

君たちがまず知らなければいけないこと。

生物機能化学科学生実験—基礎実験—

実験の心得

1. 一般的心得

実験で用いる多くの試薬類は毒性の強いものが多く、不用意に皮膚に接触させたり、口に入れることは決してないように注意すること。また、一般試薬でも濃度が高い場合には強い毒性を示し、場合によっては発ガン性を持つ場合があるので十分に留意すること。実験室内での飲食、食品の保管、喫煙は厳禁とする。白衣を着用すること。土足での入室を禁止するので、各自上履きを用意すること。携帯電話の室内での使用は禁止します。電源は入れていても良いですが、計算機能も含めて室内で使用はしないこと。実験の進め方を自分達で考えるのは大変良いが、偏った時間配分は事故にもつながりかねず、好ましくない。原則として**18時に実験室は閉鎖**することを予め考慮すること。欠席あるいは遅刻する場合には連絡を入れること。

2. 分析上の心得

(1)標準試薬(standard)作成や定量分析のための秤量は特に正確に行う。実験は再現性があることが重要であることを常に頭に入れること。厳密な定量の場合、試薬や試料は秤量管に入れ、加熱が可能な場合は80-100°C程度(試薬、試料に応じて異なる)で4-6時間(水分が多い場合はそれに応じてのばす)乾燥し、シリカゲル(青色であることを確認のこと)が入ったデシケーター中で放冷した後で秤量する。さらに30分間加熱し、同様に放冷後秤量し、前に秤量した値と同じになるまでこの操作を繰り返す。以上の操作を恒量という。

(2)試薬の溶解はビーカーあるいは三角フラスコ内で行い、メスシリンダーおよびメスフラスコ内で行わないこと。試薬の攪拌はガラス棒を用い、金属製のスパチュラは原則として使用してはいけない。

(3)メスシリンダー、メスフラスコ、メスピペット、ホールピペットは使用後直ちに水、脱塩水で洗浄し、風乾する(熱をかけるのは原則として禁止。ただし器具を滅菌する必要があるときは乾熱滅菌やオートクレーブを行う)。ピペット類を自然乾燥する場合は先(細い方)を上にして乾かすこと。

(4)ガラス器具は使用後なるべく迅速に水道水と洗剤を用いて洗浄し、水道水で最低10回(泡がきれてから)、脱塩水で6回洗浄してから乾燥する。洗剤は残存した場合は以後の実験に影響を与えるので、必要最小量を使うようにこころがけること。なお、洗剤はそのままでは濃いので、5倍に水道水で希釀して利用するように。乾燥させる際に紙などでビーカ類の中を拭くのは不適切、また、洗浄後にビーカー類の内側に指を入れないように。

(5)危険な試薬を取り扱う際は保護ゴーグル・手袋を着用すること。

3. 生物機能科学実験室でのルール

- (1)持ってくるもの：白衣、上履き（カカトがあるものが望ましい）、計算機（携帯電話の計算機の機能は使用禁止）、実験ノート、筆記用具
- (2)天秤室の掃除当番を決めます。天秤室は毎日掃除を行う。担当を決めるので学生実験の期間を通して利用する日程の時には掃除すること。

I. 計量容器の取り扱いに関する基本的心得

1. 計量容器のいろいろ

(1)メスフラスコ、メスシリンドー、ピペット、ビュレットが計量容器として学生実験では使用される。また、計量容器ではないが（！！）ビーカー、フラスコ、スポットなどにも目盛りはついている。（ビーカーなどの APPROX の意味が何かを考えること。5%はずれている。）

(2)材質には現在ガラス製とプラスチック製がある。ガラス製は化学薬品に侵されにくいが、割れやすい欠点がある。プラスチック製は一部の薬品を除けば耐薬品性があるうえに割れにくいが、耐熱性が低いという欠点がある。発熱すると予想される溶液を作成するときはガラス製を利用すること。また、実験書の指示に従い使い分けること。

(3)計量容器には受用量器（そこまで入っている内容積を示す器具）と出用量器（別の容器に溶液を移した時の流出量を示す）の2種類がある。メスフラスコは受用量器であり、メスシリンドー・ピペット・ビュレットは出用量器である。つまり、後者の場合は移した後に中を洗って回収してはいけない。

