

実習レポート 分析化学教室

10191043 鈴木健一

実験 I-1 HPLC の基礎

実験日：2019/6/12

実習班：8 班

目的

ODS カラムを用いた逆相分離を行う。逆相の考え方を理解するとともに、HPLC で用いられる各種パラメーターの算出方法、分離に影響を及ぼす諸因子について考察する。

実験方法

実習書に従って行った。

HPLC 条件

- 試料：各 0.5 μ M パラベン 5 種混合資料
- 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 Inert Sustain C18 (150 mm x 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 程度。ただし、MeOH-H₂O(60:40,v/v) を用いる場合には 2mm/min でよい。
- ATTENUATION：1024 程度

結果

クロマトグラムは代表者の物を参照

MeOH : H₂O = 60 : 40

- チャートスピード：5 mm/min
- ATTENUATION：512

	$t_R(mm)$	$t_R(min)$	$W_{1/2}(mm)$	$W_{1/2}(min)$	k'	N
H ₂ O	8.46	1.692		0.00	0.00	
C1	19.84	3.967	0.9	0.18	1.34	2690.85
C2	28.63	5.725	1.0	0.20	2.38	4539.42
C3	46.13	9.225	1.2	0.24	4.45	8185.03
C4	79.96	15.992	2.0	0.40	8.45	8855.14
C5	144.50	28.900	3.5	0.70	16.08	9442.99

	α	Rs
C1-C2	1.77	5.44
C2-C3	1.87	9.36
C3-C4	1.90	12.44
C4-C5	1.90	13.81

MeOH : H₂O = 70 : 30

- チャートスピード : 10 mm/min
- ATTENUATION : 512

	$t_R(mm)$	$t_R(min)$	$W_{1/2}(mm)$	$W_{1/2}(min)$	k'	N
H ₂ O	16.92	1.692		0.00	0.00	
C1	27.67	2.767	1.0	0.10	0.64	4241.58
C2	34.33	3.433	1.0	0.10	1.03	6529.16
C3	46.08	4.608	1.2	0.12	1.72	8169.06
C4	66.08	6.608	2.0	0.20	2.91	6047.69
C5	99.67	9.967	2.6	0.26	4.89	8141.27

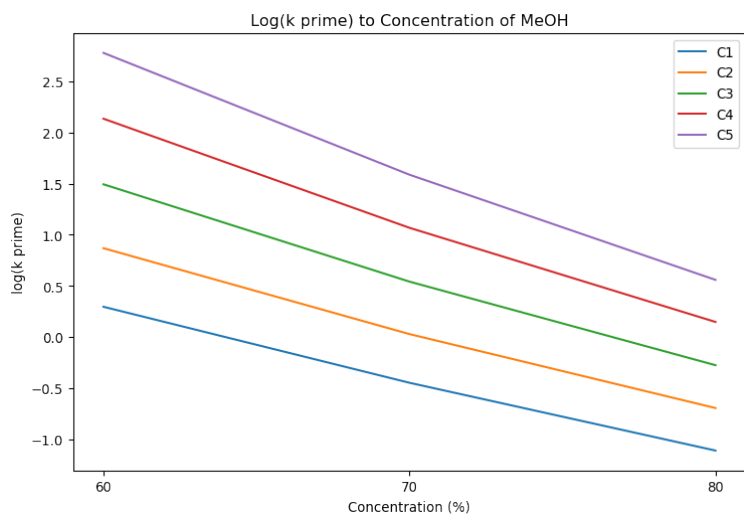
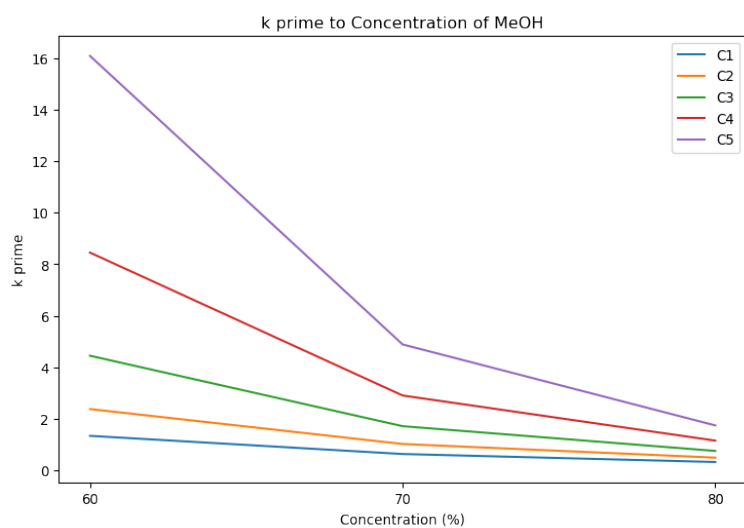
	α	Rs
C1-C2	1.62	3.92
C2-C3	1.67	6.28
C3-C4	1.69	7.35
C4-C5	1.68	8.59

