

20130617 HPLC によるパラベンの分離

【目的】HPLC を用いて 5 種類のパラベンを分離する。

【実験・結果】手順は教科書の通りなので省略する。

HPLC 条件は以下の通り。

試料：各 1 mM パラベン 5 種混合溶液

注入量：5 μ L

HPLC 装置： Pump : JASCO PU-980

Detector : JASCO UV-970

Integrator : JASCO 807-IT

固定相：GL サイエンス InertSustain C18 (150mm \times 4.6mm i.d., 5 μ m)

移動相：MeOH-H₂O 系溶媒 (60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, v/v)

流速：1.0mL/min

検出波長：254nm

チャートスピード：5mm/min。ただし、MeOH-H₂O (60 : 40, v/v) を用いる時は 2mm/min。

ATTENUATION : 1024

(クロマトグラムは 10/3/022 の近藤のレポート参照。)

得られたクロマトグラムから求められるパラメーターは以下の通り。

	t _R	W _{1/2}	k'	N	α	Rs	k'評価	幅 mm
C1	3,8	0,11	1,27	6671				1,1
C2	5,5	0,15	2,27	7448	1,79	7,6		1,5
C3	8,8	0,25	4,25	6930	1,88	9,8		2,5
C4	15,4	0,38	8,17	9128	1,92	12,3		3,8
C5	28,5	0,77	15,95	7607	1,95	13,4	ピークが広い	7,7

	t _R	W _{1/2}	k'	N	α	Rs	k'評価	幅 mm
C1	2,8	0,10	0,65	4291			分離が悪い	1,0
C2	3,5	0,15	1,07	3002	1,64	3,3		1,5
C3	4,8	0,18	1,83	3886	1,70	4,5		1,8
C4	7,0	0,22	3,14	5556	1,71	6,5		2,2
C5	10,7	0,30	5,37	7080	1,71	8,5		3,0

	t_R	$W_{1/2}$	k'	N	α	R_s	k'評価	幅 mm
C1	2,3	0,09	0,34	3487			分離が悪い	0,9
C2	2,6	0,10	0,52	3625	1,52	1,9	分離が悪い	1,0
C3	3,1	0,11	0,82	4282	1,57	2,8	分離が悪い	1,1
C4	3,8	0,13	1,27	4796	1,56	3,8		1,3
C5	5,0	0,15	1,95	6075	1,53	4,8		1,5

表は上から順に移動相が MeOH-H₂O 系溶媒 (60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, v/v) のとき。

t_R は溶質がカラムから溶出された時間。

$W_{1/2}$ はガウス分布型のピークの時、左右の変曲点を通るような 2 本の接線を引いた時、それらがベースラインを切り取る距離を W としたとき、 $W = 1.7W_{1/2}$ で表される値。

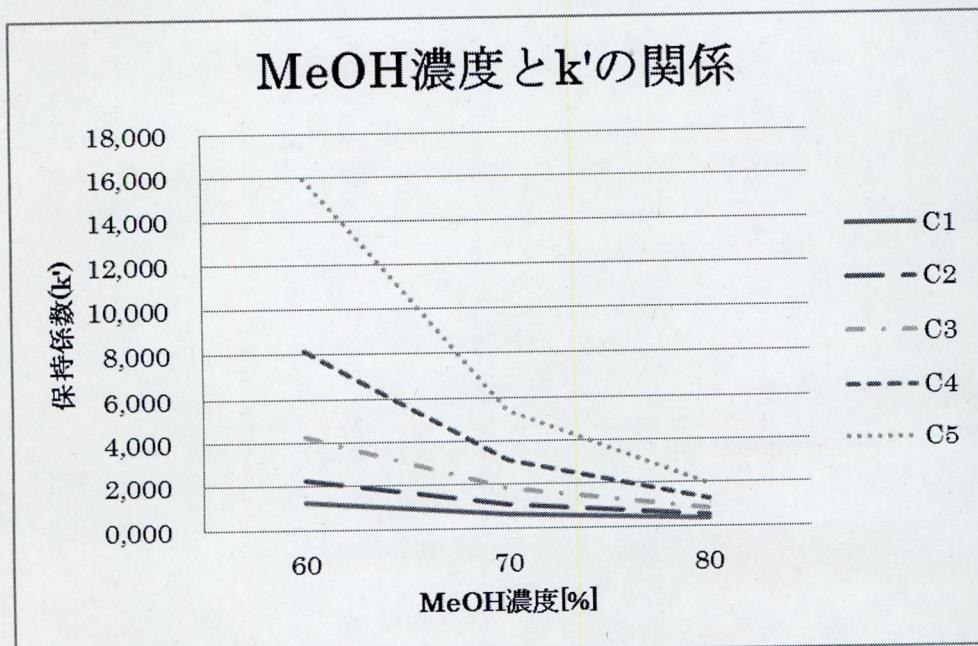
k' はカラムに保持されない成分がカラムの素通りにかかる時間を t_0 とした時に、 $k' = (t_R - t_0) / t_0$ で表される値。 $1 \leq k' \leq 10$ が最適範囲である。

N は $N = 5.54(t_R/W_{1/2})^2$ で表される値。

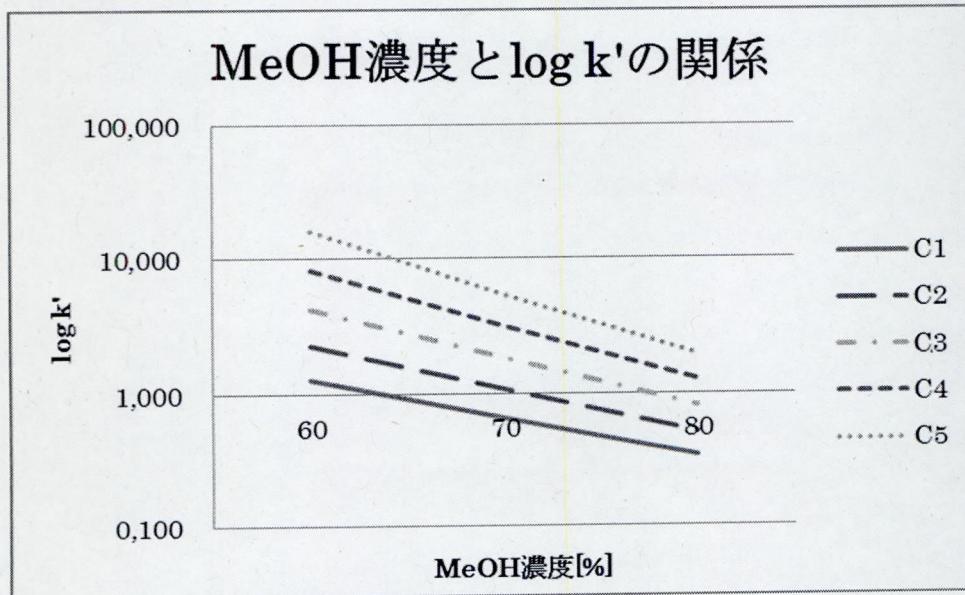
α は隣り合うピークの k' を k_1' 、 k_2' ($k_1' < k_2'$) とした時に $\alpha = k_2' / k_1'$ で表される値。