(4)溶液を作成する際に溶液が発熱あるいは吸熱する際は、温度変化による体積変化が容器および溶液に生じているため、室温付近に温度が下がるのを待って合わせる。（緩衝液の pH に影響を与える場合もある）物を混合する際はいきなり大量に混合することは避け、少しづつ混ぜるように心がけること。

(5)目盛りを読むときは視線を液面に水平にして、液面の最下部を読む。目盛りを読みとるとときは付してある目盛りより一桁下の位まで読むこと。

2. メスフラスコについて

(1)体積許容差が約 $\pm 0.12\text{cm}^3$ の精度を持つ(100ml の場合)。

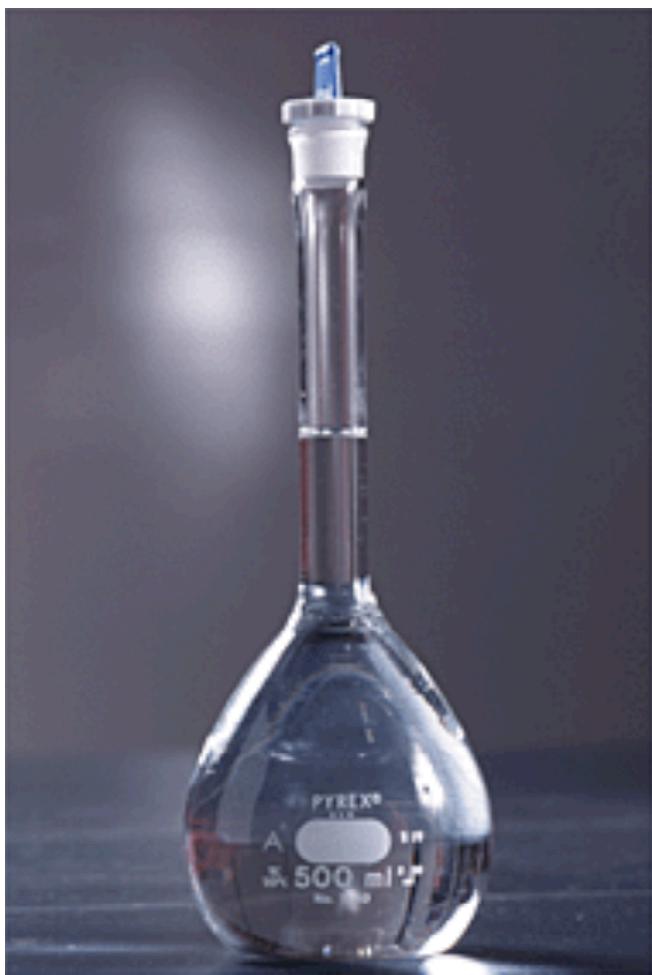
3. メスシリンドーについて

(1)体積許容差が約 $\pm 0.5\text{cm}^3$ 程度である (100ml の場合)。

4. ピペットについて

(1)ホールピペット、メスピペットのいずれにおいても体積許容差は $\pm 0.02\text{cm}^3$ である（ただし前者は 1-25cm³用、後者は 1-5cm³用の場合）。