MeOH : H₂O = 80 : 20

- チャートスピード : 20 mm/min
- ATTENUATION : 1024

	$t_R(mm)$	$t_R(min)$	$W_{1/2}(mm)$	$W_{1/2}(min)$	k'	N
H ₂ O	33.84	1.692		0.00	0.00	
C1	45.16	2.258	1.9	0.10	0.33	3129.76
C2	50.66	2.533	2.0	0.10	0.50	3554.51
C3	59.66	2.983	2.0	0.10	0.76	4929.65
C4	73.16	3.658	2.4	0.12	1.16	5147.95
C5	93.16	4.658	3.0	0.15	1.75	5342.27

	α	Rs	
C1-C2	1.49	1.66	
C2-C3	1.54	2.65	
C3-C4	1.52	3.61	
C4-C5	1.51	4.36	



考察

1

移動層の極性を変化させることによってパラペンの保持係数はどのように変化するか。

グラフより、MeOH の濃度が高い、つまり極性が小さくなるほど保持係数も小さくなる。また、 $\log k'$ と濃度グラフを書くと線形性がみられることがわかる。

2

各パラメーターがどのような状態になれば、分離が良好な状態になるか。

保持係数 k' はピークの広がりを示す指標である。 k' が小さすぎるとカラムでの分離が十分できておらず、大きすぎるとピークが広がりすぎるため、 $1 \leq k' \leq 10$ が最適な範囲とされる。分離係数 α はピーク同士の離れ具合を表すので α が大きいほど分離が良い。分離度 R_s はピークの広がり具合を加味した上での離れ具合を表しており、 $R_s > 1.5$ であればピークは完全に分離しているとされる。

3

パラペンの分離を速く、かつ良好に行うにはどうしたら良いのか。

移動層の極性を適切に設定することで分離が適切に行われる。

課題

逆層分離の原理を充填剤の構造と本実験の結果に言及しながら説明する。

逆層分離は低極性の充填剤をカラムに詰めてその中を移動層が流すことで低極性の物質が吸着し、高極性のものから順に溶出させる分離法である。本実験で用いた ODS はシリカゲルの表面に疎水性のオクタデシルシリル基がついたものであり、炭素数が多いパラペンを強く吸着する。

感想

研究室ごとに課題が出されるため、書くべきレポートが多すぎて困ってます。

実験 I-2 HPLC による未知試料中 DNS-アミノ酸の定性・定量分析

実験日：2019/6/13

実習班：8 班

目的

ダンシルクロリドで誘導体化したアミノ酸混合試料を、逆相 HPLC により分離同定し、さらにその濃度を定量する。定量の際には、絶対検量線法と内標準法という 2 つの方法を用いて DNS-アミノ酸の検量線を作成し、未知試料中の各 DNS-アミノ酸濃度を決定する。