R_s は、 $R_s = \{N^{1/2}(\alpha - 1)k\} / \{4\alpha(k+1)\}$ で表される値。

MeOH 濃度と k' の関係は以下の通り。



また、MeOH 濃度と $\log k'$ の関係は以下の通り。



【考察】

①上のグラフより、水の割合を減らした時、つまり極性が小さくなつた時ほど保持係数も小さくなる。

② k' は大きすぎるとピークが広がり、小さすぎるとカラムで十分分離できていないため、 $1 \leq k' \leq 10$ が最適範囲である。また、 N は大きくなればなるほどピークが鋭くなるので分離が良くなる。 α は大きくなればなるほど隣との距離が遠くなるので分離が良くなる。 R_s はピークの広がり具合を考慮した上でのピークの離れ具合であり、1.5 よりも大きければ二つのピークは完全に分離されているものとできる。

③パラベンの分離を速くかつ良好に行うには、移動相の極性が低すぎるとうまく分離できないが、極性が高すぎても時間がかかるので、移動相の極性を適度に調節するべきである。あるいは、機器の方のカラムを長くし、充填剤を細くすることによっても、移動相が固定相に触れる部分の面積は大きくなるが、移動相が流れやすくなるので速く良好に分離ができると考えられる。

【課題】逆相分離は、カラム内に極性の低い充填剤を詰めて、そこに移動相を流すことでの極性の低い物質を充填剤に吸着し、極性の高い物質から順に溶出させる分離法である。ODS はシリカゲルの表面に大量の疎水性のオクタデシルシリル基が生えたものであり、この実験では極性の高い炭素数の多いパラベンをより強く吸着することで分離が行われた。

【感想】高速液体クロマトグラフィーのわりには待ち時間が長くて暇だった。

20130618 HPLC によるアミノ酸の定性

【目的】HPLC を用いてアミノ酸を定性する。

【実験・結果】まず、光学活性を考えずにダンシルアミノ酸を同定した。実験手順は教科書通りなので省略。

HPLC 条件は以下の通り。

固定相 : GL サイエンス InertSustain C18 (150mm×4.6mm i.d., 5 μ m)

移動相 : MeOH-H₂O (40 : 60) TFA0.1%

流速 : 0.8mL/min

検出波長 : 340nm

チャートスピード : 2mm/min

ATTENUATION : 8

(クロマトグラムは 10/3/02 の小峰 のレポート参照)

得られたクロマトグラムから求められる結果は以下の通り。

PEAK	t _R	AREA%	
1	2,0	23,1	DNS-OH
2	3,0	38,2	
3	3,6	8,9	Asp
4	4,5	9,9	Ser
5	5,0	9,9	Thr
6	7,4	10,0	Ala

PEAK	t _R	AREA%	
1	1,0	7,8	
2	2,0	27,3	DNS-OH
3	2,4	4,9	
4	2,6	10,0	
5	3,0	16,8	
6	3,5	15,1	
7	4,0	9,2	Asp
8	5,0	4,8	Thr
9	7,6	4,2	Ala

左が DNS-アミノ酸標準溶液、右が未知試料。以上の結果より、未知試料に含まれていたのは Asp, Thr, Ala である。

次に、光学異性体も含む別の未知試料のアミノ酸を同定した。実験手順は教科書通りなので省略。

HPLC 条件は以下の通り。

固定相 : GL サイエンス InertSustain C18 (150mm × 4.6mm i.d., 5 μ m)

移動相 : Ethanol 25%, 25mM CH₃COONH₄ buffer(pH5.5) 75%

1.0M Urea, 25mM β-Cyclodextrin

流速 : 0.65mL/min

検出波長 : 340nm

チャートスピード : 2mm/min

ATTENUATION : 64

得られたクロマトグラムから求められる結果は以下の通り。

(クロマトグラムは 10131021 の小峰のレポートを参照)

PEAK	tR	AREA%	tR/t10	
1~7	2.1~5.4	5,4		
8	8,9	3,4	0,89	D-Asp
9	9,4	3,6	0,94	L-Asp
10	10,0	70,1	1,00	DNS-OH
11	14,1	3,5	1,41	D-Ser
12	14,9	3,4	1,49	L-Ser
13	18,2	3,5	1,82	L-Thr
14	22,0	3,3	2,20	D-Ala
15	23,1	3,2	2,31	L-Ala

PEAK	tR	AREA%	tR/t10	
1~8	1.9~5.6	7,0		
9	9,6	8,5	0,95	L-Asp
10	10,1	74,7	1,00	DNS-OH
11	18,7	3,6	1,85	L-Thr
12	22,7	6,2	2,25	D-Ala

左が DNS-アミノ酸標準溶液、右が未知試料。以上の結果より、未知試料に含まれていたのは L-Asp,L-Thr,D-Ala である。

【考察】アミノ酸の極性を考えると、高い順に Ser,Asp,Thr,Ala であり、光学活性を考えなかつた場合、たしかにこの順に溶出している。一方で光学活性を考えた時は、D 体のほうが L 体よりも先に溶出している。その理由としては、移動相に含まれている Cyclodextrin も光学活性物質であるためアミノ酸の D 体と L 体とで親和性が違い、今回は β-Cyclodextrin のみを移動相に含んだので、より親和性の高い D 体は固定相に吸着されづらくなつたため、速く溶出したと考えられる。また、Asp と Sex の溶出順序が変わつたのも、Asp のほうが β-Cyclodextrin との親和性が高く、固定層に吸着されづらくなつたためだと考えられる。