(2)内壁に付いている分までは流し出さない。



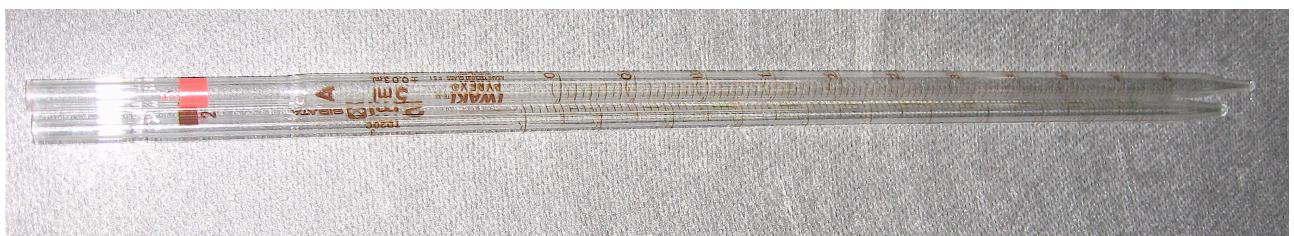
メスフラスコ



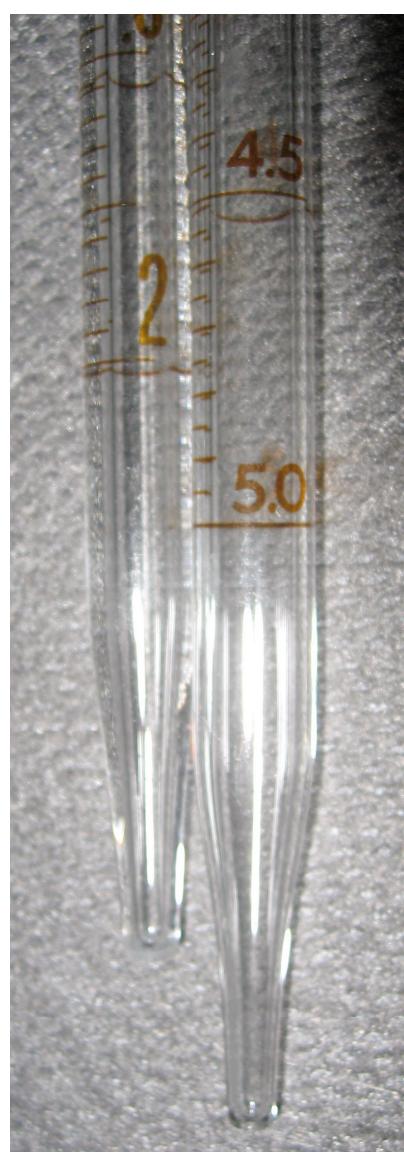
メスシリンドー



ホールピペット



メスピペット



メスピペットには二種類のタイプがある。左は吹き出しタイプで液を全て出し切って規定の容量となる。右はきちんと最後も止める必要がある。



駒込ピペット、精度は低いがスポットのようにして使用する。東京の駒込病院の先生が開発した。

(3) ピペットの先端はビーカーやフラスコの底まで深く入れて液を吸うようにこころがけること。

(4) 駒込ピペットは目盛り付きスポットであって、計量容器ではない。

5. ビュレットについて

(1) 体積許容差は 5-25cm³用で約±0.02cm³である。

なお、容量器の検定公差（体積許容差）は容量によって異なっている。詳細を知るためにもお勧めの本は「新版 続・実験を安全に行うために」（化学同人）。また、試薬などに関する詳細は「新版 実験を安全に行うために」（化学同人）が最適です。

II. 試薬の使い方など

1. メスフラスコを用いて定容する場合、異なる試薬を混合するときには、いきなり定容するのではなく、混ぜながら加えていくこと。 $1\text{ ml} + 1\text{ ml} = 2\text{ ml}$ には必ずしもなりません。定容した後にきちんと再度混合します。この際には、上をパラフィルム（あるいは擦り合わせの栓）で密封し、逆さにして横に振る（この際に手をきちんと添えること）。下に戻す。この操作を最低 7 回繰り返してください。

2. 天秤を使用する際には、薬さじ（スパチュラ）と試薬あるいは試料を取る容器を持ち、天秤室で行う。天秤を用いて試薬をはかり取る場合には、薬包紙を用いますが、その端が下や横の壁に接触をしないように注意すること。余った試薬は試薬瓶には戻さずに廃棄すること。なお、後述の電子天秤の使い方をよく読んでください。

