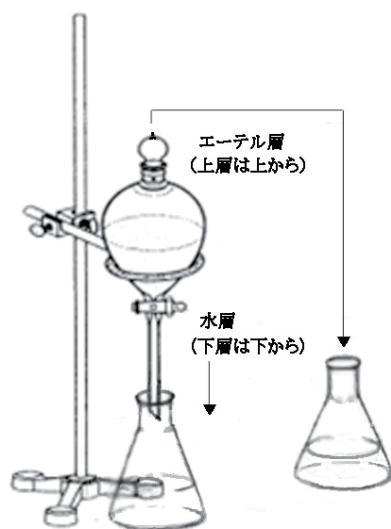


図1

⑪ 検出：溶媒が蒸発して除かれた後、プレート上に濃硫酸:エタノール(1:1 v/v)混合溶液を噴霧ビンでスプレーする。ホットプレートでプレートを穏やかに加熱するとコレステロールは赤色～紫色のスポットを与える。加熱時間が長すぎると、酸化が進んで黒く炭化し色も薄くなるのでやや見えにくくなる。薄層クロマトグラフィーの結果をスケッチとともにプレート上のスポットの位置に印をつけてR_f値を求める。



図 2

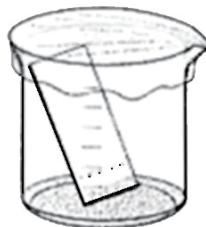


図 3

課題 4e.1 コレステロールの単離の過程における実験操作で、10%アルコール性 KOH を加えて加熱するのはなぜか。

材料・調整試薬： ゆでたまご。 10%アルコール性水酸化カリウム(エタノール 5mL を 15%KOH 水溶液 10 mL に加える)。

TLC 展開溶媒： トルエン:エーテル(9:1v/v)、石油エーテル:エーテル:酢酸(80:20:2 v/v/v)

TLC 標品： 少量のコレステロールをミクロチューブにとりトルエンに溶かす。

TLC 発色試薬： 濃硫酸:エタノール(1:1 v/v)混合溶液を噴霧ビンにいれる。

薬品・溶媒： 濃硫酸、酢酸、無水硫酸ナトリウム、アセトン、トルエン、ジエチルエーテル、石油エーテル、メチレンクロライド。

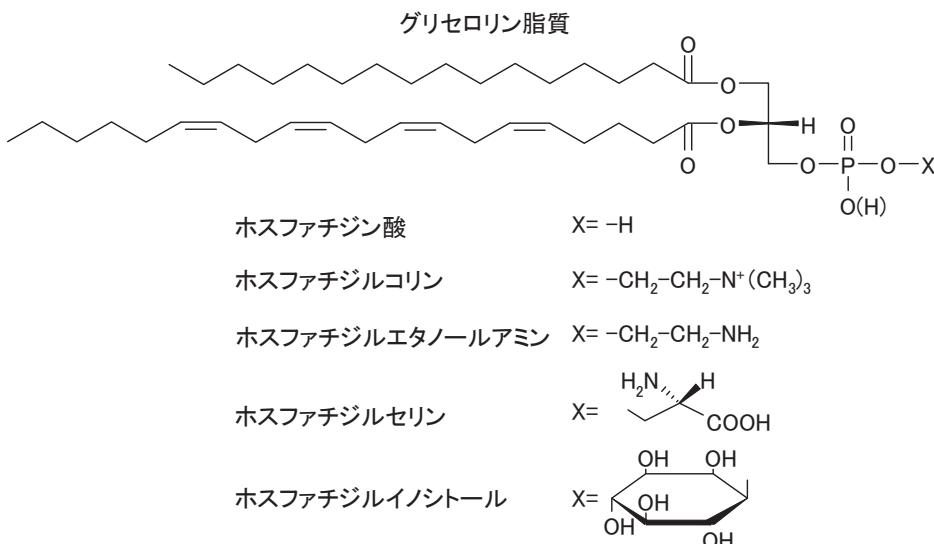
器具・装置： シリカゲル薄層板、ろ紙、ロート、ビーカー(100 mL, 200 mL)、ナスフラスコ(100 mL)、分液ロート(100 mL)、三角フラスコ(100 mL)、スペーテル、駒込ピペット、試験管、噴霧ビン、二連球、ホットプレート、融点測定装置、ロータリーエバボレーター。

生薬学・天然物化学

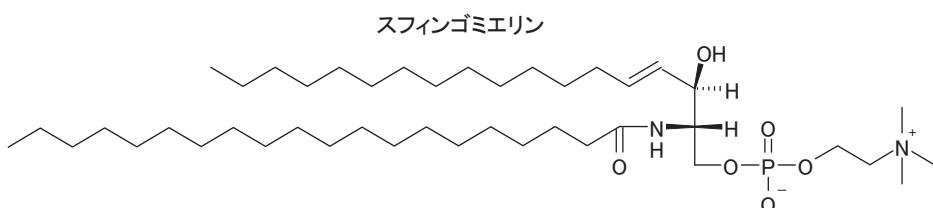
実験 4f 卵黄からリン脂質を分離・同定する

冷凍庫内に保存してある検体(実験 4e)からリン脂質混合物を抽出分離し、薄層クロマトグラフィーでリン脂質混合物に含まれている各リン脂質の同定を行なう。卵黄中にはグリセロリン脂質のホスファチジルコリン(73.0%), リゾホスファチジルコリン(リゾレシチン)(5.8%), ホスファチジルエタノールアミン(15.0%), リゾホスファチジルエタノールアミン(2.1%), ホスファチジルイノシトール(0.6%)の他に、スフィンゴリン脂質のスフィンゴミエリン(2.5%)や、エーテルリン脂質のスマローゲン(0.9%)などが含まれている。

グリセロリン脂質(ホスホグリセリド)は生体膜の構成成分などとして重要である。骨格のグリセロールの C-1 の-OH 基は一般に 12~20 個の炭素原子を含む飽和脂肪酸、C-2 の-OH 基は一般に不飽和脂肪酸、C-3 の-OH 基はリン酸とそれぞれエステルを形成し、さらにコリン、エタノールアミン、セリン、イノシトールなどの-OH 基がリン酸とエステル結合している。



スフィンゴミエリンはスフィンゴリン脂質として分類され、グリセロールのかわりに長鎖不飽和アミノアルコールのスフィンゴシンを含んでいる。スフィンゴリン脂質はスフィンゴシンのアミノ基が炭素数 20~26 個の脂肪酸でアシル化されたセラミドを経て生合成される。



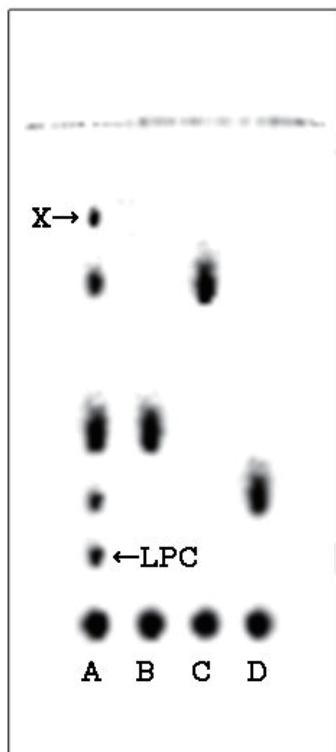
プラスマローゲンはグリセロリン脂質に類似しているがそれとは異なり、C-1 の-OH 基は脂肪酸とのエステル結合ではなく長鎖アルケニル基とビニルエーテル結合を形成しているのでエーテルリン脂質と呼ばれる。

1) リン脂質の分離

- ① コレステロールの単離の過程で得られた沈殿(冷凍庫に保存しておいたもの)を 100mL のビーカーに入れ、これにクロロホルム／メタノール混液(1:1) 50 mL を加え、10 分間かくはん後、100 mL のナスフラスコを受器にし、ろ紙ろ過する。
- ② ろ液は、エバポレーターを使い 35°Cで減圧濃縮する。リン脂質は不安定なので温度を上げないようとする。残渣にクロロホルム 2 mL を加えて溶かし、氷で冷やした 100 mL ビーカー中のアセトン 50 mL へかくはんしながら滴下する。更に、ナスフラスコをクロロホルム 1 mL で洗い、この洗液も同様にアセトン中へ滴下し、氷冷下で充分にかき混ぜる。
- ③ 生じた沈殿物を含む溶液の一部(約 35 mL)を遠心管(50 mL)に入れて遠心分離(5°C, 5000 回転／分, 5 分間)した後、上澄み液をデカンテーションで除く。沈殿物は主にリン脂質の混合物であり、それを次の薄層クロマトグラフィーで確認する。

2) リン脂質の薄層クロマトグラフィー

- ④ 薄層プレート上への試料および標準品のスポット: 試料少量を小サンプルチューブにとり、クロロホルム 0.5mL を加えて溶かし、試料溶液とする。ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、及びスフィンゴミエリン(SPM)の TLC 標品は用意されている。これらをシリカゲルプレート(4 cm x 10 cm)の下端より 1.5 cm の高さに等間隔にスポットする。スポット位置はプレート両側から 1 cm 離し、スポットの大きさは 3 mm 以下にするのが望ましい。
- ⑤ 展開: ビーカー(300 mL)に展開溶媒としてクロロホルム／メタノール／水(65:25:4)の混液を入れたのちサランラップでふたをし、ビーカー内が展開溶媒の蒸気で飽和になつたらプレートを入れ、また、サランラップでふたをして展開する。展開溶媒がプレートの上端から 1cm 付近まで上昇したら、ビーカー内からプレートをとり出して溶媒の先端に印をつけた後、溶媒を乾かす。
- ⑥ 検出: サランラップで密閉してあるヨウ素の入ったビーカー内に溶媒を乾燥したプレートを入れ、全脂質が黄褐色のスポットとなることを観察する。
- ⑦ 脂質の同定: 標準とした脂質の Rf 値から試料中の各スポットを同定する。また、薄層クロマトグラフィーの結果は、スポットの輪郭だけでなく色の濃淡まで詳しくスケッチするとともに、プレート上のスポットの位置に印をつけておき Rf 値を求める (図1)。



- .: 分離したリン脂質混合物
- !: 市販のホスファチジルコリン(PC)
- !: 市販のホスファチジルエタノールアミン(PE)
- !: 市販のスフィンゴミエリン(SPM)
- PC: リゾホスファチジルコリン
- !: 未同定物質

図1

課題 4f.1 リゾホスファチジルコリン(LPC)の構造式を調べなさい。 PC, PE, SPM, LPC の構造をもとに Rf について考えてみよ。

TLC 展開溶媒: クロロホルム／メタノール／水混液 (65:25:4)

TLC 標品: ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、及びスフィンゴミエリン(SPM)のクロロホルム溶液

TLC 発色試薬: ヨウ素をビーカーに入れ、サランラップで密閉。

薬品・溶媒: 酢酸、クロロホルム、アセトン、メタノール。

器具・装置: シリカゲル薄層板(Merck kieselge1 60F254, 5×10 cm)、ビーカー(100 mL, 200 mL, 展開槽用 300 mL)、サランラップ、ナスフラスコ(100 mL)、ロート、ガラス棒、キャビラリー、遠心管(50 mL)、高速遠心機、ロータリーエバポレーター。

生物化学

実験 5a タンパク質の定量

溶液中の総タンパク質濃度を決める方法としては比色定量法が一般的である。比色定量法はランパート・ベールの法則に基づいて、サンプルの吸光度 A の測定値から、それと比例関係にある物質濃度 c を算出する手法である。代表的なタンパク質定量法として、①タンパク質中の芳香族アミノ酸側鎖がもつ波長 280 nm の紫外吸収を測定する紫外吸収法、および ②タンパク質と添加試薬の反応で生じる特有の可視吸収を利用する、Bradford 法、BCA 法、Lowry 法がある。定量法により感度に差があるし、定量値に差が見られることがあるので、それぞれの定量法の特徴を理解して使い分けることが重要である。

本実験では原理の異なる Bradford 法、BCA 法を使って、濃度既知の BSA(牛血清アルブミン)を標準品としてそれぞれの方法で検量線を書き、それらを用いて未知試料(ウマおよび仔牛血清)中のタンパク濃度を求め、比較する。

ランパート・ベールの法則： 溶質分子同士の相互作用がないと考えられる希薄な溶液では、強度 I_0 の単波長光が溶液を通過して強度 I となったとき、 $A=\log_{10}(I_0/I)$ をその波長における吸光度と呼び、それらの間には次の式で表す関係（ランパートーベールの法則、「付録 I」を参照）が成立する。ここで、 k は物質がどれだけの光を吸収するかを表す定数、 c は溶液の濃度、 ℓ は光路長である。何れのタンパク質の定量法でもタンパク質濃度は 100 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度で測定がおこなわれる。

$$(吸光度) = A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = k c \ell \quad \cdots \quad (\text{Lambert-Beer の法則})$$

1) 標準溶液の調整

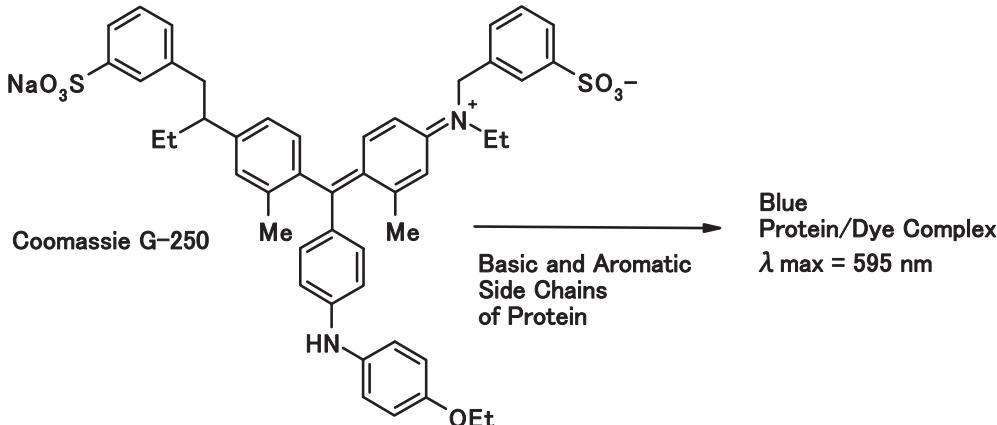
BSA 溶液(1mg/mL)¹⁾を標準品としてその 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍及び 64 倍希釈液を次のように調製する。小試験管 6 本にそれぞれ水 1mL をあらかじめ正確に加えておく。BSA 溶液(1mg/mL) 1mL を正確に取り第 1 の試験管に加えよく振り混ぜた後、その 1mL を正確に取り第 2 の試験管に加えよく振り混ぜる。この液 1mL を正確に取り第 3 の試験管に加えよく振り混ぜる。この操作を次々繰り返し、64 倍希釈液まで調整し、標準溶液系列とする。