実験方法

実習書に従って行った。

HPLC 条件

- 固定相：GL サイエンス InertSustain C18 (150mm x 4.6mm i.d., 5 μ m)
- 移動相：MeOH : H₂O = 40 : 60, trifluoroacetic acid (TFA) 0.1
- 流速：0.8mL/min
- 検出波長：340nm
- チャートスピード：2mm/min
- ATTENUATION：16 程度
- 試料注入量：5 μ L

結果

クロマトグラムはレポート末に添付しています。

DNS-アミノ酸濃度 (mM)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Ser	0.000	4.542	4.583	4.575	4.592
Asp	0.000	5.033	5.067	5.067	5.083
Gly	5.517	5.550	5.583	5.583	5.600
Thr	0.000	6.317	6.367	6.367	6.383
Ala	0.000	7.500	7.542	7.550	7.567

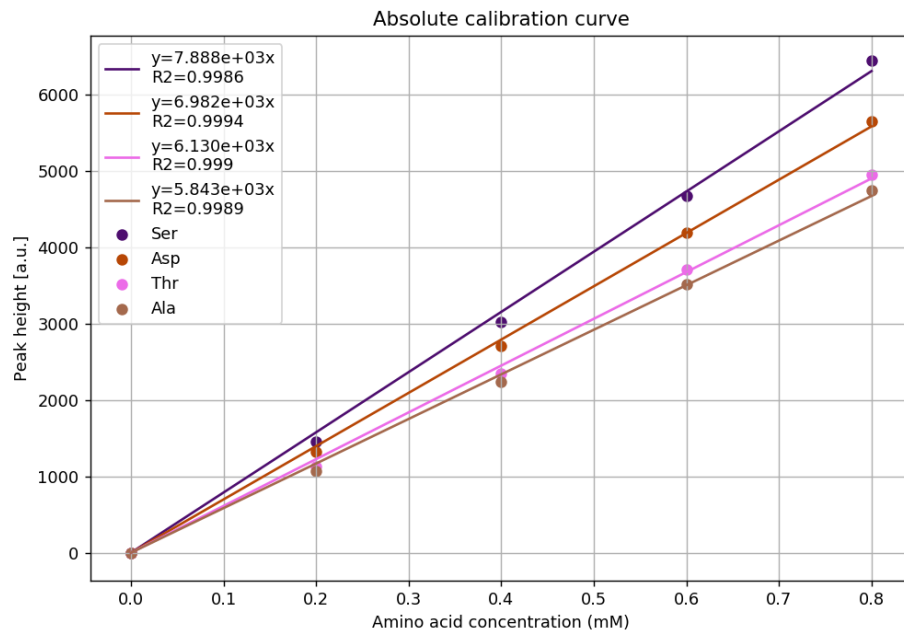
表 1 保持時間

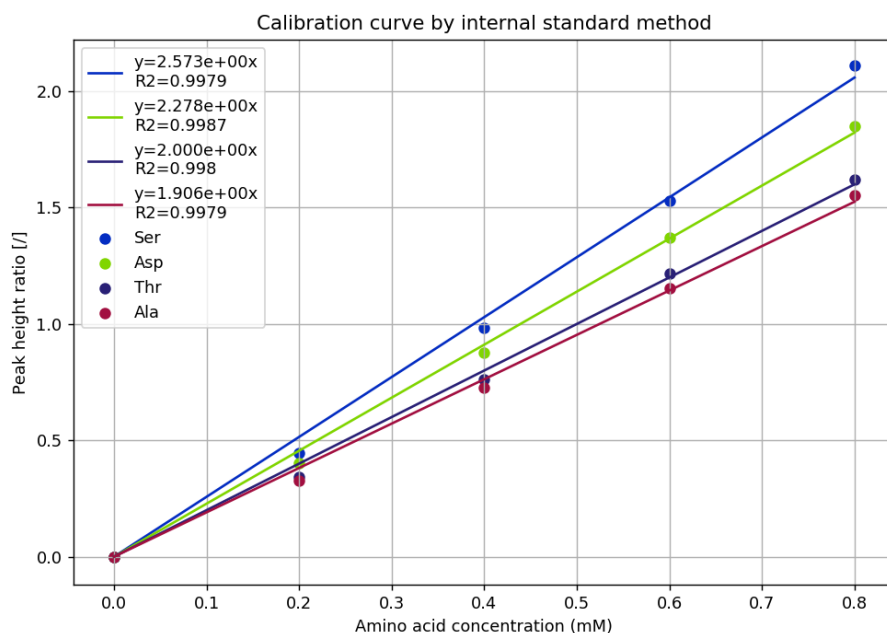
DNS-アミノ酸濃度 (mM)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Ser		1461	3029	4673	6448
Asp		1317	2704	4191	5649
Gly	3071	3288	3079	3054	3057
Thr		1128	2349	3710	4956
Ala		1070	2234	3517	4742