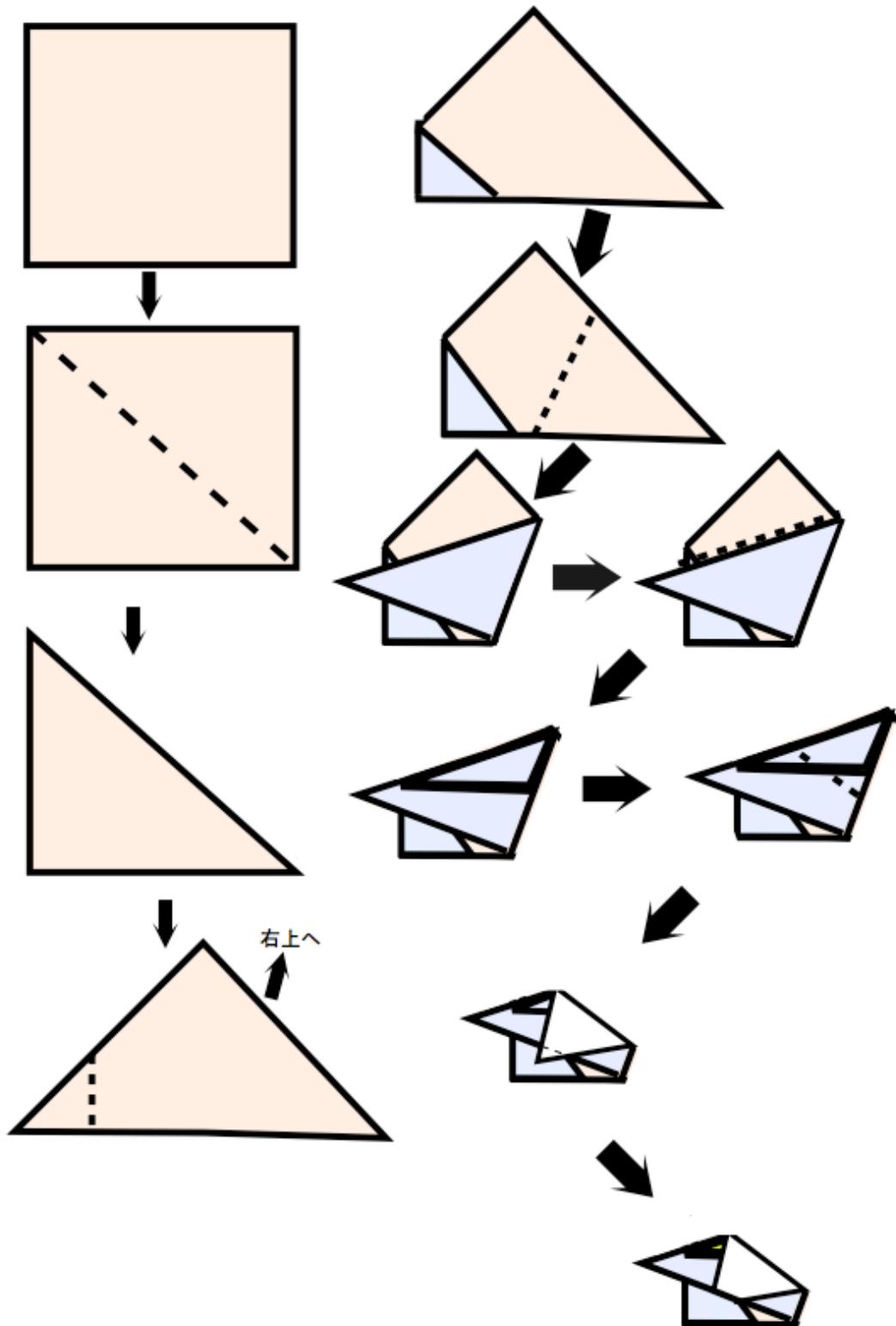
3. 市販の洗剤は非常に濃いため、5倍程度に希釀して使用します。使用時に試験管ブラシなどに適量をつけて洗うようにします。別の容器に洗剤を入れてそれにつけながら使用しても良いですが、使用後は必ず試験管ブラシを外に出し、乾かしておくこと。