2) 試料溶液の調整

仔牛血清およびウマ血清を未知タンパク試料とし、このそれぞれ $10 \mu\text{L}$ ずつを小試験管に取り、水 2mL ずつをそれぞれ正確に加え、200 倍希釈液とする。これらの液を希釈原液として、標準溶液系列の調製と同様な手順で 2 倍、4 倍、及び 8 倍液を調製し、試料溶液系列とする。これらの BSA 標準溶液系列および各血清希釈液は、以下の2つの定量実験に共通に使用する。

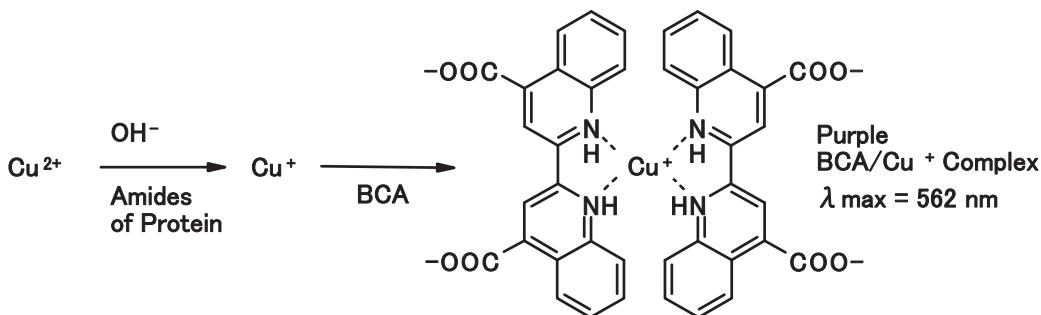
3) Bradford 法による定量

標準溶液系列、試料溶液系列、および試薬ブランクとして水、それぞれ $300\mu\text{L}$ ずつを小試験管にとり、これらに Bradford 試薬²⁾ 3mL ずつを正確に加えてよく混合する。試薬添加後 5 分～30 分の間に 595nm における吸光度を測定し、BSA の検量線(縦軸に吸光度、横軸に BSA 濃度)を作成し、未知試料のタンパク濃度を算出する。



4) ビシンコニン酸(BCA)法による定量

標準溶液系列、試料溶液系列、および試薬ブランクとして水、それぞれ $300\mu\text{L}$ ずつを小試験管にとり、BCA 試薬混液(A 液 50mL + B 液 1mL、用時調整する)を 3mL ずつを加えよく混合する³⁾。これらの液を 37°C インキュベーター(水浴)中で 30 分間加温し、冷後 562nm における吸光度を測定する。検量線を作成し、未知試料のタンパク濃度を算出する。



5) 結果の整理

両法の検量線が直線性を有する範囲を比較し、また未知試料のタンパク量が同じ値になるかどうかを判定する(それぞれの検量線に直線性が得られるまで実験を繰り返し行うこと)。未知試料の蛋白含量算出には、検量線が直線性をもつ範囲内の値を1つ選んで、その原液(血清)のタンパク濃度を算出すること。

課題 5a.1 Bradford 法、BCA 法のそれぞれの特徴を簡単に述べなさい。操作性、直線性、感度はどうですか。原理から考えて、アミノ酸組成の違うタンパク質に対して、この二つの定量法はどのような定量値を与える可能性がありますか。また、還元剤、キレート剤の混入はどのような影響があるでしょうか。

調整試薬：1) BSA 標準溶液 メスフラスコを使用して 1mg/mL になるように蒸留水に溶解する。

2) Bradford 試薬 クマシーブリリアントブルー(CBB G-250) 200mg を 100mL の 95% EtOH に溶解、この溶液に 85%リン酸 200mL を加えた後、水で全量を 2L とする。(できれば攪拌しながら一晩放置したのち) 不溶物を濾過除去し、その濾液を Bradford 試薬とする(濾過にかなり時間がかかるので、何回か濾紙を交換する)。

3) BCA 試薬 A および B の調製 **BCA 試薬 A:** ビシンコニン酸ナトリウム 10g, Na₂CO₃ 20 g、酒石酸ナトリウム 1.6g, NaOH 4g, NaHCO₃ 9.5g に H₂O を加えて 1000mL とする。室温で数ヶ月安定である。 **BCA 試薬 B:** CuSO₄·5H₂O 4g を H₂O 100mL に溶かす。室温で数ヶ月安定。

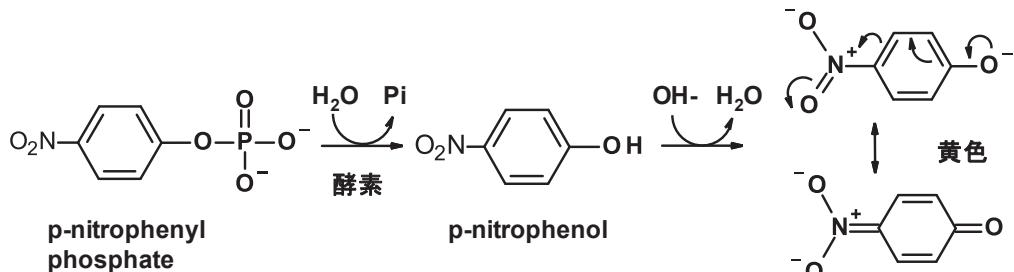
薬品： BSA(凍結乾燥品)、仔牛血清、ウマ血清、クマシーブリリアントブルー(CBBG-250)、エタノール、85%リン酸、ビシンコニン酸ナトリウム、Na₂CO₃、酒石酸ナトリウム、NaOH、NaHCO₃、CuSO₄·5H₂O

器具・装置： ホールピペット 1mL, 3mL, 可動式マイクロピペッター、試験管、インキュベーター、分光光度計

生物化学

実験 5b 酵素反応速度

アルカリホスファターゼを用いて酵素反応速度論を学ぶ。アルカリホスファターゼは最適 pH がアルカリ性のホスホモノエステラーゼで、非常に広い基質特異性をもち、種々のリン酸モノエステルを加水分解し無機リン酸を生ずる亜鉛酵素である。実験では基質の p -ニトロフェニルリン酸の濃度を変化させてアルカリホスファターゼと共にインキュベートして、加水分解反応を進行させる。反応液に NaOH を加えて酵素反応を止めると共に生成した p -ニトロフェノールをアルカリ性のもとで発色させ、黄色に発色した液の吸光度を 400 nm で測定することで基質の各濃度 $[S]$ における反応速度を算出し解析する。

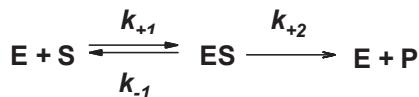


ミカエリス・メンテンの式: 酵素(E)は基質(S)を特異的に活性中心に獲りこんで酵素・基質複合体(ES)を形成し、触媒作用を發揮して生成物(P)を与える。酵素を基質と混合すると、速やかに(10 msec 程度)酵素・基質複合体(ES)の濃度は一定となり、酵素反応は定常状態になる。

酵素(E)と基質(S)が結合する速度定数を k_{+1} 、酵素・基質複合体(ES)が解離する速度定数を k_{-1} とし、酵素・基質複合体(ES)から生成物(P)が速度定数 k_{+2} で生成するならば、定常状態では、

$d[ES]/dt = 0$ であるので、

$$k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] = 0 \\ \therefore [ES] = [E][S]/K_m$$



$K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ は **ミカエリス定数**と呼び、モル濃度の次元を持つ。

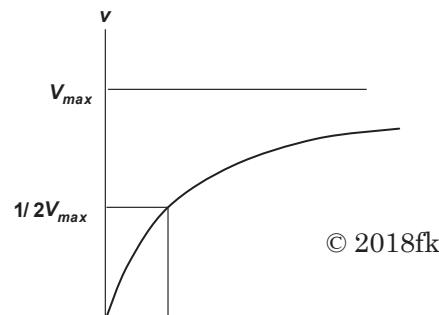
したがって反応速度 v を与える式は以下のようになる。

$$v = k_{+2}[ES] = k_{+2}[E]_0 \cdot \frac{[ES]}{[E] + [ES]} = V_{\max} \cdot \frac{[S]/K_m}{1 + [S]/K_m} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

ここで、酵素濃度: $[E_0]$ ($= [E] + [ES]$)、最大反応

速度: V_{\max} ($= k_{+2}[E_0]$) である。

上式の変形の結果だけを取り出して書き直すと、



$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

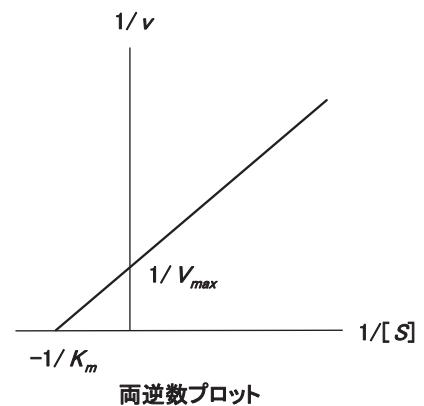
これが、ミカエリス・メンテン(Michaelis-Menten)の式である。この式によれば、基質濃度 $[S] = K_m$ のとき $v = 1/2 V_{\max}$ である。同様に、 $[S] = 1/3 K_m$ のとき $v = 1/4 V_{\max}$ であり、 $[S] = 3 K_m$ のとき $v = 3/4 V_{\max}$ となる。多くの酵素では K_m はそれぞれの基質の生理的濃度にほぼ等しい。また、 K_m は酵素と基質の親和性の目安となり、 K_m が大きいことは、酵素と基質との親和力が低いことを、一方、 K_m が小さければ、酵素と基質との親和力が高いことを意味する。

ラインウェーバー・バークプロット:

速度パラメータ K_m と V_{\max} を正確に求めるには、ミカエリス・メンテン式の逆数をとって、縦軸に $1/v$ 、横軸を $1/[S]$ として直線をプロットする。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

これを両逆数プロット(double reciprocal plot)またはラインウェーバー・バークプロット(Lineweaver-Burk plot)と呼ぶ。この直線の横軸との交点は $-1/K_m$ 、縦軸との交点は $1/V_{\max}$ であり、 K_m と V_{\max} を求めることができる。



1) 検量線の作製

- ① 検量線作製のための試料を下表のとおり調製する(単位はいずれも mL).

試験管番号	1	2	3	4	5
水	1.5	1.4	1.3	1.1	0.7
0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1 mM p-ニトロフェノール	0.0	0.1	0.2	0.4	0.8
65 mM NaOH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

- ② 各試料溶液を試験管ミキサーで十分混和した後, 400 nm での吸光度を測定する.

- ③ 横軸に p-ニトロフェノール量($\mu\text{ mol}$), 縦軸に吸光度をとり, 検量線を引いてその式を求める.

2) 反応速度測定による K_m と V_{max} の決定

- ① 下表の通り氷冷試験管に基質濃度の異なる反応液を調製する(単位は mL).

試験管番号	1	2	3	4	5	6
水	1.4	1.2	1.0	1.3	1.2	1.0
0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1mM p-ニトロフェニルリン酸	—	0.2	0.4	—	—	—
10 mM p-ニトロフェニルリン酸	—	—	—	0.1	0.2	0.4

- ② これらに酵素液を 0.1mL 加えて, 37°Cで 10 分間反応させる. 酵素反応における最終基質濃度は各自計算する.

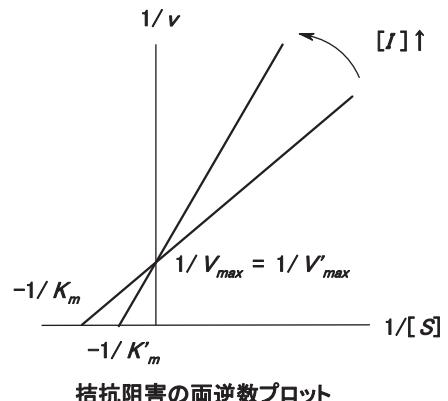
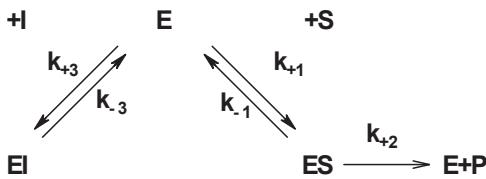
酵素液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
最終基質濃度(mM)						

- ③ 各々に 3 mL の 65 mM NaOH を加えよく混和して反応を停止させる.

65 mM NaOH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

- ③ 生成した p-ニトロフェノールの量を求める. 得られた値を基にして両逆数プロットを作製し, K_m と V_{max} を求めよ.