表 2 ピーク高さ

DNS-アミノ酸濃度 (mM)	0.2	0.4	0.6	0.8
Ser	0.444	0.984	1.530	2.109
Asp	0.401	0.878	1.372	1.848
Thr	0.343	0.763	1.215	1.621
Ala	0.325	0.726	1.152	1.551

表 3 内標準物質 (DNS-Gly) とのピーク高さ比





未知試料からは以下のようなアミノ酸が検出された。またその結果と上のグラフで得た検量線をもとに算出したアミノ酸の濃度は以下の通りである。

アミノ酸	ピーク高さ [a.u.]	算出された濃度 (mM)	実際の濃度 (mM)	誤差 (%)
Ser	4862	0.770	0.770	0.00
Asp	1971	0.359	0.330	8.79
Gly	3078	2.520	2.000	26.0
Thr	2773	0.596	0.550	8.36

表 4 絶対検量線法

アミノ酸	ピーク高さ比	算出された濃度	実際の濃度 (mM)	誤差 (%)
Ser	1.580	0.767	0.770	0.00
Asp	0.640	0.362	0.330	8.79
Gly	1.000	2.511	2.000	25.6
Thr	0.901	0.597	0.550	8.55

表 5 内標準法

考察

絶対検量線法と内標準法でそれぞれ算出された濃度に大きな差はなかった。また、グラフの決定係数も 0.99 を超えているので十分な直線性が得られたと言える。また、Gly のみ算出された濃度と実測値に誤差があったが、これは混合溶液を HPLC に入れる際に $5\mu\text{L}$ よりも多く入れたことが原因だと推測される。

課題

1

絶対検量線法による定量の際に気をつけなければならない点を挙げる。

ピーク高さが濃度だけでなく、HPLC に入れた試料の量にも比例するので入れる量を正確に測る必要がある。

2

内標準法による定量の際に内標準物質としてどのような化合物を選択しなければならないか。

試料と反応せず、かつ他の物質とピークが完全に分離している必要がある。

3

標準添加法について簡潔に説明する。

未知試料中に含まれている物質を一定の濃度ずつ添加していき、ピーク高さを縦軸に、添加した濃度を横軸にして検量線を作成すると、濃度が負になる領域で検量線が横軸と交わる。その点と原点の距離を求める成分の濃度として得ることができるという手法が標準添加法である。