4. 安全ピペットの内部に水等が入ると故障します。机の上に置く場合にも注意してください。

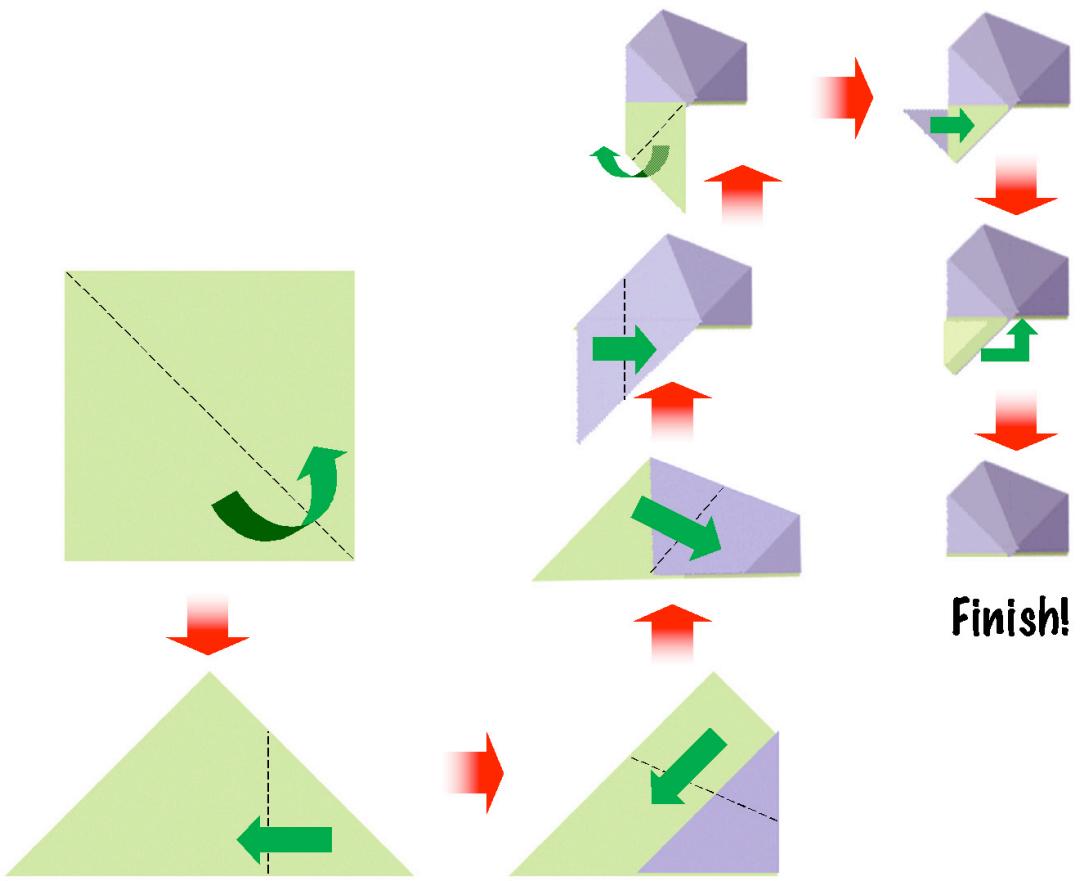
5. 器具の乾燥は、急いでいる場合は計量容器以外は乾燥機に入れます。逆さにして入れてください。