基質アナログ阻害薬: 酵素阻害薬の中には、薬の構造が酵素から見て本来の基質と類似していて、酵素の活性部位を基質と奪い合うことによって阻害作用を発揮するものがあり、拮抗阻害薬あるいは競合阻害薬とよばれる。例えばエナラブリルやカプトブリルはアンジオテンシン変換酵素の拮抗阻害薬である。以下に、一基質の**酵素拮抗阻害モデル**の反応速度解析について略記する。



定常状態において、

$$d[ES]/dt = 0, \quad d[EI]/dt = 0$$

$$\therefore k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0, \quad k_3[E][I] - k_{-3}[EI] = 0$$

$$\therefore \begin{cases} [ES] = [E][S]/Km, & Km = (k_{-1} + k_2)/k_1 \\ [EI] = [E][I]/Ki, & Ki = k_{-3}/k_3 \end{cases}$$

$$\therefore v = k_2[ES] = k_2[E]_0 \cdot \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [EI]} = V_{\max} \cdot \frac{[S]/Km}{1 + [S]/Km + [I]/Ki}$$

ただし、酵素濃度: $[E_0]$ ($= [E] + [ES] + [EI]$)、最大反応速度: V_{\max} ($= k_2 [E_0]$) である。

Km , V_{max} , Ki の算定は以下のようになる。

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{1}{V_{\max} \cdot \frac{[S]/Km}{1+[S]/Km+[I]/Ki}} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{1+[S]/Km+[I]/Ki}{[S]/Km} \\ &= \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{1+[I]/Ki}{[S]/Km} \right) \end{aligned}$$

$[S]_0 = [S] + [ES] \approx [S]$ & $[I]_0 = [I] + [EI] \approx [I]$ の場合、例えば、 $[I]_0, [S]_0 \gg [E]_0$ のとき、

$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\max}} + \frac{Km(Ki+[I]_0)}{V_{\max} \cdot Ki} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad \Rightarrow \quad (x, y) = \left(\frac{1}{[S]_0}, \frac{1}{v} \right) : \text{Lineweaver-Burk plot}$$

\Rightarrow $[I]_0=0$ の場合、 Km , V_{\max} が求まる。また、 $[I]_0 \neq 0$ の場合とグラフを比較することで競合阻害／非競合阻害を区別することができる。

あるいは、次のように変形して、

$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{[S]_0 + Km}{[S]_0} + \frac{Km}{V_{\max}} \cdot \frac{[I]_0}{Ki} \cdot \frac{1}{[S]_0} \Rightarrow (x, y) = \left([I]_0, \frac{1}{v} \right) : Dixon plot$$

⇒ $[S]_0$ を変化させて交点の x 座標から Ki を求める。

課題 5b.1 医薬品として使われる代表的酵素阻害薬をひとつ選び、一般名と商品名をこたえなさい。また、その対象疾患、阻害酵素についても調べなさい。

調整試薬： 0.2M グリシン-NaOH 緩衝液(pH 10.0) 50 mL の A と 32 mL の B を混合して脱イオン水を加えて 100 mL にする。

A: 0.4 M グリシン, 7.51 g を脱イオン水にとかして 250 mL とする。 (Gly=75.07)

B: 0.4 M NaOH, 4.00 g を脱イオン水にとかして 250 mL とする。 (NaOH=40.00)

1 mM p-ニトロフェノール 139 mg を 1000 mL に溶解希釈する。 (pNP=139.11)

10 mM p-ニトロフェニルリン酸 例えれば 371 mg の p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (=371.14) を脱イオン水に溶かし 100 mL とする。

1 mM p-ニトロフェニルリン酸 10 mM 溶液を 10 倍に希釈する。

アルカリホスファターゼの酵素液 0.1M NaCl / 2mM MgCl₂ / 1mM ZnCl₂ 溶液に溶かして 0.01 mg/mL にする。 (NaCl = 58.44, MgCl₂ = 95.21, ZnCl₂ = 136.30)

薬品： グリシン、p-ニトロフェニルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物、アルカリホスファターゼ (SIGMA,P-7640, 牛小腸粘膜由来、凍結乾燥品)、NaCl、NaOH、MgCl₂、ZnCl₂。

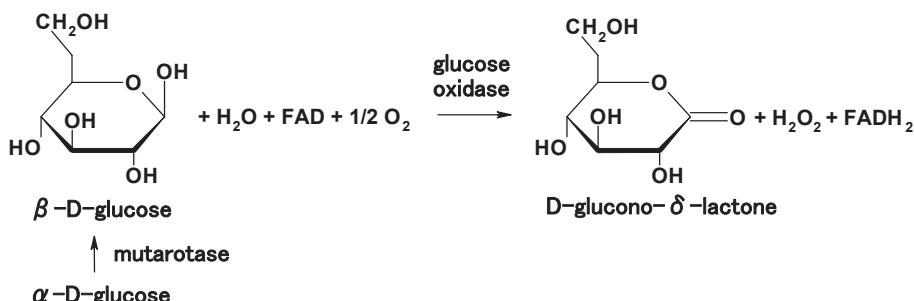
生物化学

実験 5c グルコースオキシダーゼ(GOD)/ペルオキシダーゼ(POD)法による血糖値の測定

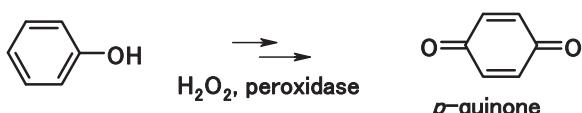
血糖値、コレステロール、AST/ALTの定量などにトリンダー反応を利用した生化学検査法があり、各社からいろいろな診断用医薬品キットが販売されている。本実験ではグルコース定量用キット「グルコース C II-テストワコ」を使ってウマ、仔牛などの血清中グルコース量を求める。使用する血糖検体については指導教員に従うこと。

トリンダー反応を利用した生化学検査法の原理：この定量法では3段階の反応 i～iii がひとつの反応容器内で進行する。i) 定量する基質を酵素で酸化して過酸化水素を発生させ、ii) その過酸化水素で共存するフェノールを酸化してキノンとし、iii) キノンを4-アミノアンチピリンと縮合させて呈色させ吸光度で定量する。段階 ii および iii の反応を合わせてトリンダー反応と呼びフェノールの代わりにアニリン誘導体を使うこともある。以下に「グルコース C II-テストワコ」の場合の i～iii に対応する反応式を記載する。

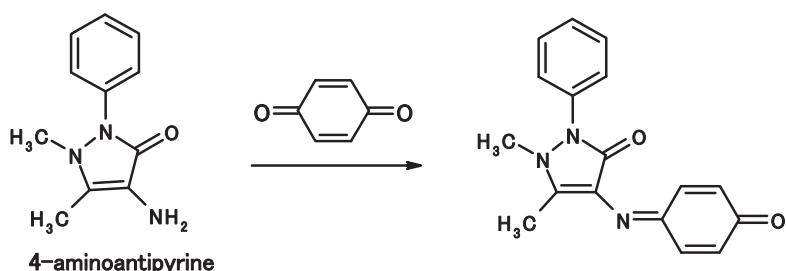
i) グルコースをグルコース酸化酵素で酸化すると定量的に過酸化水素が発生する。



ii) 過酸化水素はペルオキシダーゼの触媒作用でフェノールを酸化してキノンをあたえる。



iii) キノンは4-アミノアンチピリンと縮合して赤色の色素が生成する。



1) 血糖値の測定

- ① マイクロチューブ6本にグルコース標準液(500mg/dL)、0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mLをとり、蒸留水を加えて全量を 0.5mLとする。
- ② 各濃度のグルコース標準液および血清検体 $20 \mu\text{L}$ ずつを小試験管にとる。
- ③ 発色試薬 3.0mLを各試験管に加える。
- ④ よく混和したのち 37°C で5分加温
- ⑤ 505nm の吸光度を測定し、縦軸に吸光度、横軸にグルコース濃度(mg/dL)をとり、検量線を作成する。このグルコース検量線から血清中のグルコース濃度を算出する。

課題 5c.1 検量線の直線性、各血清検体の定量結果は適切と考えるか、考察せよ。

課題 5c.2 ムタロターゼの役割は何かを述べなさい。

課題 5c.3 アスコルビン酸オキシダーゼの役割は何かを述べなさい。

薬品: 血清、「グルコース C II-テストワコー」

測定キット 「グルコース C II-テストワコー」の発色試薬の成分: ムタロターゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、アスコルビン酸オキシダーゼ、フェノール、リン酸緩衝液($pH 7.1$)

器具・装置: マイクロチューブ、可動式マイクロピペット、小試験管、ホールピペット 3mL、インキュベーター(水浴)、分光光度計

生物化学

実験 5d 血清中の AST と ALT の酵素活性測定

血液中の酵素の活性変化は診断に利用されている。酵素が病気などによる細胞破壊に伴って血液中に流出することがあるからである。AST、ALT は肝細胞の異変で血中の活性が上昇する。本実験では AST,ALT 測定用キット「トランスアミナーゼ C II-テストワコー」を使って血清の AST と ALT の酵素活性を測定する。血清は指導教員が指定する。

AST、ALT はそれぞれ GOT GPT とも呼ばれる。これらは略号で呼ばれるのが普通ですが、その機能を示す本来の名称を以下にまとめておきます。

AST : aspartate aminotransferase = GOT : glutamic-oxaloacetic transaminase
ALT : alanine aminotransferase = GPT : glutamic-pyruvic transaminase

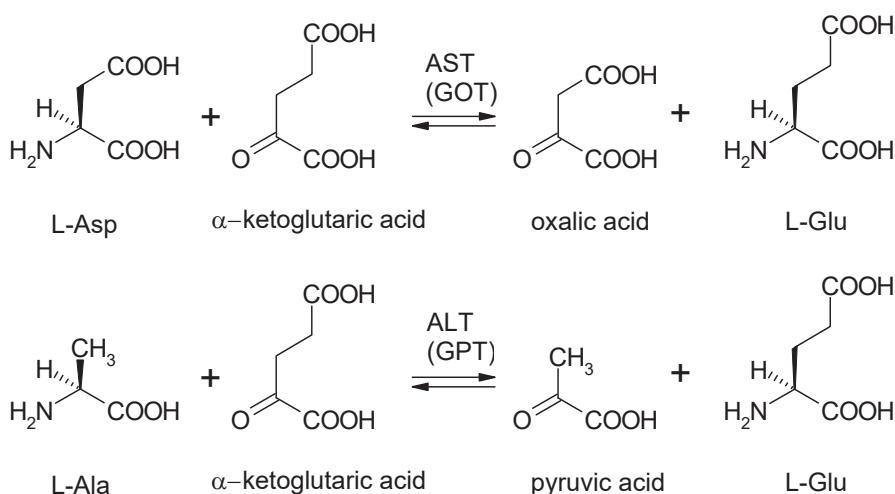
AST, ALT の臨床的意義: ヒトの血液検査では必ず含まれているといつてよい重要項目です。「トランスアミナーゼ C II-テストワコー」では Karmen(カルメン)単位で酵素活性が算出されます。国際単位との関係は Karmen 単位 × 0.482 = 国際単位(IU/L, 25°C) です。

AST : 肝臓、骨格筋、心筋、赤血球に存在する酵素です。代表的な肝機能の指標ですが、筋肉、心筋、溶血性の疾患でも上昇します。ヒトの基準値: 13~33 IU/L.

ALT : 主として肝臓に存在する酵素で、肝機能の指標。ヒトの基準値: ♂8~42; ♀6~27 IU/L

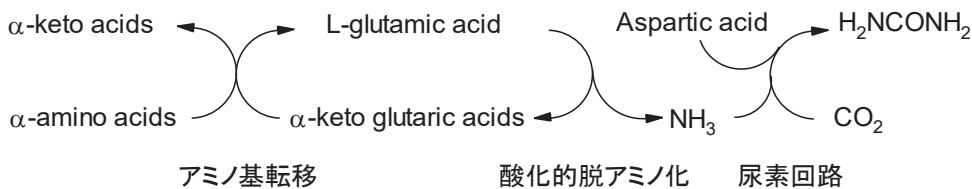
AST, ALT が触媒する生化学反応: トランスアミナーゼは、対をなす α -アミノ酸と α -ケト酸を相互に変換する。基質の α -アミノ酸に対するトランスアミナーゼの特異性は異なるが、アミノ基の受容体としては α -ケトグルタル酸が最一般的で、ついでオキサロ酢酸とピルビン酸も広く使われ、それぞれグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンが生成する。

哺乳類組織のトランスアミナーゼとしては AST と ALT の活性が特に高い。その結果、下記の化学反応式で右から左へ反応が進行するときにはアスパラギン酸、アラニンおよび TCA 回路の中間体である α -ケトグルタル酸が生成する。



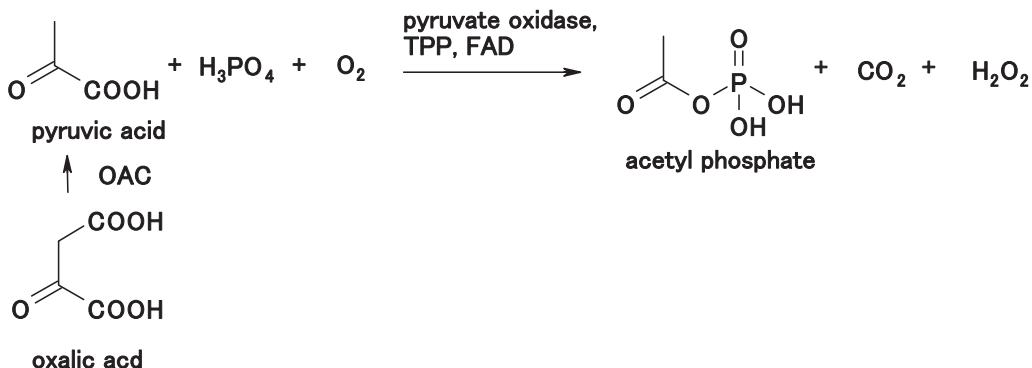
一方、左から右の反応ではこれらの非必須アミノ酸から解糖の産物であるピルビン酸とTCA回路

の中間体のオキサロ酢酸が供給されることになる。この場合に生成するグルタミン酸は哺乳類組織中でかなりの速度で酸化的脱アミノ化を受ける唯一のアミノ酸であるから、全体の流れとしてアミノ酸の窒素はグルタミン酸を経由して酸化的脱アミノ化を受けて α -ケトグルタル酸とアンモニアが生成し、アンモニアは毒性の低い尿素のアミノ基の一つに変換されて排出される。尿素のもう一つのアミノ基は AST によるオキサロ酢酸へのアミノ基転位でつくるアスパラギン酸に由来する。