感想

1 日でレポートを書き上げるのは大変ですが、だからと言って毎日コツコツやるのも大変なものです。

実験 II-1 吸光法

実験日：2019/6/11

実習班：8 班

目的

吸光法について学ぶ

実験操作

実習書にしたがって行った。

スペクトル測定条件

測定波長：300 ～ 700 nm 吸光度スケール：0.000 ～ 1.000

結果

pH 指示薬

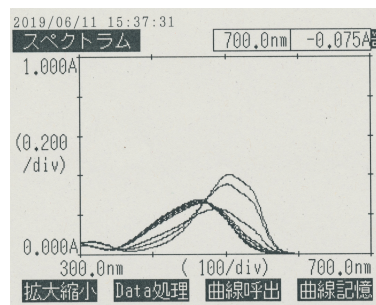


図1 メチルオレンジ

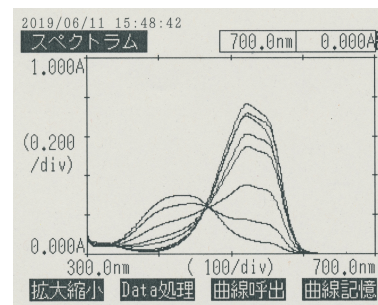


図2 メチルレッド

メチルオレンジとメチルレッドが pH に応じて最大吸収波長、吸光度、モル吸光係数が変化する様子を以下の表にまとめた。

pH	λ	Abs	ϵ
2.5	506.000	0.404	40400
3.0	503.000	0.354	35400
3.5	490.000	0.228	22800
4.0	470.000	0.260	26000
4.5	468.000	0.263	26300
5.0	464.000	0.268	26800
5.5	464.000	0.276	27600
6.0	464.000	0.268	26800

表 6 メチルオレンジ

pH	λ	Abs	ϵ
2.5	522.000	0.701	70100
3.0	524.000	0.763	76300
3.5	524.000	0.716	71600
4.0	524.000	0.612	61200
4.5	524.000	0.546	54600
5.0	522.000	0.353	35300
5.5	446.000	0.257	25700
6.0	434.000	0.300	30000

表 7 メチルレッド

金属錯体

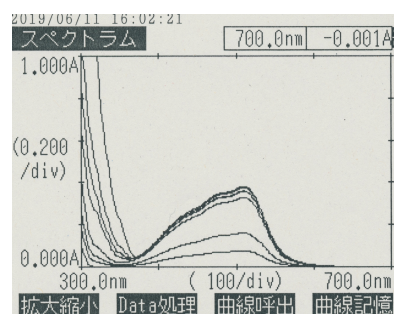


図 3 フェナントロリン

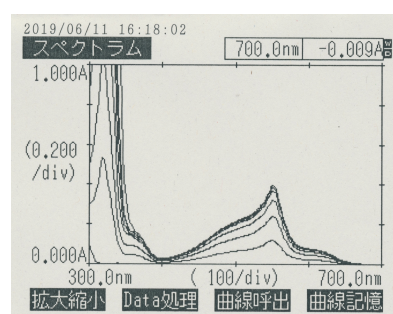
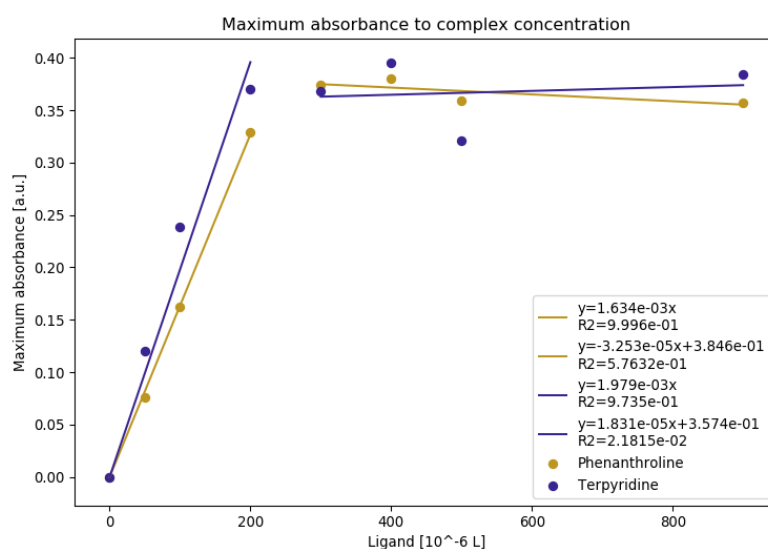