【課題】HPLC によって光学活性化合物を分離するには、今回のように移動相に光学異性

体で親和性が異なる物質を用いるか、あるいは固定相に光学異性体で親和性が異なる物質を用いればよい。

【感想】それなりに早く終わったのでよかったです。

20130619 HPLC によるアミノ酸の定量

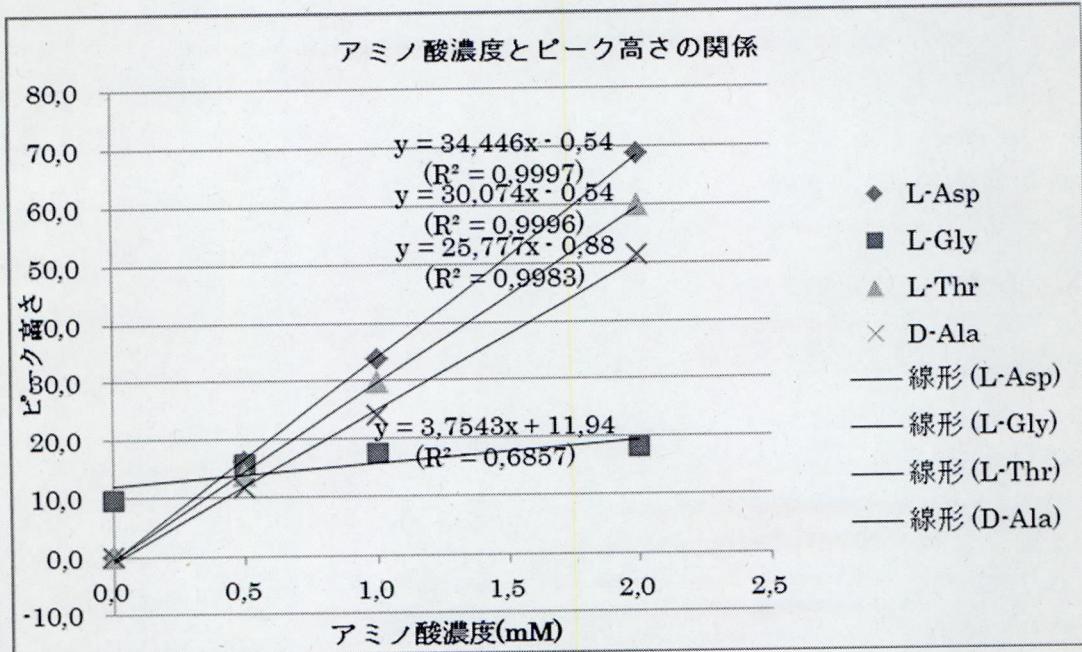
【目的】HPLC を用いて絶対検量線法と内部標準法によりアミノ酸を定量する。

【実験・結果】手順は教科書の通りなので省略。ただし、IS 溶液は 2.5mM の DNS-L-Pro 溶液ではなく、2.5mM の DNS-L-Gly 溶液を用いた。

(クロマトグラムは 10/13/2029 久保田のレポート参照)

得られたクロマトグラムから絶対検量線法を用いた定量の結果は以下の通り。

		DNS-アミノ酸濃度					
		0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	未知試料
ピーク 高さ	L-Asp	0,0	16,1	33,7	50,2	68,6	50,0
	L-Gly	9,6	15,8	17,4	13,5	18,1	16,9
	L-Thr	0,0	13,8	29,5	43,2	59,8	17,9
	D-Ala	0,0	11,5	23,9	37,0	51,3	27,5

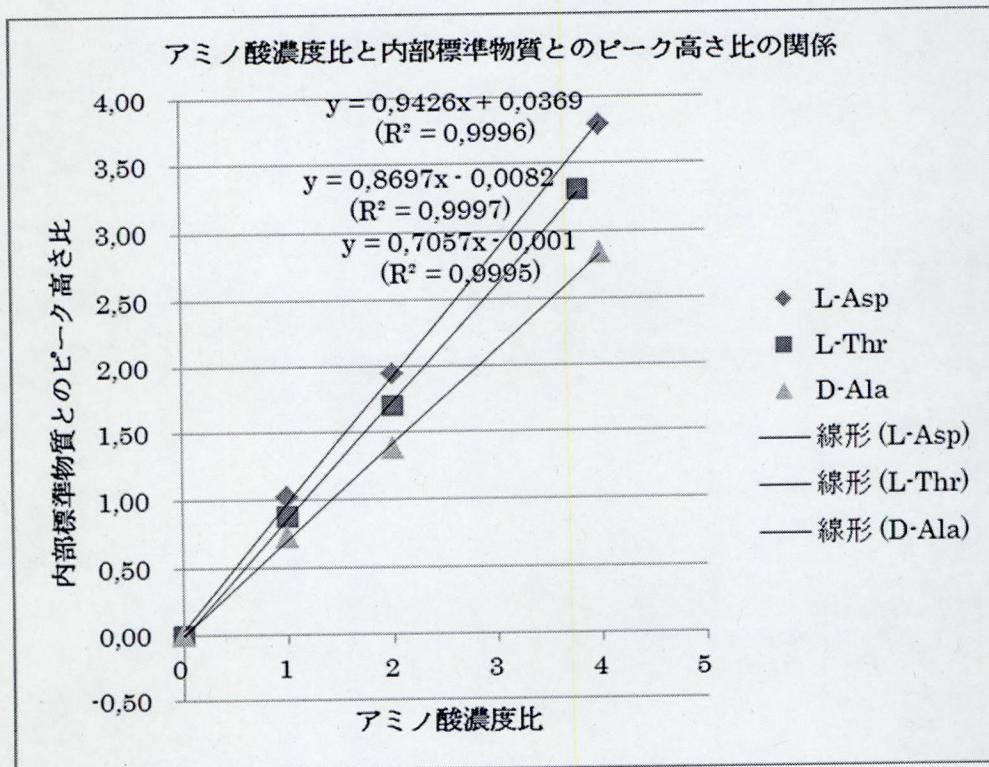


以上の結果より、絶対検量線法によって、L-Asp は 1.83mM、L-Thr は 0.77mM、D-Ala は 1.38mM とわかった。

(クロマトグラムは 10/13/10/20 のえ保田のレポート参照)