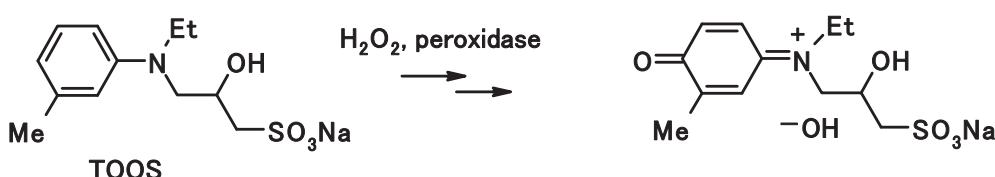


AST, ALT 測定用キットの原理: 実験 5c のグルコースの定量と同じくトリンドー反応を利用した生化学検査法である。異なる点はフェノールの代わりにアニリン誘導体を使ってキノイド化合物を発生させていることである。以下に「トランサミナーゼ C II-テストワコ」の場合の反応式を記載する。

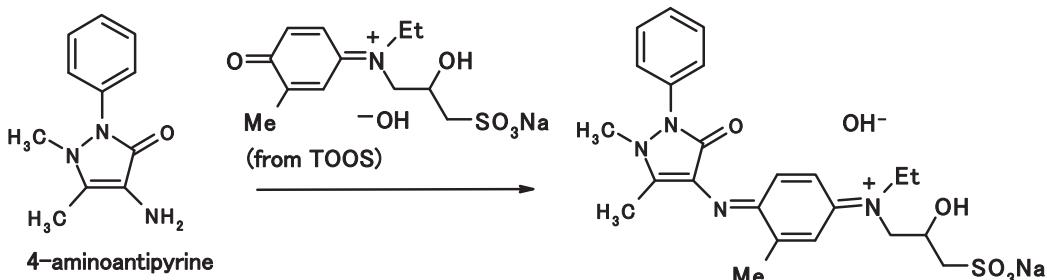
i) 酸化酵素による過酸化水素の発生



ii) ペルオキシダーゼによるアニリン誘導体からのキノイドの発生



iii) キノイド化合物と4-アミノアンチピリンの縮合による青紫色素の生成



1) AST と ALT の酵素活性測定

	血清 (検体数 n)	AST 基準液(検量線)	ALT 基準液(検量線)
① 試料(マイクロピペットでガラス試験管へ)	0.02mL × 2n	0.00, 0.01, 0.02, 0.04mL	0.00, 0.01, 0.02, 0.04mL
② AST/ALT 基質酵素液	0.5 mL × 2n	—	—
③	37°C恒温槽で 5 分間加温。このとき血清中のピルビン酸、アスコルビン酸は分解される。		
④ AST/ALT 発色試薬	0.5 mL × 2n	0.5 mL × 4	0.5 mL × 4
⑤ AST/ALT 基質酵素液	—	0.5 mL × 4	0.5 mL × 4
⑥	37°C恒温槽で <u>正確に</u> 20 分間温める。		
⑦ 反応停止液	2.0 mL × 2n	2.0 mL × 4	2.0 mL × 4
⑧	良く振り混ぜたあと、555 nm の吸光度を測定する。		
⑨	—	AST/ALT 検量線(縦軸:吸光度、横軸:活性)を作成。基準液 0.02 mL のとき、酵素活性は 100 Karmen。	
⑩	検量線を使って血清の AST/ALT 活性を算出。	—	—

課題 5d.1 検量線からもとめた血清の AST(GOT)活性と ALT(GPT)活性を、ヒトの正常値と比較せよ。

課題 5d.2 基質酵素液に入れられているカタラーゼはどのような反応を触媒する酵素ですか。また、その役割は何ですか。

薬品： 血清(仔牛、血清、ラットなど)、測定キット「トランスアミナーゼ C II-テストワコー」

測定キット「トランスアミナーゼ C II-テストワコー」の試液成分：

AST 基準液…AST、ピルビン酸カリウム含有

ALT 基準液…ALT、ピルビン酸カリウム含有

AST 基質酵素液…ピルビン酸オキシダーゼ(POP)、オキサロ酢酸脱炭酸酵素(OAC)、4-アミノアンチピリン、アスコルビン酸オキシダーゼ、カタラーゼ、グッド緩衝液 *pH* 7.0、L-アスパラギン酸。

ALT 基質酵素液…ピルビン酸オキシダーゼ(POP)、4-アミノアンチピリン、アスコルビン酸オキシダーゼ、カタラーゼ、グッド緩衝液 *pH* 7.0、L-アラニン。

発色試液…ペルオキシダーゼ、グッド(HEPES)緩衝液 *pH* 7.0、 α -ケトグルタル酸、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-m-トルイジンナトリウム(TOOS)。

反応停止液…クエン酸、界面活性剤

器具・装置：ピペット、試験管、試験管立て、恒温槽、吸光度計

付録／実験データ、実験器具・装置の取り扱い

A. 実験測定値の取り扱い

誤差

誤差には系統誤差と偶然誤差がある。系統誤差は、誤差の現われ方に一定の傾向(真の値から一定方向に偏る)が見られ、測定値は真の値に対して正または負のかたよりを示す。したがってこの誤差は統計処理ができない誤差である。系統誤差の発生原因の主なものを次に示します。これらの系統誤差を見積ることは困難であるが、計測器の校正や測定者の交代によって、系統誤差を小さくする努力は、実験をするものにとって大切なことです。

- ① 計測器の誤差(測容器の精度など)
- ② 方法による誤差(当量点と終点の不一致、指示薬などのブランク無補正)
- ③ 操作上の誤り(温度、滴下速度などの測定条件の変動)
- ④ 個人による誤差(測定者のくせ、熟達度の低さ)

一方、偶然誤差は系統誤差をとり除いたとしても必然的、かつ偶発的に現われるもので、不規則な原因(ゆらぎ)による測定のバラツキによるものです。バラツキの指標として、母分散 σ^2 やその平方根(正)の母標準偏差 σ が使われます。

母分散 σ^2

変数 X の分散 σ^2 の定義は「 $\sigma^2 = E[(X - E[X])^2]$ 」： σ^2 は X の平均値 $E(X)$ からの偏差の平方の平均値である。ここで、 $E[X]$ は X の期待値をあらわし $E[X] = \mu$ である。一例として、母集団 $(X_1, X_2, X_3, \dots, X_N)$ について分散は次のようになります。

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \mu)^2}{N} = \frac{(X_1 - \mu)^2 + (X_2 - \mu)^2 + (X_3 - \mu)^2 + \dots + (X_N - \mu)^2}{N} \quad (\text{母分散})$$

不偏分散 s^2 は母分散 σ^2 の推定値

実験測定値は測定をすればデータは無数にできるので、上の式のように全数を対象として母分散 σ^2 を求めることが不可能になります。このような場合には、統計学の定理「 $E[s^2] = \sigma^2$ ：不偏分散 s^2 の期待値は母分散 σ^2 である」に基づき、 n 個の標本値 x_1, x_2, \dots, x_n から不偏分散 s^2 を求めて母分散 σ^2 の推定値として使います。ちなみに、母平均 μ についても「 $E[\bar{x}] = \mu$ ：標本平均 \bar{x} の期待値は母平均 μ 」なので標本平均 \bar{x} をもとめて母平均 μ の推定値とします。

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1} \quad (\text{不偏分散})$$

相対標準偏差(RSD, relative standard deviation)

標準偏差 s を標本平均 \bar{x} で割った値(%)で、例えば象とねずみでそれぞれの体重の標準偏差 s を直接比較すれば象の方が体重のバラツキが大きいという見掛けの矛盾を回避できる。相対標準偏差は変動係数(v, CV, coefficient of variation)とも呼ばれます。

$$RSD = \frac{100s}{\bar{x}} (\%) \quad (\text{相対標準偏差})$$

標準誤差(SE, SEM, standard error of the mean)

母集団の要素 N が充分大きい時、 n 個の標本の平均 \bar{x} の標準偏差を標準誤差と呼ぶ。標準誤差は標本数 $n = 4$ の場合であれば、標準偏差 s の $1/2$ になる。

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad (\text{標準誤差})$$

正規分布

正規分布に従って分布するものには、性別年令別の身長の分布、実験における偶然誤差の分布などがあります。正規分布 $N(\mu, \sigma^2)$ であれば、確率的に測定値の68.3%は $\mu \pm \sigma$ の区間、95.5%が $\mu \pm 2\sigma$ の区間、99.7%が $\mu \pm 3\sigma$ の区間に存在するようになります。これらの割合は、おなじみの学業成績の五段階評価にも利用されます。

正確さと精密さ

測定値の良否を表わすのに、正確さと精密さという2つの用語があります。正確さとは測定値が真の値にどれくらい一致しているかであり、系統誤差の大小と直接関係し、精密さとは一群の測定値が互いにどの程度一致しているかであり、バラツキの程度を示すもので偶然誤差の大小を示すものです。即ち、精密でも必ずしも正確とは限りません。

B. スチューデントの t 分布を使った推定と検定

スチューデントの t 分布は、正規分布する母集団について少ない標本数で母平均や母平均の差の信頼区間の推定、又、母平均の差の検定をする際に使用される。以下に例を示す。

新規薬物の効果を見るために20匹のラットを10匹ずつ2群に分け、投与群には薬物を生理食塩水に溶かして投与し、対照群には生理食塩水のみを投与した。血液を検査したところ、 1 mm^3 中の赤血球数(単位 100 万個)について右表のような実験結果を得た。

- 1) 対照群の赤血球数の母平均 μ_2 について信頼係数 95% の信頼区間を求めよ。
- 2) 薬物は赤血球数を減少させているように見える。赤血球数の母平均の差 $\mu_1 - \mu_2$ について信頼係数 95% の信頼区間を求めよ。
- 3) 赤血球数の減少の可能性について、帰無仮説 $\mu_1 = \mu_2$ を有意水準 5% で検定し、母平均の差が有意であることを示せ。

	投与群	対照群
X_1	7.97	Y_1 8.08
X_2	7.66	Y_2 8.27
X_3	7.59	Y_3 8.45
X_4	8.44	Y_4 8.05
X_5	8.05	Y_5 8.51
X_6	8.08	Y_6 8.14
X_7	8.35	Y_7 8.09
X_8	7.77	Y_8 8.15
X_9	7.98	Y_9 8.16
X_{10}	8.15	Y_{10} 8.42

- 1) 母平均の信頼区間を求める。

Y_i は正規分布(μ_2, σ^2)に従う。 σ^2 が未知なので、代わりに不偏分散 s_2^2 を使うとして、 t は自由度 $n-1$ の t 分布、 $t(n-1)$ に従う。

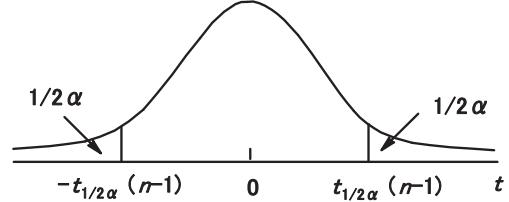
$$t = \frac{\bar{Y} - \mu_2}{\sqrt{\frac{s_2^2}{n}}} = \frac{\sqrt{n}(\bar{Y} - \mu_2)}{s_2}$$

したがって、信頼係数 $1 - \alpha$ に対して、

$$-t_{\alpha/2}(n-1) \leq \frac{\sqrt{n}(\bar{Y} - \mu_2)}{s_2} \leq t_{\alpha/2}(n-1) \quad \therefore \bar{Y} - t_{\alpha/2}(n-1) \cdot s_2 / \sqrt{n} \leq \mu_2 \leq \bar{Y} + t_{\alpha/2}(n-1) \cdot s_2 / \sqrt{n}$$

$$t_{0.05/2}(9) = 2.26 \quad (=TINV(0.05,9)=2.26 \cdots \text{エクセルでの計算値})$$

故に、「信頼係数 95% の信頼区間は $8.10 \leq \mu_2 \leq 8.36$ である」(確率 95% で $8.10 \leq$ 母平均 ≤ 8.36 と推定される)



2) 母平均の差の信頼区間を求める.

$\bar{X} - \bar{Y}$ の分布は正規分布($\mu_1 - \mu_2, (1/m+1/n)\sigma^2$)であるが、 σ^2 が未知なので $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2$ と仮定して σ^2 の代わりに、 $\bar{X} - \bar{Y}$ の合併した分散 s^2 をつかう.

$$s^2 = \frac{\sum_i^m (\bar{X}_i - \bar{X})^2 + \sum_j^n (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2}{m+n-2} = \frac{(m-1)s_1^2 + (n-1)s_2^2}{m+n-2}$$

このとき、 t は自由度 $(m+n-2)$ のスチューデントの t 分布に従う.

$$t = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{s\sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}}} \quad \cdots *$$

したがって、信頼係数 $1 - \alpha$ に対して、

$$-t_{\alpha/2}(m+n-2) \leq \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{s\sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}}} \leq t_{\alpha/2}(m+n-2)$$

$$\therefore \bar{X} - \bar{Y} - t_{\alpha/2}(m+n-2) \cdot s\sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \leq \mu_1 - \mu_2 \leq \bar{X} - \bar{Y} + t_{\alpha/2}(m+n-2) \cdot s\sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}}$$

$$t_{0.05/2}(18) = 2.10 \quad (=TINV(0.05,18)=2.10)$$

故に、「信頼係数 95% の信頼区間は $-0.44 \leq \mu_1 - \mu_2 \leq -0.01$ である」

3) 母平均の差の検定をする.

$\mu_1 = \mu_2$ と仮定すると、 t 値は式*より、 $t = -2.23 \cdots$ ①

一方、自由度 18 の左 5% の t の値は -1.73 ($=-TINV(0.1,18)$) \cdots ②

①は②の値と比較して小さく、仮定 $\mu_1 = \mu_2$ が成立する確率は 5% 未満である.