図 4 テルピリジン

以下の表とグラフは画像のスペクトルを元に吸光度をまとめたものである。

Ligand [μL]	Phenanthroline	Terpyridine
0	0.000	0.000
50	0.076	0.120
100	0.162	0.239
200	0.329	0.370
300	0.374	0.368
400	0.380	0.395
500	0.359	0.321
900	0.357	0.384



フェナントロリンは 3 配位、テルピリジン は 2 配位であると考えられる。

考察

今回得たスペクトラムからは MR に等吸収点が存在し、MO には存在しないような結果が得られたが、実際には逆である。

課題

2-1-1

1

Lambert-Beer の法則について説明せよ

吸光度は濃度が一定の場合では光が透過する長さ (光路長) に比例する。これをランベルトの法則という。また、一定の厚さの溶液層 (一定の光路長) を通過する光の強度の減少は溶液のモル濃度に比例する。すなわち、吸光度はモル濃度に

比例する。これをベールの法則という。これらの 2 つの法則を合わせたものがランベルト・ベールの法則であり、以下の式が成立する。

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

溶液の吸光度は、溶液の濃度と溶液層の厚さ (セルの光路長) に比例することがわかる。

2

pH2.5 および 6.0 の buffer 中におけるメチルレッドとメチルオレンジの最大吸収波長、モル吸光係数を求めよ。

「結果」の項にある表を参照。

3

物質の吸収波長と色の関係をまとめ、pH によるメチルレッドとメチルオレンジの変化を説明せよ。

メチルレッド pH2.5 のとき、メチルレッドは緑色の光である 430 ~ 480 nm の光を吸収し、メチルオレンジは青色の光である 500 ~ 560 nm の光を吸収する。光が反射して我々の目に見えるのは、試薬が吸収した色の補色であるため、メチルレッドとメチルオレンジはそれぞれ赤とオレンジ色に見える。

4

等吸収点が現れる条件は何か説明せよ。

物質が n 通りに変化するとき、吸光度の式は以下のような線型結合な式で表される。

$$A = \sum_{i=1}^n (\epsilon_i \cdot c_i \cdot l)$$

今回の実験のように 1 つの物質が n 通りに変化する時は、それぞれの濃度の総和は常に等しいことから、定数 C を用いて以下の式がなりたつ。

$$\sum_{i=1}^n c_i = C$$

これを c_n について整理すると

$$c_n = C - \sum_{i=1}^{n-1} c_i$$

となるので、これを吸光度の式に代入すると以下ようになる。

$$\frac{A}{l} = C\epsilon_n + \sum_{i=1}^{n-1} c_i (\epsilon_i - \epsilon_n)$$

したがって、 $c_1 \sim c_n$ の濃度に関わらず吸光度が一定になる、つまり等吸収点が存在するのは以下の式が成り立つ時である。

$$\epsilon_1 = \epsilon_2 = \dots = \epsilon_n$$

このとき A は一定となる。

5

メチルレッド、メチルオレンジは等吸収点を持つか。

図のようにメチルオレンジは 2 種類に変化し、メチルレッドは 3 種類に変化する。モル吸光係数は波長によって変化するため物質が 2 種類であれば一度でも吸光度の曲線が交わる点が等吸収点が存在となるが、3 種類の時は 3 つの吸光係数が同時に等しくなる必要がある。したがってメチルオレンジでは等吸収点が存在するが、メチルレッドでは存在しない。