一方、得られたクロマトグラムから内部標準法を用いた定量の結果は以下の通り。

		DNS-アミノ酸濃度						
		0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
濃度比		0	1	2	3	4	未知試料	
ピーク高さ比	L-Asp	0,00	1,02	1,94	3,72	3,79	2,96	
	L-Thr	0,00	0,87	1,70	3,20	3,30	1,06	
	D-Ala	0,00	0,73	1,37	2,74	2,83	1,63	



以上の結果より、内部標準法によって、L-Asp は 1.94mM、L-Thr は 0.77mM、D-Ala は 1.44mM とわかった。

【考察】L-Thr は絶対検量線法でも内部標準法でも濃度が一致したが、L-Asp と D-Ala は絶対検量線法での濃度が内部標準法での濃度の 0.95 倍だった。この原因として、絶対検量線法で HPLC に注入する試料の量が微妙にずれたことが考えられる。

【課題】

- ① 試料のピーク高さは濃度だけでなく HPLC に入った試料の分量にも比例するので、入る量がずれてしまわないように注意しなければならない。
- ② 試料と化学反応を起こさず、かつピークが完全に分離している物質でなければならない。
- ③ 未知試料中に含まれている物質を定濃度ずつ添加していき、ピーク高さ（または面積）を縦軸に、添加した濃度を横軸にして検量線を作成すると、その検量線が横軸に交わる点から原点までの距離が求めるべき成分濃度として得られるという方法である。

【感想】 $5\mu\text{L}$ ぴったりを HPLC に入れるのが難しかった。

20130620 蛍光法

【目的】蛍光スペクトルを測定する。

【実験・結果】まず、ダンシルアラニンの蛍光を測定する。実験操作は教科書どおりなので省略。

測定条件は以下。

一般 測定モード：波長スキャン

装置 スキャンモード：励起スペクトル or 蛍光スペクトル

データモード：蛍光

(蛍光/励起) 波長：(蛍光/励起) スペクトルを見て入力

(励起/蛍光) 開始波長：220nm

(励起/蛍光) 終了波長：700nm

スキャンスピード：300nm/min

ホトマル電圧：400V

初期待ち時間：0sec

レスポンス：自動

励起側スリット：10nm

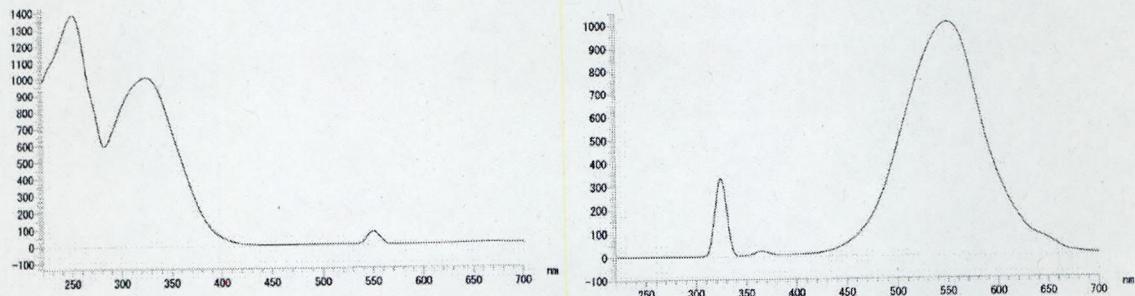
スペクトル補正：なし

蛍光側スリット：10nm

繰り返し：1

各スペクトルとその帰属は次の通り。

100mM ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.5)



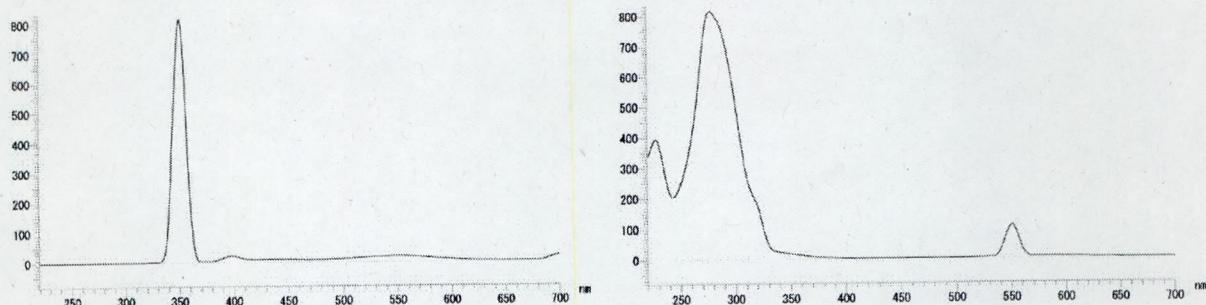
励起スペクトル(左, 蛍光波長 550.0nm)

No.	開始(nm)	ピーカ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	備考
1	220.0	250.5	282.5	1388	282.5	595.6	2まで上がったもの
2	282.5	323.5	450.5	1008	450.5	3.476	最大励起波長
3	450.5	511.0	532.0	6.773	532.0	5.449	散乱光 ラマン散乱光
4	532.0	550.5	570.5	82.32	570.5	3.569	レイト散乱光
5	570.5	665.5	700.0	14.75	700.0	14.02	最大励起波長の回折光(2次光)

蛍光スペクトル(右, 励起波長 324.0nm)

No.	開始(nm)	ピーカ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	備考
1	220.0	324.5	345.0	332.8	345.0	3.152	レイツ散乱光
2	345.0	365.0	385.0	21.27	385.0	6.381	ラマン散乱光
3	385.0	550.0	700.0	1006	700.0	4.983	最大蛍光波長