6. ピペット等の先の細い物を乾燥する場合は、先を上に向けてください。
また乾燥機に入れてはいけません。

III. 薬包紙の使い方（1）



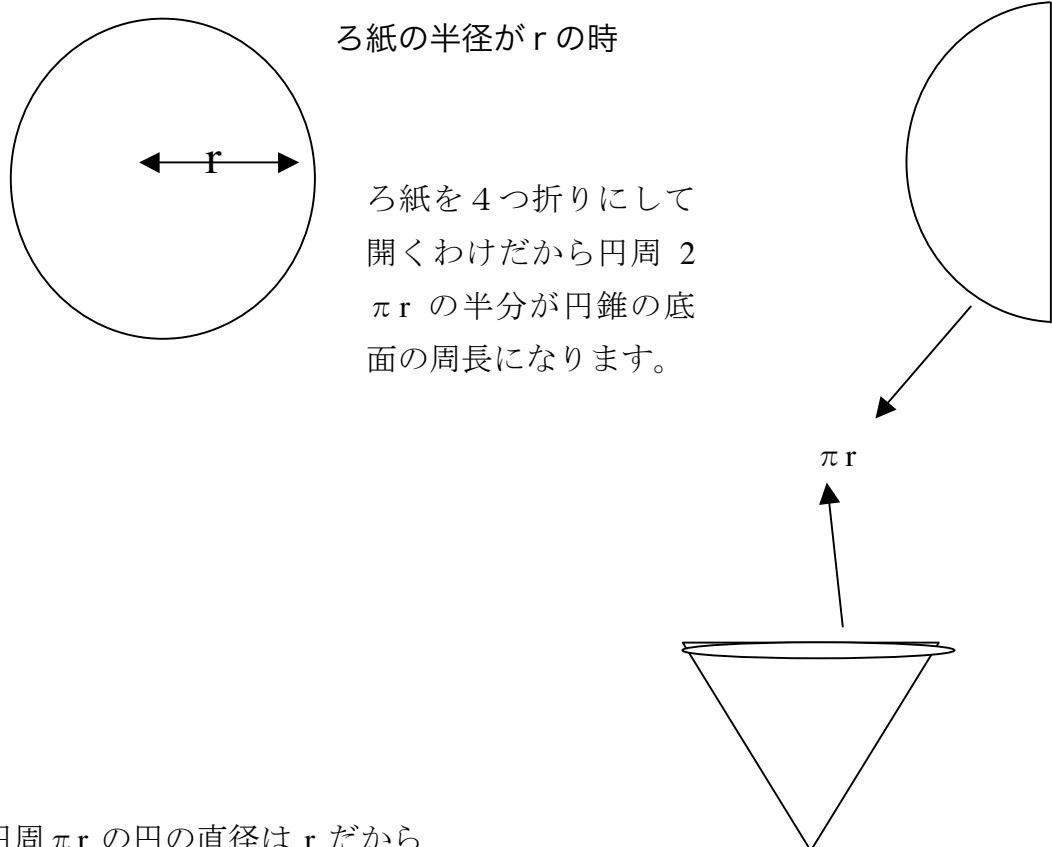
薬包紙の使い方（2）



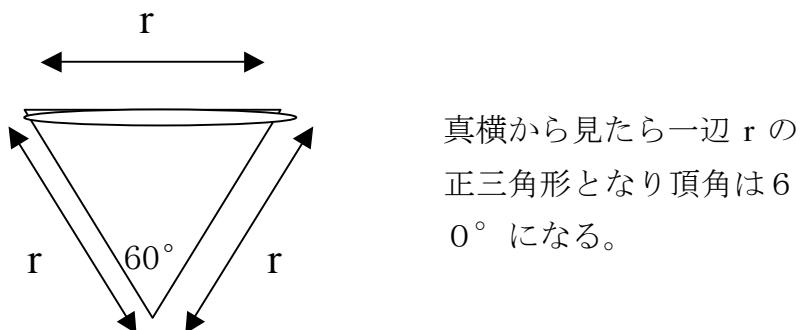
(両方試してみて、使いやすい方を)