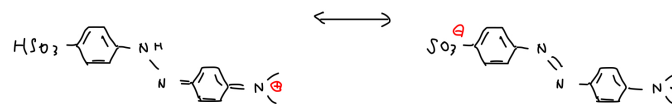


図5 メチルオレンジ

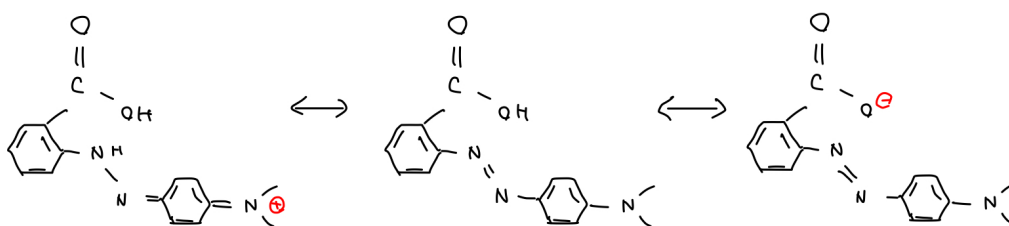


図6 メチルレッド

2-1-2

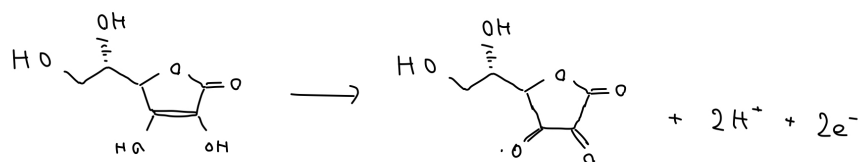
1

今回の実験で測定溶液の pH を 4.5 付近にした理由を述べよ。

pH が低すぎると配位子の窒素原子がプロトン化し、大きすぎると鉄イオンが $\text{Fe}(\text{OH})_2$ となるため。

2

本実験における L-アスコルビン酸の役割を述べよ。L アスコルビン酸の代わりとなる物質の例を挙げよ。



図のようにアスコルビン酸は還元剤として働く。アスコルビン酸の代わりとなる物質の条件としては、水に可溶でかつスペクトルに影響を与えない無色のものであり、pH を大きく変えないということがあげられる。これに当てはまるのは過酸化水素水、シュウ酸、ギ酸などである。