即ち、「仮説 $\mu_1 = \mu_2$ は有意水準 5% で棄却される」

又は、「仮説 $\mu_1 < \mu_2$ は有意水準 95% で採択される」(有意水準 95% で $\mu_1 < \mu_2$ である)

ちなみに、実際①がおきる確率はエクセル関数で簡単に算出できて 0.0195 になる. ($=TDIST(+2.23,18,1)$ または TTEST(C10:C19,E10:E19,1,2)).

C. 有効数字

実験において得られた数値には必ず実験上の誤差が伴っている。また試料の秤量、容量の測定などの単位操作には測定可能な桁があることを忘れてはならない。電卓が普及し、8桁の計算が瞬時に行えるようになったために、得られた8桁の数がすべて有効であると考えがちであるが、これは単なる形式的な演算結果であって、無意味な数字が含まれている。測定値の演算によって得られる数値は、最低精度のデータ以上に精度はよくならない。

てんびん、分銅、体積計などの公差についてふり返ってみて、どこまで読めるかよく考えてみる必要がある。てんびんを用いて測定すれば 0.1mg の桁まで測定できる。ビュレットでは 0.1mL の目盛りがあり、目測で 0.01mL まで読める。たとえば 25.14mL の測定値では誤差は最終桁の ± 0.5 となるので真の値 $X[\text{mL}]$ は $25.135 \leq X < 25.145$ になる。もし、ビュレットの読みを最小目盛りの $1/10$ まで読みとらないで 25.1mL と記録した場合は、誤差の程度は $\pm 0.05\text{mL}$ となり、誤差の大きさが異なってくる。同様に 25.1mL と 25.10 mL とでは、有効数字の桁数が異なるので、データを記載するときには注意する。

ある溶液の容量が 300 mL と記されている場合、有効数字が1桁～3桁のいずれであるか不明瞭である。有効数字の桁数をはつきり示すには指数表示を用いる。下に実例を記す。()内が有効数字の桁数である。

$3 \times 10^2\text{ mL}$ or $3 \times 10^{-1}\text{ L}$	(1)	63.0	(3)
$3.0 \times 10^2\text{ mL}$ or $3.0 \times 10^{-1}\text{ L}$	(2)	0.27650	(5)
$3.00 \times 10^2\text{ mL}$ or $3.00 \times 10^{-1}\text{ L}$	(3)	3×10^3	(1)
458. 7	(4)	1.0003	(5)
0.004	(1)	9.00×10^4	(3)
1.704	(4)	0.0056	(2)
3.25	(3)	45.67	(4)

D. SI 単位

cc, m μ , Å(長さ)の使用は好ましくない。それぞれ cm³, nm を使用する。圧力は Torr, mmHg, atm の使用は避けて Pa を使用する。1 mol dm⁻³の溶液を 1 M と書く場合があるが、M は非 SI 単位で正規に使用は認められていない。規定液など N(規定度)が使用されている場合もあるが、近年は SI と整合させるために N は使用されていない。JIS K 0102-1993 でも N は廃止して mol/L で表示するようになった。日本薬局方でも N は使用しないが化学の分野では汎用される。

物質量:	kmol, mol, mmol, μmol
体積:	m ³ , dm ³ , cm ³ (併用単位 kL, L, mL)
モル濃度:	mol dm ⁻³ , mol m ⁻³ (併用単位 mol L ⁻¹)
濃度:	kg dm ⁻³ , kg m ⁻³ , g cm ⁻³ (併用単位 kg L ⁻¹ , g mL ⁻¹ , g L ⁻¹)
温度:	K, °C
時間:	ks, s, ms, μs, ns (併用単位 d, h, min)
質量:	Mg, kg, g, mg, μg (併用単位 t)
長さ:	km, m, dm, cm, mm, μm, nm, pm
圧力:	Pa

E. 測容器具

ホールピペット, メスピペット, ビュレット, メスフラスコは, 正確に一定体積の液体を量りとる測容器具であり, 容量分析に使用される. これらの測容器の許容誤差は, JIS 規格によりメーカーが責任を負うことになっている.

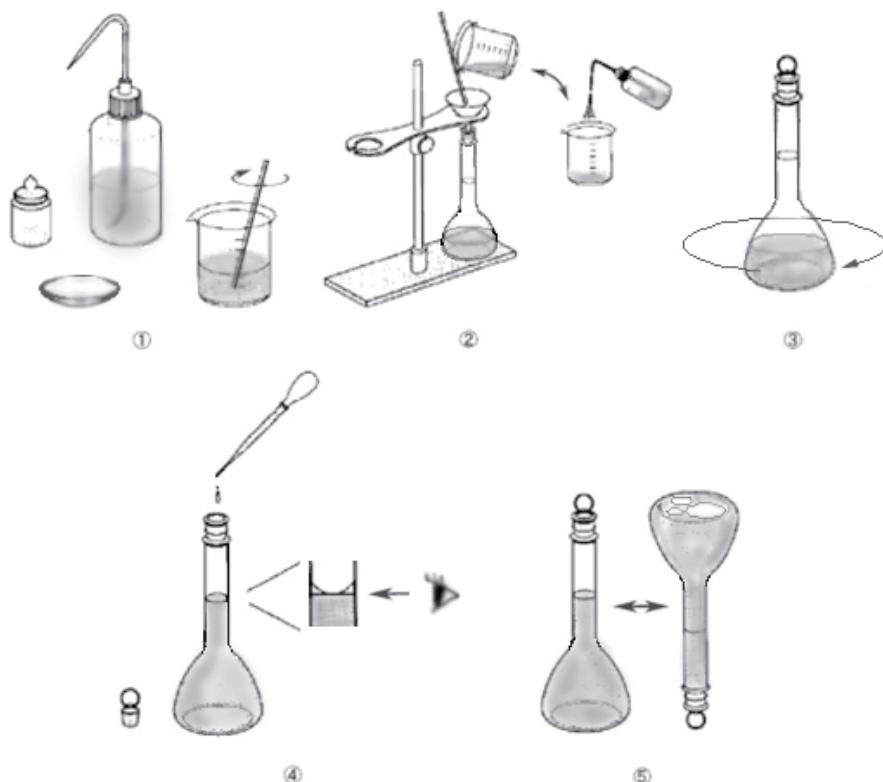
メスフラスコは受用容量(Internal, 記号 In で示される. または, to Contain, 記号 TC で示される)の測容器具であり, 標線まで液体を入れたとき, 表示されている体積に正確になり, それを排出したときには, 表示されている体積ではなくなる. 標準溶液の調製や溶液の正確な希釈に使用される. メスフラスコの許容される相対誤差は, 器具の容量により異なるが, 50mL～1000 mL の器具では 0.2%～0.06%程度である.

ホールピペット, メスピペット, ビュレットは出用容量(External, 記号 EX で示される. または, to Deliver, 記号 TD で示される)の器具であり, いずれも排出体積が, 表示されている体積に相当する. ホールピペット, ビュレットの許容相対誤差は容量 10mL～50mL の器具で, 0.2%～0.1%程度である. メスピペットの許容相対誤差は 2mL～10mL の器具で 1%～0.4%と前者に比較して比較的大きい. したがってメスピペットを容量分析に用いるのは不適当である.

メスシリンダーは, 10mL～100 mL の器具で, 許容相対誤差はそれぞれ 2%～0.5%で, 上記の器具に比較して精度が悪くなる. 通常の容量分析の精度は 0.3%程度であるので, 濃度決定に関わってくる操作に使用する器具としては, メスフラスコ, ホールピペット, ビュレットであり, メスピペット, メスシリンダーは不適当である.

F. 標準溶液の調製

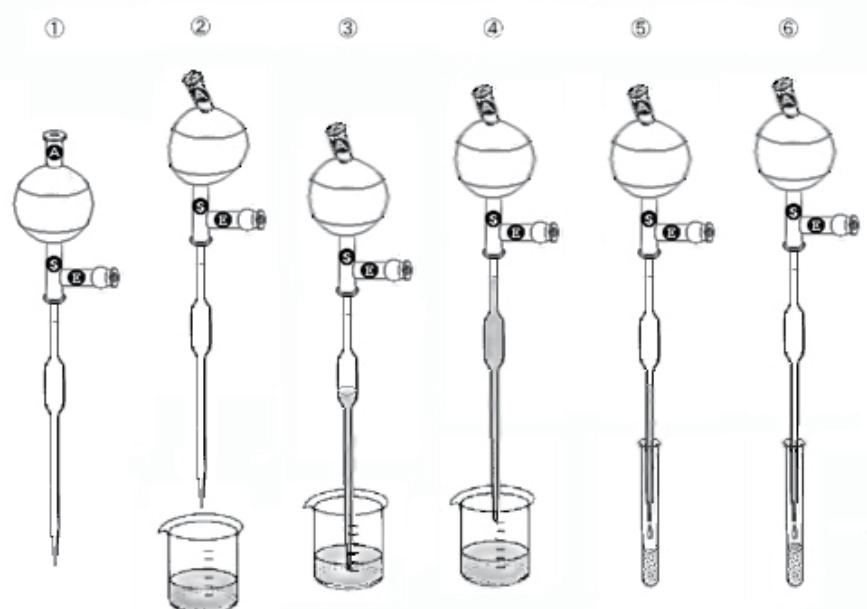
滴定に使用する標準溶液の調製は試料の重さを精確に量ることから始める。秤量瓶を使えば、試料の吸湿、蒸発、飛散を防ぐことができますが、短時間で精秤できる電子天秤が使える現在では、秤量瓶の代わりに、時計皿で秤量することもあります。



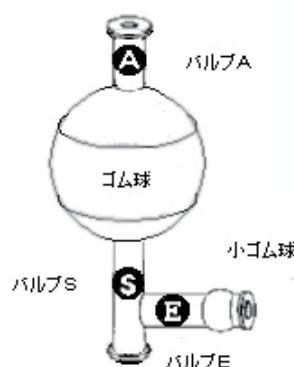
- ① 精秤した固体をビーカーに入れて溶解する。直接固体をメスフラスコには入れない。標量ビンあるいは時計皿は洗ビンを使用して5~6回洗浄して洗液はビーカーにあわせる。時計皿の方が容器に付着した試料を洗いこむのは簡単です。
- ② ビーカーの溶液はガラス棒をつたわらせて一滴もこぼれないようにメスフラスコに入れる。ガラス棒の代わりにスパーテルなどを代用しない。溶液の入っていたビーカーの内壁や外壁上部、またロートの脚部も洗ビンで5~6回洗浄し、洗液は全てメスフラスコに移す。
- ③ 蒸留水を加えてメスフラスコの内部の溶液の体積が50~60%になったところで、片手でメスフラスコの上部を持ち他方の手で底部を回転させて溶液が均一になるように混ぜる。
- ④ 更に蒸留水を加えて液面が標線近くになったら、ピペットでメニスカスの底部が標線と一致するまで蒸留水を加える。
- ⑤ 栓をしっかりと押さえて転倒混和する。

G. 安全ピペッターの使い方

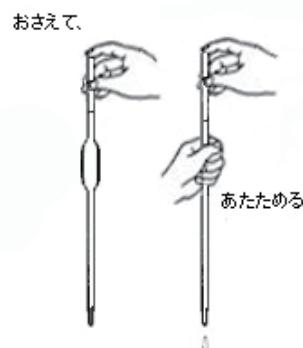
- ① ホールピペットを安全ピペッターの吸い口部分に約 5mm はめる.
- ② 弁 A をつまむと弁が開くので、ゴム球をにぎりつぶして内部の空気を抜く.
- ③ つぶれたゴム球がついたホールピペットを採取する溶液に浸し、弁 S をつまんで開き、ピペット内に溶液を吸い込む。溶液は標線よりも 2~3cm 上まで吸いこむ.
- ④ 弁 E を開いて溶液を排出し、メニスカスを標線に合わせる.
- ⑤ 採取した溶液を弁 E を開けて流出させる.
- ⑥ ピペット先端部にわずかに残っている溶液を完全に排出させるには、弁 E 部分を人差し指と、中指で挟み、親指で小ゴム球部の口を押さえて小球をつぶす。これは安全ピペッターを使用しないときに、上端をふさいで、ピペットの太い部分を手でにぎって温めて残った溶液を排出する操作に相当する(⑦に示す).



安全ピペッター

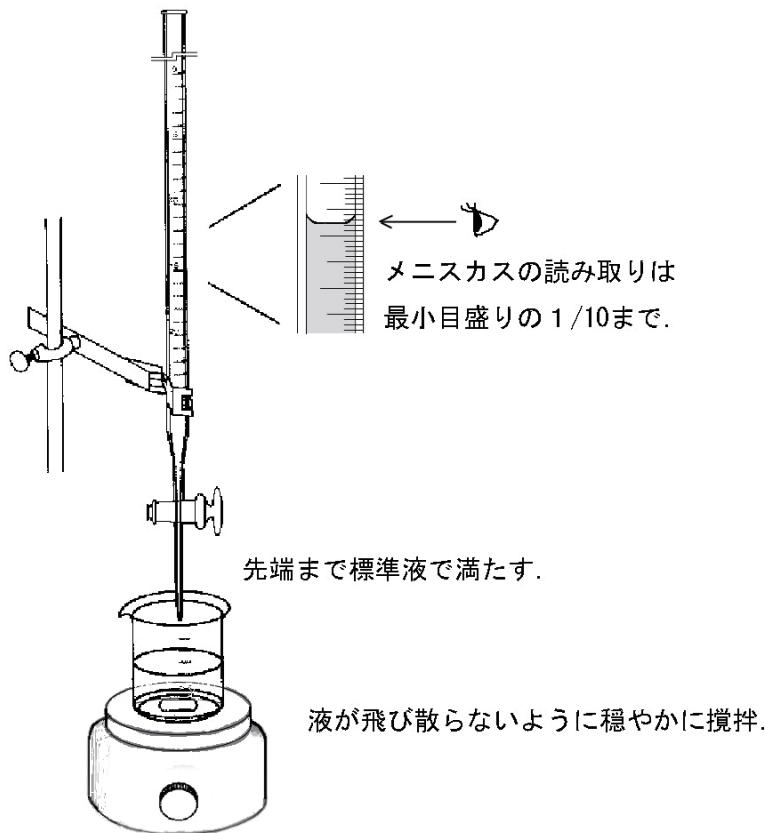


⑦



H. ビュレットの使い方

ロートは外す.