IV. ろ紙とロウトの使い方

化学実験で使うロウトの形は頂角 60° の円錐形に決まっています。また、ロウトにあわせてろ紙を選ぶ時にはロウトの口径の 2 倍以下の直径のものを選びます。

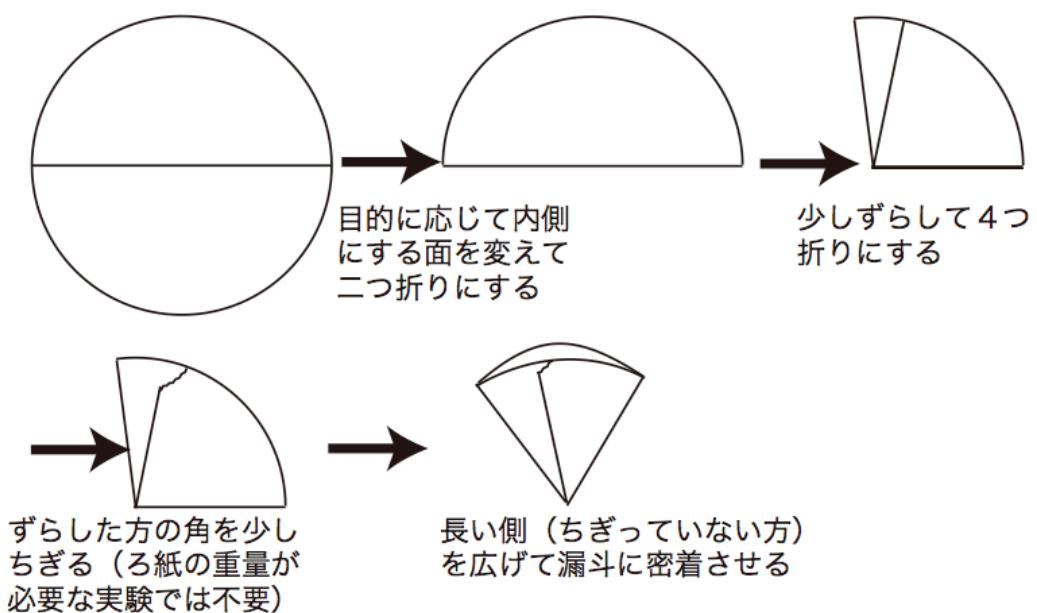


円周 πr の円の直径は r だから
以下のようになる。



ろ紙の折り方

(下の図は必要な試料が内側に来る場合。ろ液が必要な場合は滑らかな面を外側にすること。ただし、この場合は一旦内側にして追つ手から引っくり返しており直して手の汚れがなるべく付かないようすること。内側にしろ、外側にしろ粗い面の纖維のくずが試料に混入しないようにするためである。)



ろ紙の折り方には決まったやり方があります。

ろ過が順調に進んでいる時はロウトの足の部分にろ液の液柱ができ、この液柱の重みでろ液が吸引されることによりろ過が迅速になります。ろ液とロウトがふちのところでよく密着するようにして空気の漏れないようにすることが重要です。溶液を移すときにはろ紙に直接溶液があたるようにしてください（状況に応じてガラス棒等を利用する、手は使わない）。

ろ液を少しづらして、4つ折りにして長い側の袋を開くことで、ろ紙の頂角を 60° よりも少し広い角度にすること、また、外側の袋の角を手でちぎることは密着をよくするために大きな効果があります。ずらさないで4つ折りにしてみたり、角をちぎらないのも一

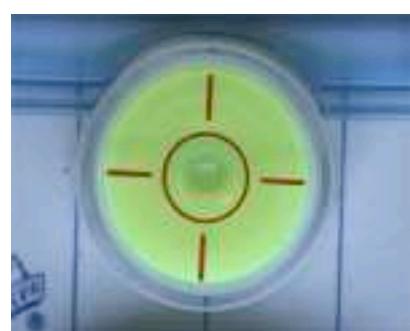
度は試してみても良いです。実際に比べるとかなりの違いがあることがわかります。

V. 電子天秤の使い方

- 1) 天秤の底の脚を回して、 水準器の気泡が円の中心に来る ように調節する。
- 2) 測定皿やその周囲が汚れているときは電源が切ってあることを確認の上、ガラス扉を開けて刷毛できれいにする（電源が入った状態で測定皿を掃除しないこと）。
- 3) ガラス扉が閉まっていることを確認する。
- 4) [ON] を押して表示板にゼロが表示されるのを待つ。
- 5) ガラス扉を開け、薬包紙をのせてガラス扉を静かに閉める。この時、薬包紙の四辺に折り目を付けておくこと。対角線方向の4つの角の部分を折ると使いやすい。
- 6) 表示が安定してから [TARE] を押すとゼロ点調節が行われて ゼロが表示される。
- 7) ガラス扉を開け、静かに測定試料をのせ、ガラス扉を静かに閉める。
- 8) 表示が安定したらその値を読みとり、ノートに記録する。
- 9) ガラス扉を開けて試料を取り出し、静かにガラス扉を閉める。
- 10) もし、試料をこぼしたり汚したときは電源を切った後で刷毛やキムワイプで慎重に掃除しておく。汚れたままにしないこと。

使用上の注意

- 1) 精密機械なので取り扱いは特に慎重に（振動を与えるたり、ガラス扉を乱暴に開け閉めしたりしない）。
- 2) 設置場所は温度変化が少なく、湿度が低く、直射日光のあたらない部屋で、振動のない、水平な台の上に置くのがよい。
- 3) 測定皿にものをのせるときは静かに行う。
- 4) 天秤の測定上限より重いものをのせない。
- 5) 試料は天秤の置かれた部屋の温度にしてから測定する。
- 6) 濡れた濾紙などを直接測定皿にのせない。



(気泡が真ん中の円の中にあるように設置すること)

VI. ピペットの使い方

(ホールピペットとメスピペットの二種類がある。さらにメスピペットには先端目盛型と中間目盛型がある)

1) ホールピペット (図 1.1)