50mM リン酸二水素ナトリウム-リン酸緩衝液(pH2.2)①



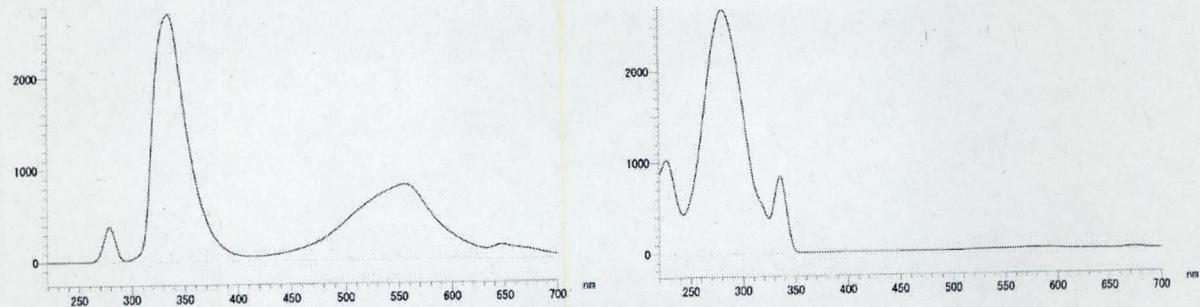
蛍光スペクトル(左, 励起波長 350.0nm)

No.	開始(nm)	ピーカ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	備考
1	220.0	350.5	370.5	816.9	370.5	3.891	レイツ散乱光
2	370.5	397.5	475.0	22.11	475.0	7.071	ラマン散乱光
3	475.0	549.5	673.5	17.73	673.5	0.444	最大蛍光波長

励起スペクトル(右, 蛍光波長 550.0nm)

No.	開始(nm)	ピーカ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	備考
1	220.0	228.0	242.5	395.5	242.5	205.7	2まで上がったもの
2	242.5	277.5	440.0	816.1	440.0	0.978	最大励起波長
3	440.0	462.5	484.0	2.124	484.0	0.867	ラマン散乱光
4	484.0	550.5	700.0	107.7	700.0	0.577	レイツ散乱光

50mM リン酸二水素ナトリウム-リン酸緩衝液(pH2.2)②



蛍光スペクトル(左, 勵起波長 278.0nm)

No.	開始(nm)	ビーグ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	説明
1	220.0	279.0	294.0	383.4	294.0	15.20	レイン-散乱光
2	294.0	334.5	416.0	2716	416.0	51.85	最大蛍光波長
3	416.0	556.0	632.5	813.0	632.5	106.1	アーロニ化されていない蛍光
4	632.5	647.0	700.0	148.4	700.0	37.81	2次光

励起スペクトル(右, 蛍光波長 335.0nm, しきい値 10.000)

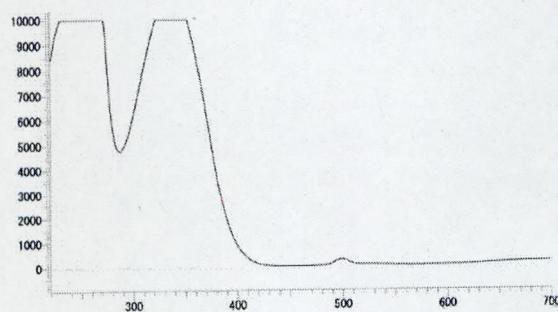
No.	開始(nm)	ビーグ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)	バーレー(nm)	バーレー(Data)	説明
1	220.0	227.0	243.0	1025	243.0	434.9	S_2 まで上がったもの
2	243.0	281.0	324.5	2685	324.5	379.0	最大励起波長
3	324.5	335.5	375.5	838.8	375.5	0.496	レイン-散乱光
4	375.5	576.5	653.0	17.30	653.0	2.885	2次光
5	653.0	673.0	700.0	17.33	700.0	0.653	感度がよすぎて 不要な ピークまで出た。

次に、DNS-アラニンの検量線を作成し、未知濃度の DNS-アラニン溶液の濃度を決定する。

実験操作は教科書通りなので省略。

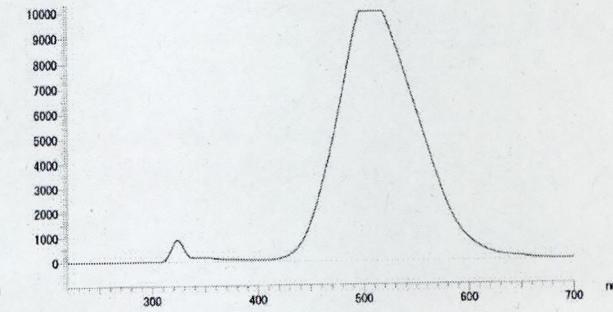
スペクトルと帰属は以下の通り。

アセトニトリル溶液



励起スペクトル(左, 蛍光波長 499.0nm)

No.	開始(nm)	ビーグ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)
1	220.0	230.5	286.5	*****
2	286.5	322.5	450.5	*****
3	450.5	499.0	569.5	298.7



No.	開始(nm)	ビーグ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)
1	220.0	230.5	286.5	*****
2	286.5	322.5	450.5	*****
3	450.5	499.0	569.5	298.7

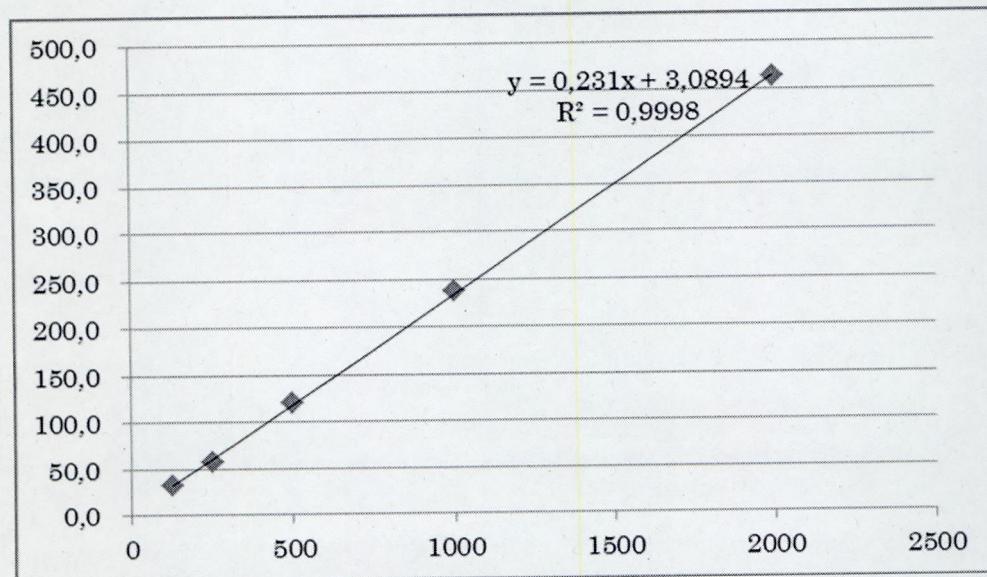
ノイズ上昇のため、286.5 nm 付近の値が不正確なため、他の値を用いて計算した。