3

本実験の結果、生成したと考えられる錯体の立体構造を図示せよ。

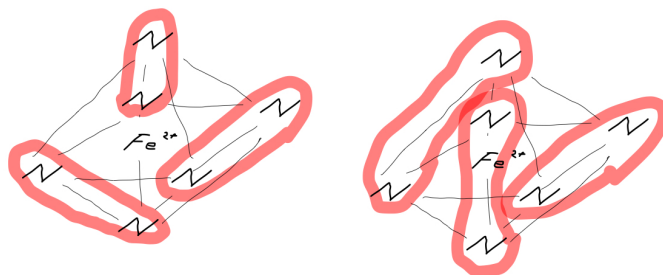


図7 フェナントロリン

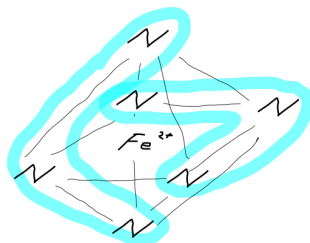


図8 テルピリジン

4

本実験では吸収極大を与える波長の吸光度を用いたが、それ以外の波長を用いても可能かどうか考察せよ。

可能ではあるが、ノイズの影響を最も受けにくいのが吸収極大を与える波長であるので、なるべく吸収極大を与える波長で吸光度を測定した方がよい。

感想

松枝さんへ

7th ライブ幕張公演は day2 のチケットが手に入りました。day1 のチケットも頑張って手に入れたと思います。

実験 II-2 蛍光法

実験日：2019/6/17

実習班：8 班

目的

蛍光スペクトルを測定する。

実験操作

実習書にしたがって行った。

測定条件

一般

- 測定モード：波長スキャン

装置

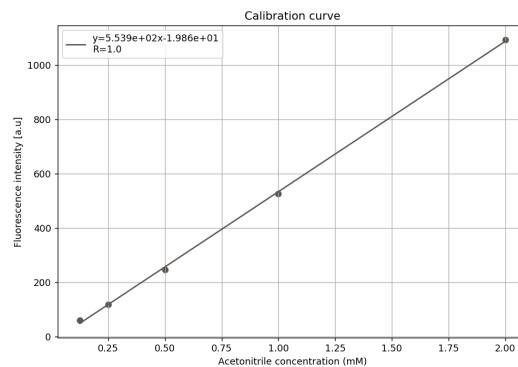
- スキャンモード：励起スペクトル or 蛍光スペクトル
- データモード：蛍光
- (蛍光/励起) 波長：(蛍光/励起) スペクトルを見て入力
- (励起/蛍光) 開始波長：220 nm
- (励起/蛍光) 終了波長：700 nm
- スキャンスピード：300 nm/min
- 初期待ち時間：0 sec
- ホトマル電圧：400 V
- レスポンス：自動

結果 (ピークの帰属を含む)

スペクトルはレポート末に添付してあるのでそちらを参照。

アセトニトリル希釈系列 (μM)	0.125	0.25	0.5	1	2
系列 1	63.56	119.6	242.3	508.9	1038
系列 2	57.9	118.7	253	542.9	1149
平均	60.73	119.15	247.65	525.9	1093.5

表 8 DNS-アラニンの検量線



検量線の式をもとに未知試料の濃度を算出した結果 402.5 nM となった。

考察

未知試料の濃度は高めに出る傾向があるらしいが、実際の数値である 400 nM とほとんど大きな差が出なかった。

課題

1

吸光法と蛍光法について、それぞれの長所と短所を比較してまとめよ。

吸光法は蛍光を発さない物質にも適用できるので様々な物質に利用できるという利点があるが、励起光と透過光を同じ方向から見るためにノイズの影響を受けやすいという欠点がある。それに対して蛍光法は蛍光を発する物質にしか適用できないが、ノイズが小さいという利点がある。

2

プリントの図をもとに、3つの蛍光スペクトルのうち1つが他と異なる理由を考察せよ。

エチルアニリンとジメチルアニリンは基本的に脱プロトン化した状態が安定なため、脱プロトン化した状態での励起による蛍光しか観測されないが、ジエチルアニリンはプロトンがついた状態で存在する上に、その状態でも蛍光が観測されるため異なったスペクトルが現れる。

感想

辛いです。

実験 III 蛍光顕微鏡法

実験日：2019/6/14

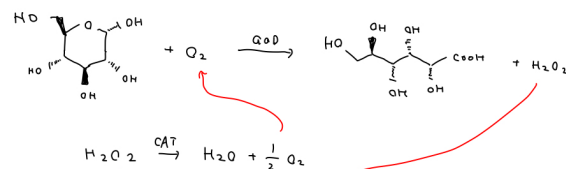
実習班：8 班

課題

1

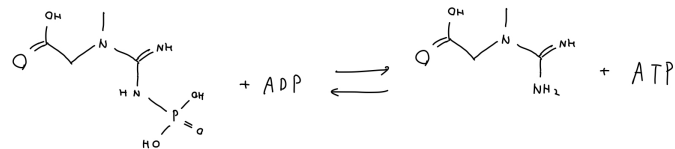
微小管の脱重合を阻害し、繊維を維持するため。

2



2つの反応をくり返すことで $\frac{1}{2}$ mol の O_2 が減少する。

3



4

ATP 濃度 [μ M]	10	25	50	100
キネシンの運動速度 [nm/s]	439	-	493	547

μ M については動いているキネシンが存在しなかった。

5

10,50,100 μ M のキネシンの運動速度を L-B プロットに代入した結果、 $V_{\max} = 564$ nm/s, $K_m = 4.41$ μ M となった。

感想

研究室の中を色々見て回れたのが良かったです。