- ① まずビュレットは、(滴下する溶液の濃度を変化させないように) 使用する溶液で 2~3 回共洗いをする。
- ② ビュレットをスタンドに垂直に固定する。
- ③ ビュレットの上部に漏斗をつけ、標準液を 0.00 mL より上部約 2~3cm まで入れる。
- ④ ビュレットのコックを開き、気泡が入らないようにビュレットの先端まで、標準液で満たす。漏斗はつけたままだと系統誤差の原因になるので外す。
- ⑤ メニスカスを図のように真横から見て、コックを開き 0.00 mL の目盛りに正確に合わせる。
- ⑥ マグネチックスターーラーで試料溶液を攪拌しながら、標準液を滴下して滴定を開始する。
- ⑦ 当量点近くでは滴下をゆっくり、1滴ずつ行なう。より当量点近傍では1滴加えると当量をオーバーする。そのため、ビュレット先端から標準液を半滴出し、ビーカーの内壁を伝わらせて加える。
- ⑧ 最小目盛りの 1/10 まで滴定量を読みとる。メニスカスは常に図のように真横から見る。

I. 紫外一可視分光法

紫外一可視分光光度計は 200 nm～800 nm の間の波長を自動的に変化させ、各波長における吸光度(A)を自動的に測定する。200 nm(2×10^{-7} m)～400 nm(4×10^{-7} m)は紫外部領域であり、400 nm(4×10^{-7} m)～800 nm(8×10^{-7} m)は可視部領域である。吸収スペクトルで重要な分子からの情報は、吸収位置(λ_{\max})とモル吸光係数(ϵ)である。

λ_{\max} は電子励起のエネルギーに関係があり、吸収を示す発色団の種類を推定できる。発色団の種類は C=C, C=O, C=N, (CH=CH)_n などの不飽和結合であり、これらの基を有する分子は紫外・可視領域の光を吸収する。

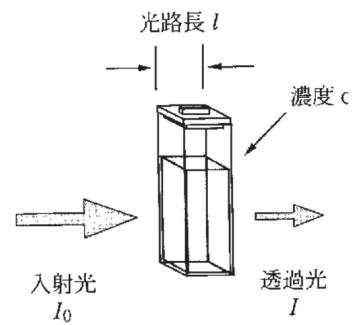
不飽和結合の共役系が伸長したり、NH₂ や OH のような助色団が共役系に結合すると、吸収は可視領域の方へ移動し ϵ も大きくなる。また、 ϵ は波長をきめれば、分子に固有の値であり、電子遷移の起こりやすさを示す。 ϵ の値が大きければ、光は強く吸収されることになる。モル吸光係数と発色団を有する物質の濃度の関係は **ランベルト-ベールの法則** ① によって示される。つまり、透過光の強さは光路長 ℓ が長くなるほど、濃度が高くなるほど指数関数的に小さくなる。

$$\text{透過率(transmittance)} = T = \frac{I}{I_0} \quad , \quad \text{透過パーセント} = T\% = 100 \times T \quad \text{とすると}$$

$$A = -\log T = -\log \frac{T\%}{100} = 2 - \log T\%$$

$$\text{吸光度(absorbance)} = A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = -\log T$$

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = k c \ell \quad \therefore \quad k = \frac{A}{c \times \ell} \quad \cdots \text{①}$$



①において、($c=1 \text{ w/v\%}$, $\ell=1 \text{ cm}$ のときの k) = $k_1 = E_{1cm}^{1\%}$ を**比吸光度**といふ。

すなわち、濃度 c_1 [w/v%], 光路長 ℓ [cm] に対して、

$$k_1 = E_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{c_1 \times \ell} \quad [(w/v\%)^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdots \text{②}$$

①において、($c=1 \text{ mol/L}$, $\ell=1 \text{ cm}$ のときの k) = $k_2 = \epsilon$ を**モル吸光係数**といふ。

すなわち、濃度 c_2 [mol/L], 光路長 ℓ [cm] に対して、

$$k_2 = \epsilon = \frac{A}{c_2 \times \ell} \quad [\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdots \text{③}$$

J. アマシャム社製分光光度計(Amersham ultraspec 1100pro)の使用法

I. 測定モードの選択

本体の電源ON(機器裏側), プリンター電源ON.

↓

OK("F2")を押してキャリブレーションが終了するまで数分間待つ.

↓

Absorbance 画面が表示される.

↓

Menu("F2")を押すと下記の画面が表示されるのでモードを選択する。たとえば、“1”を押せば Absorbance、“5”を押せば Wavescan の画面に移行する。

Absorbance=1

Transmission=2

Concentration=3

Time Intervals=4

Wavescan=5

II. 吸光度の測定(1=Absorbance)

Menu から “1”を入力して Absorbance モードに入る.

↓

λキーを押して波長を入力する。例えば、“λ 560 F3”と押す.

↓

リファレンス溶液(対照溶液)をいれ “H”を押す.

リファレンス値は取り直すまで保持される.

↓

サンプル溶液(測定溶液)を入れ、“◆”を押すと吸光度が測定されてプリントされる.

・ 必要なら次のサンプル溶液に入れかえて吸光度測定を繰り返す.

・ “▽”を押すと一段階前の画面に戻る.

III. 吸収スペクトルの測定(5=Wavescan)

Menu から “**5**” を押して Wavescan の画面に移行する.

↓

開始波長を入力する. 例えば、“**200 F3**” のように押して入力する.

↓

終了波長を入力する. 例えば、“**800 F3**” と入力する.

↓

リファレンス溶液を入れ、“**■**” キーを押すと 200~400 nm をスキャンする.

リファレンス スペクトルは別のリファレンスを取り直すまで保存される.

↓

測定試料溶液を入れ、“**◆**” キーを押す.

↓

表示されたグラフをプリントアウトする場合は “**•**” キーを押す.

- ・ ピークの位置や高さを確認するには “**F1**” もしくは “**F3**” キーを押してカーソルを移動する.
- ・ 特定の領域を拡大するには、“**F2**” を押して拡大したい領域の開始／終了波長を入力する.
- ・ “**▽**” を押すと一段階もどる.

K. 島津社製分光光度計(SHIMADZU UVmini-1240pro)の使用法

I. 測定モードの選択

本体の電源ON(機器裏側), プリンター電源ON

↓

初期設定が終了するとモード選択画面が表示されるので、1～5の項目番号を入力する。

1. フォトメトリック
2. スペクトラム
3. 定量
4. オプションプログラムパック
5. 装置条件

II. 吸光度の測定

モード選択画面から “1”を入力してフォトメトリック測定画面を表示する。

↓

“GOTO WL” キーによって波長を入力し、“ENTER”を押す。

↓

ABS モード画面(F1キーで透過率モード(T%)と吸光度モード(ABS)が交互に切り替わる)

↓

“F3” を押すして測定画面に切り替える

↓

ブランク試料をセットし “AUTO ZERO” を押す。 ピピピの音で完了する。

↓

測定試料をセットして “START/STOP” を押して吸光度 ABS を測定する。

↓

“PRINT” キーを押して画面の内容をを印刷する。 あるいはノートに測定値を記録する。

- ・ “RETURN” を押すと一段階前の画面に戻る。

III. 吸収スペクトルの測定

モード選択画面から “2” を入力してスペクトラム測定画面を表示する.

↓

“1” を入力して▲▼でABSを選択し、“ENTER”を押す.

↓

“2” を入力スキャンの範囲を入力する. たとえば、スタート波長 900 nm, エンド波長 300 nm ならば “900, ENTER, 300, ENTER”

↓

“3” を入力して吸光度の範囲を 0.00A~1.00A に設定する. “0.01, ENTER, 1.00, ENTER”

↓

“4” を入力して▲▼で中速を選択し、“ENTER”を押す.

↓

“5”よりスキャンの繰り返す回数を1回に設定する. “1, ENTER”

↓

“6” を押すと更新書きと重ね書きが交互に表示される. 更新書きにして“ENTER”を押す.

↓

リファレンス溶液を入れ “F1” を押してBase補正する. ピピピで完了.

↓

試料溶液を入れ “START/STOP” を押してスペクトル測定を開始する.

↓

測定スペクトルは “PRINT” キーで印刷する.

- ・ スペクトル表示範囲を変更して、1.0 > 吸光度(ABS) > 0.0; 600 nm > 波長(λ) > 400 nm とするには、“F1” → “1.0 ENTER” → “0.0 ENTER” → “600 ENTER” → “400 ENTER”と入力する.
- ・ ピーク (“F2”) を押すとスペクトル曲線のピークを検出して一覧表に表示できる.
- ・ “◀” あるいは “▶” を押してカーソルを移動すると、ピークの位置や高さを読み取れる.
- ・ “RETURN” を押すと一段階前の画面に戻る.

L. pHメーターの使用法

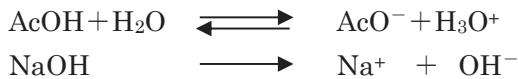
- ① 電源を入れる(10~15 分ウォームアップする).
- ② 測定レンジの設定(pH , mv) pH レンジとmv測定があるので pH レンジに設定する.
- ③ 温度補償の設定(ATC, MTC) 温度補償を自動で行なうか, 手動で行なうかをきめる.
- ④ 電極の飽和KC1溶液の補充口のゴムキャップをはずす.KC1溶液が少ない場合は補充する. 測定中はゴムキャップははずす.
- ⑤ 保護キャップをはずした電極を蒸留水でよく洗浄する, ろ紙を軽くあて電極の水分を完全に拭きとる.KC1補充口には蒸留水を入れないように注意する.
- ⑥ pHメーターの校正
 - i. ゼロ校正: 用意してあるリン酸標準液(pH 6.86, 25°C)に電極を浸す. メーターの指針が緩衝液の pH を正しく示さないときには, ZEROADJ. つまみを回してメーターの針を 6.86 に合わせる.
 - ii. スパン校正
電極をリン酸標準液から引き上げて, 蒸留水で洗浄し, ろ紙で電極の水分を完全に拭きとる. フタル酸標準液(pH 4.01, 25°C)に再び電極を浸す. メーターの指針が緩衝液の pH を正しく示さないときには, SENS ADJ. つまみを回してメーターの針を 4.01 に合わせる.
- ⑦ pHメーターの校正が終了後, 前述したように電極を洗って, 水分を拭きとり, 被検液の pH を測定する.
- ⑧ 測定終了後は電源を切り, 電極をきれいな蒸留水中に浸しておく.

〈使用上の注意〉

- ① 複合電極は高価なのでとり扱いには注意する. 特に電極先端部のガラス膜は厚さが薄いので, ビーカーの底にぶつけたり, かくはん子と接触して破損しないように注意する.
- ② 複合電極の先端にある液絡部(セラミック)は, 電極の内部液と被検液を接液させるものであり, ここまで被検液に浸っていないと正確な pH を測定することができない.

M. pHの計算

酢酸の濃度が C_a [mol/L]、水酸化ナトリウムの濃度が C_b [mol/L] である混合水溶液の水素イオン濃度を求めてみよう。 基本的には 5 つの溶質濃度 ($[H^+]$, $[OH^-]$, $[AcOH]$, $[AcO^-]$, $[Na^+]$) の間の関係式①~⑤を連立方程式として $[H^+]$ を求めればよい。



$$(水のイオン積) \quad [H^+] [OH^-] = 1.00 \times 10^{-14} \quad \textcircled{1}$$

$$(解離定数) \quad \frac{[H^+] [AcO^-]}{[AcOH]} = K_a = 1.75 \times 10^{-5} \quad \textcircled{2}$$

$$(電荷収支) \quad [Na^+] + [H^+] = [AcO^-] + [OH^-] \quad \textcircled{3}$$

$$(物質収支) \quad C_b = [Na^+] \quad \textcircled{4}$$

$$C_a = [AcOH] + [AcO^-] \quad \textcircled{5}$$

$$\textcircled{3}\textcircled{4} \text{より}, \quad [AcO^-] = C_b + ([H^+] - [OH^-]) \quad \textcircled{6}$$

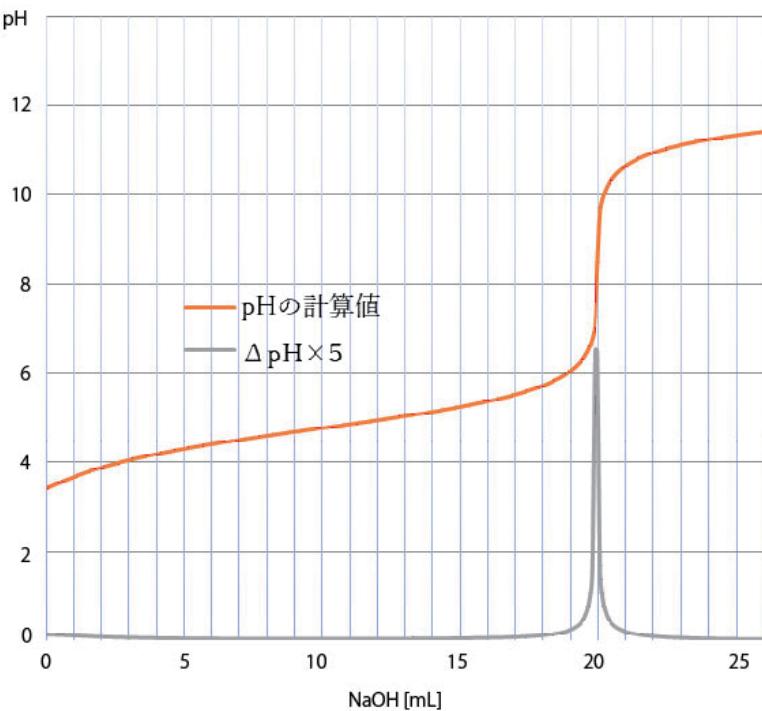
$$\textcircled{5} \text{に代入}, \quad [AcOH] = C_a - [AcO^-] = (C_a - C_b) - ([H^+] - [OH^-]) \quad \textcircled{7}$$

$$\textcircled{6}\textcircled{7} \text{を}\textcircled{2} \text{に代入}, \quad \frac{[H^+] \{ C_b + ([H^+] - [OH^-]) \}}{(C_a - C_b) - ([H^+] - [OH^-])} = K_a \quad \textcircled{8}$$

$$\therefore [H^+] (C_b + [H^+] - [OH^-]) = K_a (C_a - C_b - [H^+] + [OH^-])$$

$$\therefore [H^+]^3 + (C_b + K_a) [H^+]^2 + (K_a C_b - K_a C_a - K_w) [H^+] - K_a K_w = 0 \quad \textcircled{8}'$$