蛍光スペクトル(右, 励起波長 323.0nm)

No.	開始(nm)	ビーグ(nm)	終了(nm)	高さ(Data)
1	220.0	324.0	341.0	888.2
2	341.0	347.0	407.5	161.1
3	407.5	498.0	700.0	*****

ノイズ上昇のため、324.0 nm 付近の値が不正確なため、他の値を用いて計算した。

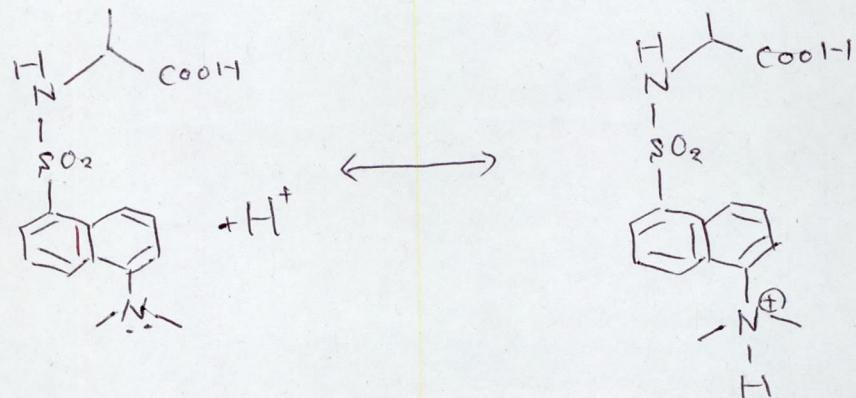
また、検量線は以下の通り。



濃度[nM]	蛍光強度 1	蛍光強度 2	平均
2000	510,8	416,4	463,6
1000	233,8	240,5	237,2
500	112,4	127,2	119,8
250	61,03	54,7	57,9
125	31,36	32,9	32,1
未知	145,1		

未知試料の濃度は 615nM と算出されたが、正しくは 400nM だった。

【考察】DNS-アラニンは、以下のように平衡をとり、酸性時は右側に平衡が移動する。



ホウ酸緩衝液は pH8.5 なので、おもに左側の状態になっており、ベンゼン環に結合している窒素の不対電子が共役を伸ばすが、リン酸緩衝液は pH2.2 なのでおもに右側の状態になっており、窒素の不対電子がなくなるので共役鎖が短くなり、エネルギー準位差が大きくなるので、スペクトルの波長がホウ酸緩衝液と比べて低波長側になっていると考えられる。

また、未知試料の濃度が実際よりも大きく算出されたのは、未知試料を入れる前のセルの洗浄が不十分だったことが原因として挙げられる。

【課題】①吸光法の長所は多くの物質に用いることができる点であり、短所は励起光と透過光を同じ方向で見るのでノイズが大きくなる点である。一方、蛍光法の長所は、励起光に垂直な向きからも蛍光を観測できるのでノイズが小さい点であり、短所は蛍光発生しない物質には用いることができない点である。

②励起波長は基底状態からエネルギーの高い準位へと電子を励起する時に吸収する光の波長であるが、蛍光波長はエネルギーが高い準位の中でも最も低い準位から基底状態に電子が戻る時に放出する光の波長なので、蛍光波長の方が電子の移動するエネルギー準位差が小さいから。

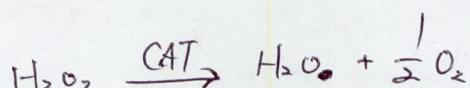
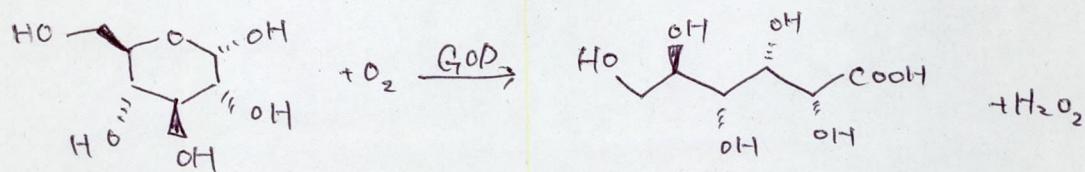
【感想】蛍光が緑色で綺麗だった。

20130621 キネシンの分子運動観察

【課題】

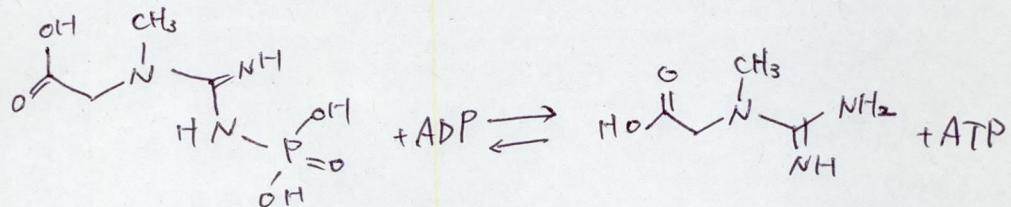
1. 脱重合を防ぐため。

2.



この2つの反応により、 $\frac{1}{2}$ molずつ酸素が消費される。

3.



筋肉、脳などに存在するクリアチニキナーゼは、クリアチニン酸からATPを合成する酵素である。

4. $50 \mu\text{M}$ のとき、 351nm/s

$25 \mu\text{M}$ のとき、 243nm/s

$10 \mu\text{M}$ のとき、 116nm/s

$5 \mu\text{M}$ のとき、 21.5nm/s

5. $5 \mu\text{M}$ のときのキネシンの運動速度はキネシンが古くなつて動きが鈍くなつたため考慮せずに、 $50 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ の時のキネシンの運動速度を Lineweaver-Burk plot に代入すると、 $K_m = 55.6 \mu\text{M}^{-1}$ 、 $V_{max} = 769\text{nm/s}$ と求められる。

【感想】キネシンの観察はたのしかったが綺麗なTAさんの班じゃなかったのは残念だった。

20130622 吸光法

【目的】吸光法について学ぶ。

【実験・結果】まず、メチルオレンジとメチルレッドの吸収スペクトルを pH2~7 の範囲で測定する。実験手順は教科書通りなので省略する。

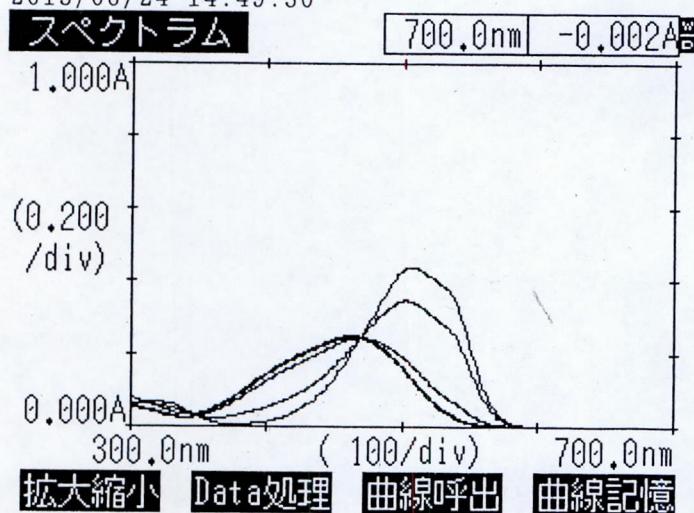
スペクトル測定条件は以下の通り。

測定波長：300~700nm

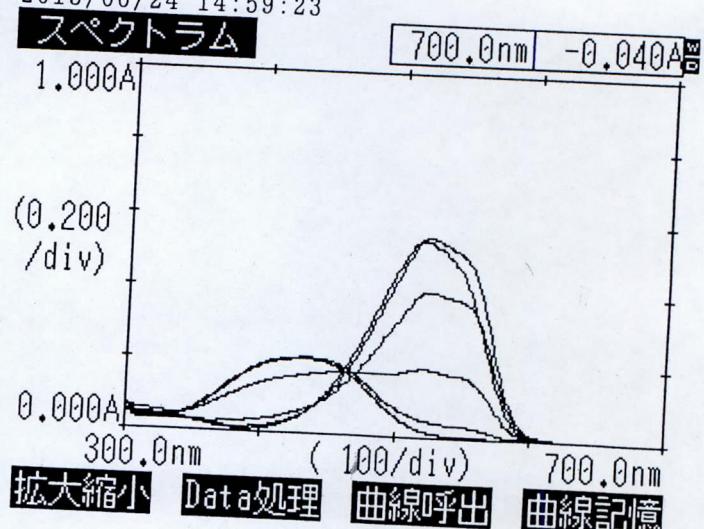
吸光度スケール：0.000~1.000

スペクトルは以下の通り。

2013/06/24 14:49:30



2013/06/24 14:59:23



(左が“メチルオレンジ”，右が“メチルレッド”)

メチルオレンジの pH2 のときの最大吸収波長は 508nm、吸光度は 0.439、pH7 のときの最大吸収波長は 464nm、吸光度は 0.247 だった。メチルレッドの pH2 のときの最大吸収波長は 432nm、吸光度は 0.205 だった。520nm、吸光度は 0.541、pH7 のときの最大吸収波長は 432nm、吸光度は 0.205 だった。

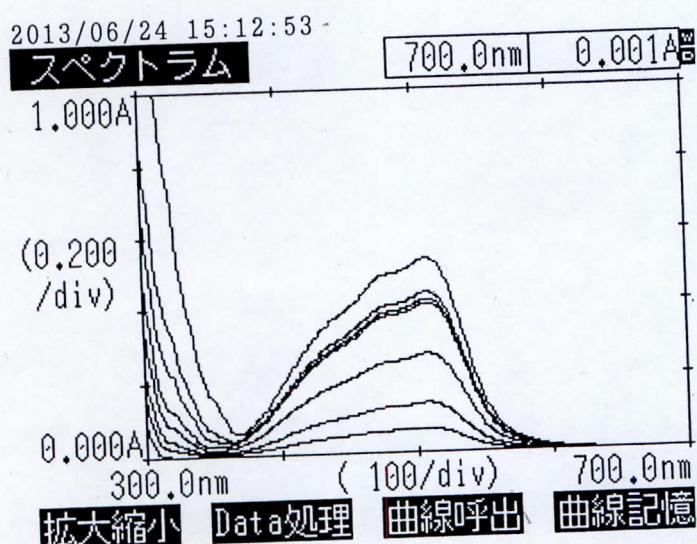
次に、吸収スペクトルから錯体の構造を決定した。手順は教科書の通りなので省略する。