すなわち、3 次方程式 $\textcircled{8}'$ を解けば $[H^+]$ を求めることができる。 下図は中和曲線で、0.01 mol/L の酢酸水溶液 200 mL に、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 0.1mL ずつ滴下したとして、 $\textcircled{8}'$ によって $[H^+]$ を求め、その値を pH に変換してプロットしたものである(薬学実験実習の実験 3a の机上実験)。 計算によれば 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 19.9mL 滴下した時に $pH = 7.056$ となり、20.0mL 滴下時には $pH = 8.358$ である。 このとき、 pH 変化量は $\Delta pH = 8.358 - 7.056 = 1.303$ であり最大となっている。



このように多数の *pH* 計算をすることは、3次方程式を解くためのソフトウェア例えばエクセルアドイン EQ3D(© 2009 A. Kamegai)があれば難しくはない。以下に述べる三次方程式⑧を条件付きで二次方程式に近似する i)~iii) の方法は注意深く条件を選べば充分な精度の $[H^+]$ が得られるが、中和曲線を描くような目的にはかえって煩雑であろう。

i) $C_b = 0$ のとき、すなわち中和滴定開始前の酢酸水溶液の *pH* の計算は式⑧より、

$$\frac{[H^+]([H^+] - [OH^-])}{C_a - ([H^+] - [OH^-])} = K_a \quad ⑨$$

先ず、極端には酸は弱くないので、 $[H^+] \gg [OH^-]$ として、⑨は

$$\frac{[H^+]^2}{C_a - [H^+]} = K_a \quad \therefore \quad [H^+]^2 + K_a [H^+] - C_a K_a = 0 \quad ⑨'$$

更に、極端に酸が強くないので、 $C_a \gg [H^+]$ とすれば、⑨' は、

$$\frac{[H^+]^2}{C_a} = K_a \quad \therefore \quad [H^+] = \sqrt{K_a C_a} \quad ⑨''$$

ii) $C_b \sim (1/2)C_a$ のとき、即ち半中和点付近の緩衝作用が顕著な領域の pH 計算に関しては、先ず、極端に酸は弱くないので、 $[H^+] \gg [OH^-]$ として、式⑧より、

$$\frac{[H^+](C_b + [H^+])}{(C_a - C_b) - [H^+]} = K_a \quad ⑩$$

$$\therefore [H^+]^2 + (C_b + K_a)[H^+] - (C_a - C_b)K_a = 0 \quad ⑩'$$

更に、極端に酸が強くないので、 $(C_a - C_b), C_b \gg [H^+]$ とすれば、⑩' は、

$$\frac{[H^+]C_b}{(C_a - C_b)} = K_a \quad \therefore [H^+] = \frac{(C_a - C_b)}{C_b} K_a \quad ⑩''$$

同じ溶液は酢酸と酢酸ナトリウムの混合溶液とも考えられる。⑩''において $C_a - C_b = C_{acid}$, $C_b = C_{salt}$ とおいたときの pH を与える式: $pH = pK_a + \log(C_{salt}/C_{acid})$ は Henderson-Hasselbalch の式と呼ばれる。この式は一般に共役の弱酸・塩基対の溶液の pH は、用いられた酸と塩基の濃度によらず濃度比の対数に依存しており、この比を変化させると任意の pH の溶液を調整できることを示している。

iii) $C_b = C_a$ のとき、すなわち中和点の弱酸の強塩基の塩の水溶液の pH の計算は⑧より、

$$\frac{[H^+] \{C_b + ([H^+] - [OH^-])\}}{-([H^+] - [OH^-])} = K_a \quad ⑪$$

先ず、極端に塩基性が弱くないので、 $[OH^-] \gg [H^+]$ として、

$$\frac{[H^+] (C_b - [OH^-])}{[OH^-]} = K_a \quad \therefore [OH^-]^2 + K_b [OH^-] - C_b K_b = 0 \quad ⑪'$$

更に、極端に塩基性が強くないので、 $C_b \gg [OH^-]$ とすれば、

$$\frac{[H^+] C_b}{[OH^-]} = K_a \quad \therefore [OH^-] = \sqrt{K_b C_b} \quad \text{or} \quad [H^+] = \sqrt{\frac{K_a K_w}{C_b}} \quad ⑪''$$

N. ロータリーエバポレーターの使い方

ロータリーエバポレーターの回転軸は共通摺合わせガラス管になっていて、そこにフラスコをはめる。 フラスコを減圧にして回転させることで、減圧濃縮を行なうことができる。 フラスコの回転によりフラスコの内側に溶媒の薄膜をつくり蒸発面積を大きくして蒸発効率を上げている。 除去する溶媒の沸点によって水浴の温度を調節しながら減圧濃縮ができる。 蒸発した溶媒が冷却器で冷やされて、液化して溶媒回収フラスコにたまる仕組みになっている。 溶媒の蒸発とともに結晶が析出する場合や液量が多すぎると突沸したものが冷却器中に入ることがある。 それを防ぐためには、トラップを回転軸にとりつけ、トラップに蒸発フラスコをつける。 減圧下の濃縮のため、溶媒は沸点以下の低温で濃縮でき、比較的不安定な物質の濃縮操作にも使用できる。

- ② 濃縮する液をナス型フラスコに 1/3 程度入れる。 フラスコを回転軸にとりつけ、クランプでとめる。
- ③ 冷却水の循環と、ウォーターバスの水温を確認し、減圧ポンプを稼動させ、リークコックを開じてフラスコを回転させる。
- ④ ジャッキ を操作して、突沸に注意しながら徐々に蒸発フラスコをウォーターバス中に沈める。
- ⑤ 濃縮が終了したら、ジャッキで蒸発フラスコをウォーターバスから引き上げ、回転をとめる。
- ⑥ リークコックを開き、減圧ポンプを止めて、フラスコ内部を常圧にもどしてから、クランプをとり蒸発フラスコをはずす。 ロータリーエバポレータからフラスコを外す時に、フラスコの口を持って引き抜いてはならない。 フラスコが外れた拍子に水浴の縁にツツけて壊すだけでなく怪我もしかねない。 フラスコの口付近の回転シャフトを握り締めて「親指と人差し指の付け根でフラスコの口の縁を押す」ようにすると安全に外せる。

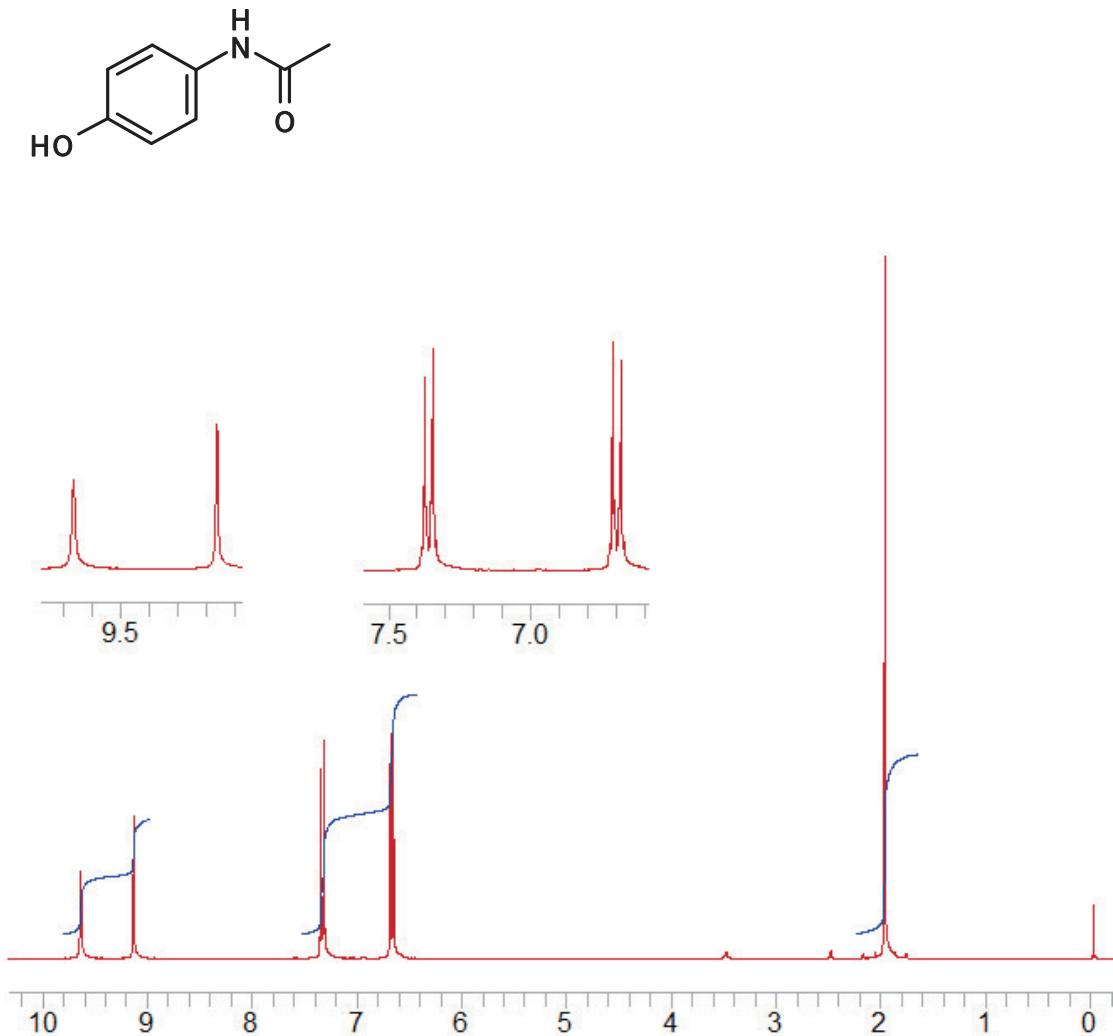
ロータリーエバポレーターの減圧ポンプ： ダイヤフラムポンプが使われることが多いようです。 大きくて精度のよい金魚ポンプを逆につないだと思ってください。 また、アスピレーター（水流ポンプ）も使われることがあります。 これは、細いノズルから噴出する水流が空気を巻き込んで運ぶことを利用してお、条件がよければ 10~15mmHg まで減圧します。

O. プロトン核磁気共鳴スペクトル($^1\text{H-NMR}$)

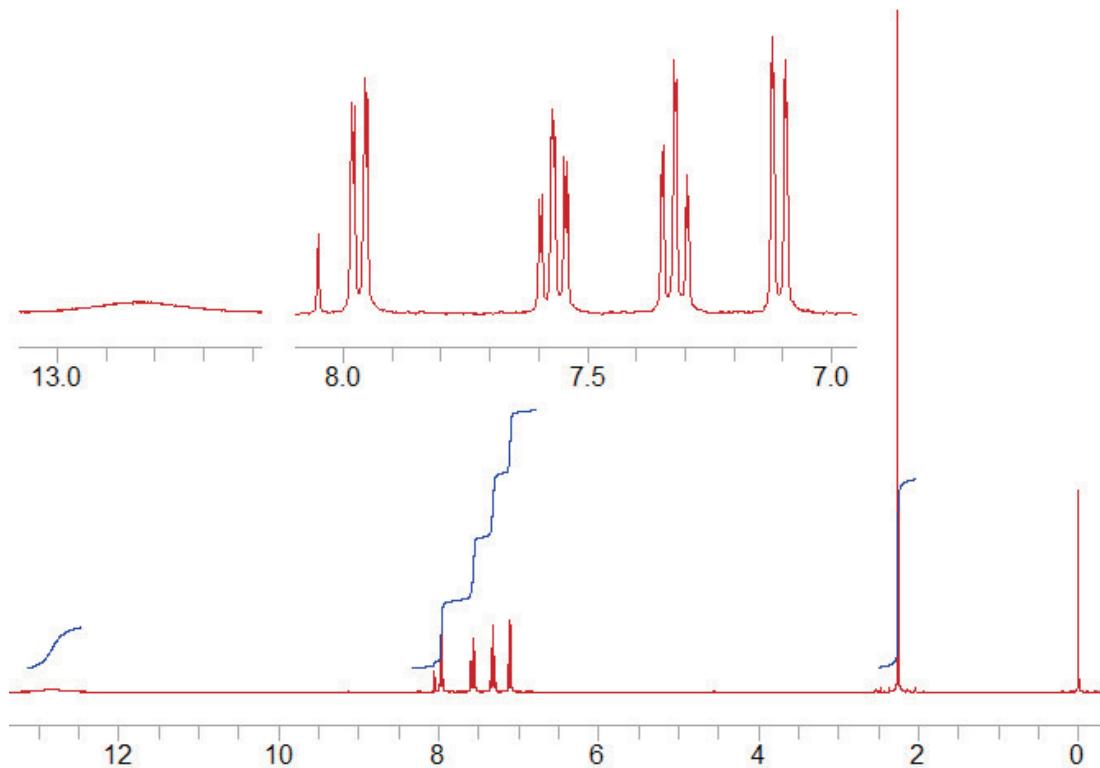
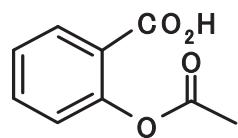
化学シフト δ ：より強い磁場にあるプロトンは、より高波数(スペクトルの左)で共鳴する。即ち、磁場を遮蔽する電子密度が低かったり、局所的に磁場が強くなる環境では、プロトンシグナルはスペクトルの左側にシフトする。