スペクトル測定条件は以下の通り。

測定波長：300～700nm

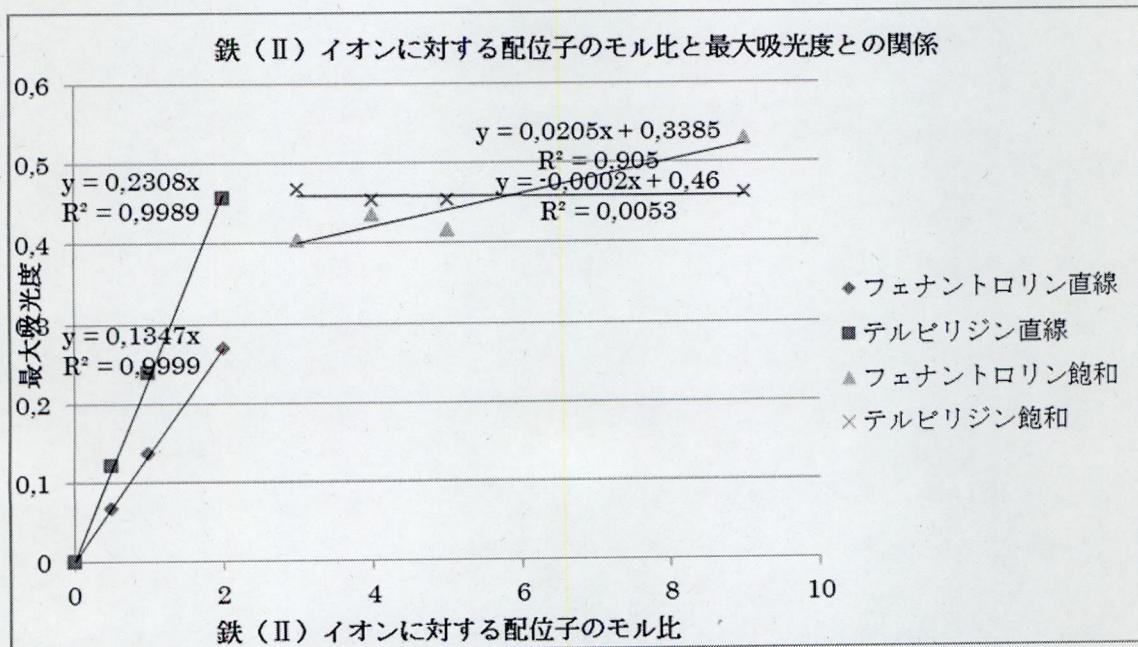
吸光度スケール：0.000～1.000

スペクトルは以下の通り。
(左がフェナントロリン、右がテリピリジン)



また、それから得られた吸光度、さらにそれをまとめたグラフは以下の通り。

Ligand [uL]	Abs. [a.u.]	
	Phenanthroline	Terpyridine
0	0	0
0,5	0,066	0,121
1	0,136	0,239
2	0,269	0,456
3	0,404	0,468
4	0,436	0,453
5	0,416	0,454
9	0,529	0,461
	510nm	552nm



以上のグラフより、フェナントロリンは3配位、テルピリジンは2配位と考えられる。

【考察】金属錯体の構造決定のスペクトルにおいて、300nm付近にピークが出ているが、これは配位子の吸光波長のピークだと考えられる。

【課題】

II-1-1 (1) 光が言式料斗を透過するとき、微小距離 dx 部分への入射光の強度を I_{in} 、透過光の強度を I_{out} とすると、 $I_{out} = I_{in} \cdot dI_x$ となる。
このとき、 α を定数として、 $dI_x = \alpha I_{in} dx \Leftrightarrow \frac{dI_x}{dx} = \alpha I_{in}$ となる。
これを積分すると、 $\frac{I_{in}}{I_{out}} = 0.4343 \alpha l$ となる (l :光路長)
 $\frac{l_{in} I_{in}}{I_{out}} = A$, $0.4343 \alpha = a$ とし、また、 a は濃度が小さいほど濃度に比例するので、 $a = \epsilon c$ となる。 $(\epsilon: 比例定数(モル吸光係数), c: 濃度)$
 $\therefore A = \epsilon c l$ となる。これが Lambert-Beer の法則である。

(2) 最大吸収波長に関しては、【実験結果】で述べた通り。

モル吸光係数は、濃度 1.00×10^{-5} mol/l, 光路長 1.00 cm より。

Xantholuid "が pH 2 のとき 5.41×10^4 , pH 7 のとき 2.05×10^4

Xantholuid " pH 2 のとき 4.39×10^4 , pH 7 のとき 2.47×10^4 となる。

(3) 褐色 "430~480 nm の光は青色、500~560 nm の光は緑色に見える。

いま、Xantholuid, Xantholuid "とともに、pH 2 のときは緑の光と、pH 7 のときは青の色を吸収している。色は物質が反射する光の波長なので、pH 2 のときは緑の補色の赤紫色に、pH 7 のときは青の補色の黄色に見える。

(4) 吸光度は、 $A = \varepsilon_1 C_1 l + \varepsilon_2 C_2 l + \dots + \varepsilon_n C_n l$ と表せる。(ただし、n通りに物質が変化する時)

$$A = (\varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2 + \dots + \varepsilon_n C_n) l \quad \text{つまり} \quad C_1 + C_2 + \dots + C_n = (\text{一定}) \text{ より}.$$

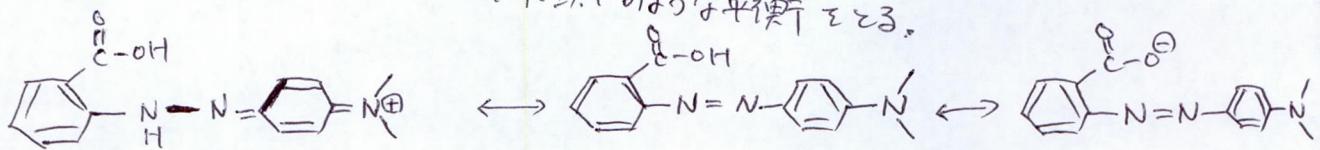
$$\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = \dots = \varepsilon_n$$

等吸収点を持つ。

(5)

実際には、 ε は波長によつて変化する。
 $\varepsilon_1 = \varepsilon_2$ となる波長が存在するが、3種類以上に物質が変化しないならば、
 ε が一致する波長が存在することはあつたにな。

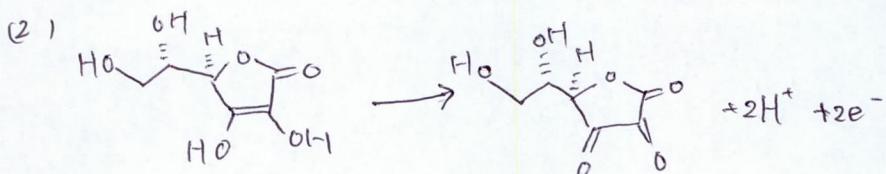
メルレット、メロニシイ。以下のような平衡である。



メルレットは3種に変化するので等吸収点を持たないが、メロニシイは2種に変化するので等吸収点を持つ。

II-1-2

(1) pHが低すぎると配位子のNがプロトニ化し、pHが高すぎると鉄(II)が酸化されてしまう。



L-アスコルビン酸は上記のように還元剤としてはたらく。代わりとなる物質としては、水に可溶であり、スペクトル影響を与えない（無色）ものである。pHをあまり変えない還元剤としてH2O2などが考えられる。

(3) ~~→~~

1,10-フェニレン



テレペニシン



(4) 可能である。ただし、1イズの影響が相対的に大きくなるので、正確な測定は難しくなる。

【感想】

メルオレンジとメルレッドの色のグラデーションがきれいだった。