スピン結合定数 J ：化学シフトの異なるプロトンが4結合以内にあれば、1つ当たりシグナルは2分裂する。化学結合数2, 3, 4の順番にスピン結合定数は小さくなる($J_{\text{gem}} > J_{\text{vic}} \gg J_{\text{ir}}$)。

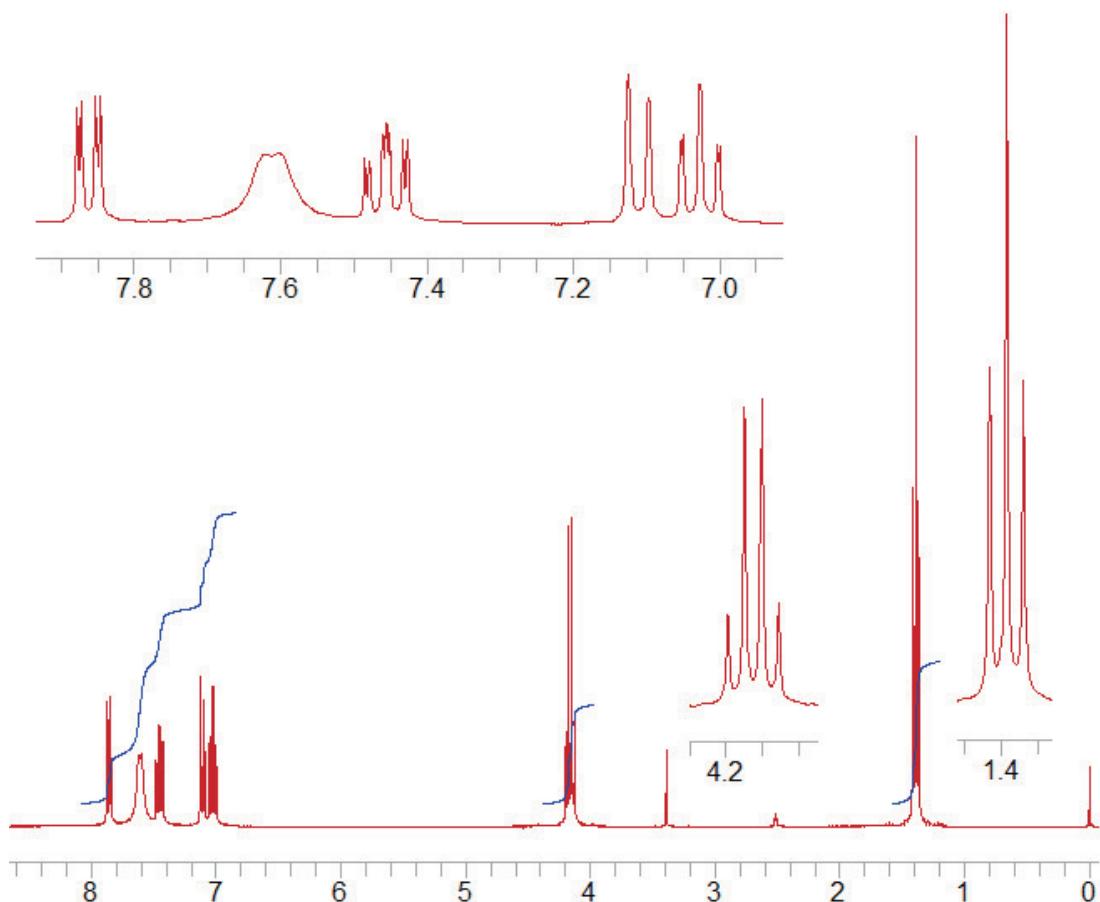
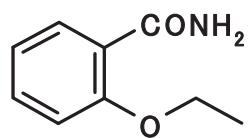
アセトアミノフェン：DMSO-d6, 300 MHz $^1\text{H-NMR}$



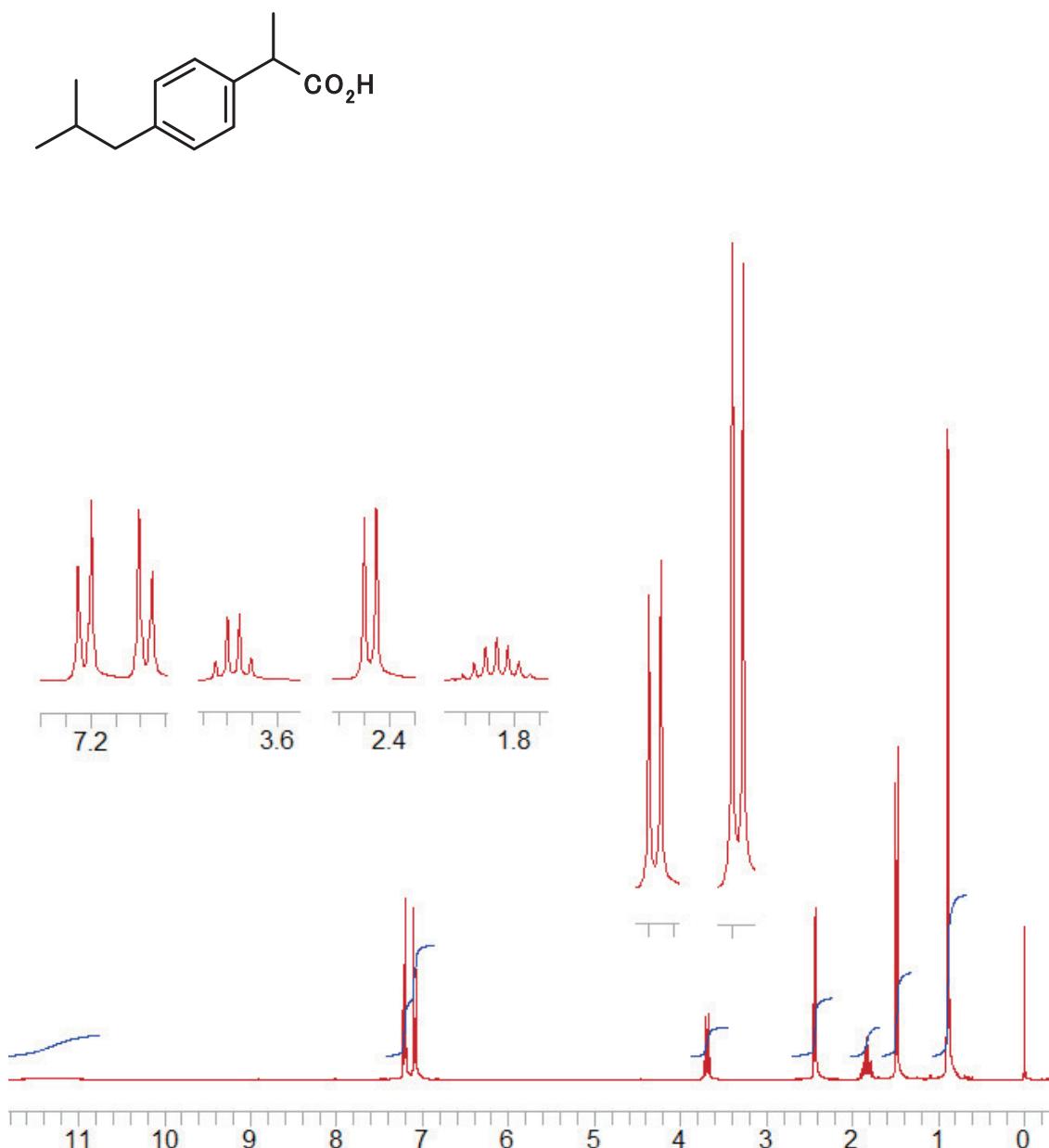
アスピリン: CHCl₃ & DMSO-d6, 300 MHz



エテンザミド: DMSO-d6, 300 MHz



イブプロフェン: CHCl₃, 300 MHz



P. 実験ノートの書き方

1. 糸綴じの大学ノート(B5判)を使用します。出納帳簿と同じでページを破りとつてはいけません。
また、ルーズリーフは容易にページ差し替えができるため実験ノートなどに使用されることはありません。
2. 実験ノートへの記載は、下記のように見開きにして左右両ページを目的に応じて使用すると便利です。ボールペンで記入します。鉛筆記入は不可。これは鉛筆書きの出納帳簿がないのと同じ理由です。
3. 訂正が必要なときは二重線で「見え消し」にします。ホワイトアウトは使いません。
4. 効率的に手早く実験をすすめるには、先ず実験の流れとか手順を左のページに記入し全体の実験操作を把握しておきます。実験中には融点とかいろいろな観察事項をそのつど書き入れてゆく様にします。
5. 実験ノートは実験中につけること。実験終了後に実験ノートを造っている人がいますがこれはいわゆる二重帳簿に当たります。実験ノートに書かれていないことは実験事実としては認知されません。
6. 実験テーマが終了したら記憶が新たな当日のうちに実験ノートをもとに実験データを整理してレポート作成の準備をしておくこと。

左ページ

- ① 実験題目
- ② 原理、目的：レポートを作成のための参考情報を調べておく。
- ③ 器機、器具：原理、使用法、使用目的 試薬の性質など。
- ④ 実験操作：実験手順をフローチャート形式で、あらかじめ書いておく。絵や矢印で書いてあるほうが実験手順がわかりやすい。決まった書き方は無いし、清書する必要はない。自由に書くこと。
- ⑤ 結果の予測：合成実験なら試薬を加えると、どのような反応が起こり、どのような変化が観察されるハズかを調べておく。中和滴定実験なら酸を何 mL 加えると pH ジャンプが起こるか理論計算をしておく。内容の理解ができていると観察に余裕が生じ、予期しない結果にも対応可能となる。さらに実験時間を節約できる。
- ⑥ 参考資料：①～⑤において参考にした文献、参考書等の引用箇所がわかるようにページの最後に番号を付して並べる。

右ページ

- ① 実験日時、共同実験者。必要に応じて天候、気温、湿度、気圧などなんでもいい。
- ② 教員の注意事項、ガイダンス内容、実習の変更点。
- ③ 実験に使用する機器の概念図や組み立てた装置図を描く。機器のメーカー・型式・試薬の純度、チャートを貼り付ける場所。
- ④ 実験過程：自分たちの行なった実験操作、また、実験操作に伴って観察された事項をフローチャートと対応させて、忠実に記載する。自分たちが行なった操作、結果は、必ずしも左ページに計画したフローチャートと一致するとは限らない。あくまでも自分が行なった操作をありのまま記載する。化学反応は時間が重要なファクターとなるので、時間の経過による観察事項は、時間とともに記録する。予想される結果と異なった場合はよく観察し考えられる原因などをメモしておくとよい。安易にやり直しを申し出ない。失敗した実験や予想と異なる結果の記載は当然のことながら消去してはいけない。記載した観察事項の訂正の場合は、もとの記載が判明できるように、二重線などを引いて訂正するとよい。
- ⑤ 長時間にわたる測定はリアルタイムで測定値をチェックし、正常な実験進行を確かめる。また、理論収量などの計算もする。収率が悪い場合は、考えられる原因をすぐ書いておく。時間がたつと失念する。
- ⑥ レポート作成準備：レポートに記載すべき材料を、まとめておく。レポートを書く際に、実験ノートのみの資料で事足りるようにレポートの下書きになるよう準備するとよい。

Q. レポートの書き方

実験レポートは誰が読んでも読みやすく、理解しやすく、簡潔にまとめてください。レポートは実験ノートと異なり、実験者の目的、観察、考察、結論という各過程を第三者に明確に伝えるようにしなくてはなりません。自然科学の研究論文には、おおむね一定の書式があります。この方式に準じると本格的な実験レポートの書式は下記のようになります。しかしながら、学生実験のレポートでは実験内容に対する理解度を伝えるのが重要ですから、その辺をしっかりと書くようにして、形式はかなりの程度まで簡略化して書いてかまいません。

- ① 実験テーマ： 実習書に記載のテーマでよいが、簡潔でわかり易い副題があつてもよい。
- ② 実験日
- ③ 実験者、共同実験者名：あたりまえですが実験していない人は共同実験者ではありません。
- ④ 要約(abstract)： 内容が一目でわかるように実験目的や結果も含めた概要。5~6行程度
- ⑤ 緒言(introduction)： 実験の概略を紹介する。原理や予想、さらにそのテーマの背景、科学における位置づけなど。
- ⑥ 実験の部(experimental section)： 実験の流れに沿って、一操作ごとに段落を切って、実験操作・観察事項を簡潔な文章で書く。実習書を写すのでは意味がない。記載事項：試薬、器具・装置、注意すべ実験操作など／試薬、溶媒の量、反応時間、温度など特に標準手順から外れているものは全て／機器使用の場合は、測定条件(波長、濃度、温度)、機器名、型など。
- ⑦ 結果(results)： 各実験段階の観察結果、測定結果に基づいて、総合的に解析をして最終結果を書く。測定値、データの計算結果、グラフを書き入れる。合成実験では合成した物質の評価(融点、収率、純度)を書く。測定値、計算などは有効数字に注意をし、単位は明確に記入する。
- ⑧ 結論(conclusion)と考察(discussion)： レポートで最も大切な箇所であり、実験の目的に応じ、一連の実験を行なった結果に対する実験者の考えたことを述べる。結論の妥当性、文献値との差異、失敗および予期せぬ観察事項、誤差の理由などを結論と関連づけて記す。実験者としての最終結論をあくまでも客観的に筋道をたてて述べる。とんでもない間違いは論外だが毎年何人かにはすぐれた洞察がみられる。資料の丸写しは最も避けねばならず、また、個人的な感想も書くべきではない。
- ⑨ 参考文献と註： 文献番号を付してレポートの末尾にまとめて並べる。レポート中の引用した箇所に文献番号を示し、いつ見直しても、また誰が見ても文献の記載箇所にたどり着けるようにしておく。必要ならば註もここに入れる。