ピペットの先端を液の中に入れて液を標線の数 cm 上まで吸い上げる。人差し指の腹面で上端を押さえて、ピペットを垂直にもって持ち上げ、ピペットの先端を液面から離してから、少しずつゆるめ、メニスカスを標線と一致させたのち、液を流出する。このとき標線を目の高さで読むようとする。ピペットの先端に残った液は、ピペットの上端を人差し指で押さえ、球部を手で握り、ピペット内部の空気を膨張させることによって押し出す。危険な試薬の場合は安全のため、液を吸い上げる際には図 1.2 に示した安全ピッターを用いる。

*安全ピッターの使用方法 (図 1.2) *

安全ピッターの A, S, E にはガラス玉が入っており、そこを強くつまむとその前後が通じる。操作手順は、まずピペットを下方から点線まで差し込む。A をつまみながら、球の中の空気を押し出す。S をつまみ、注意しながら徐々に試料をピペットの中に吸い込む。E をつまみながら、試料を出す。ピペットの先端に残った液は先端を壁面に接触させながら安全ピッターの E をあけながらそこの小さい膨らみの空気で押し出す。

4-2) メスピペット

先端目盛型はピペットの中の液を全て出してその容量となるタイプである。先端が再大容量 (10 ml のピペットならば 10 ml) となっていると認識すること。この場合、先端に残った液は上部から軽く息で押し出すこと。ホールピペットのようにあたためてはいけない。手の温度によってガラスが膨張し、体積が変わる。

中間目盛型は先端から少し上の部分に最大容量を示した線がある。先端目盛型と異なり全て吹き出してはいけない。

ビュレット（図1.3） 乾燥していない場合、水を切ってから標準溶液を1/4程度入れて3回ぐらい共洗いする（器壁についている水で滴定する溶液が希釈されないように、滴定する溶液で洗う）。まずロートを上部につけゼロ点の少し上まで液を入れたのち、ロートを取り除き液を流出させ、コックの下端に空隙を生じないようにする。滴定時の溶液の滴下は徐々に行い、滴定終了後、同様に目盛りを読み記録する。目盛りを読むときは、図1.4のようにメニスカスを目の高さと一致させ、目盛りの1桁下の値まで読む。実際の操作にあたっては後述の滴定を良く読むこと。



図 1.1 ホールビベット

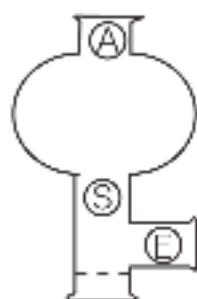


図 1.2 安全ビベット

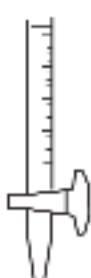
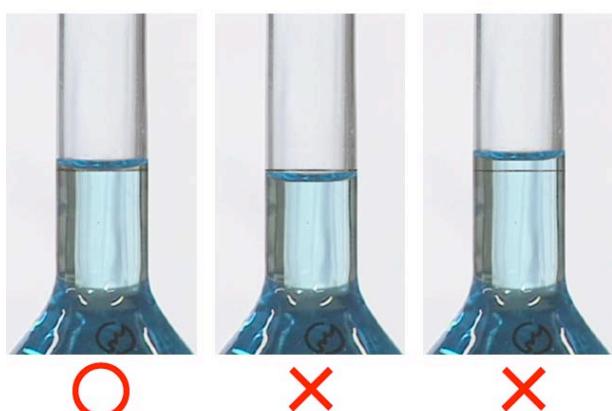
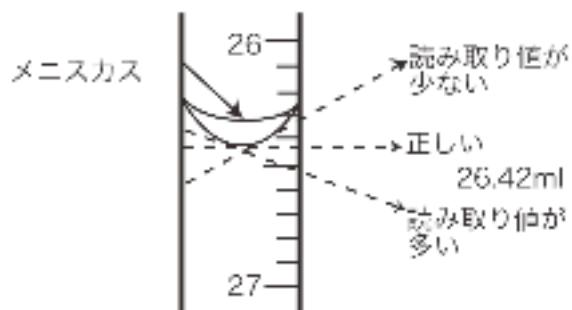


図 1.3 ビュレット



あと一滴という場合、洗ビンに入っている脱塩水を一度勢いよく洗い場等で出すと、口の所にわずかに水が残ります。これを利用すると便利です。

基礎学生実験 1 :「滴定」

0.05 M の硫酸溶液を作成し、フタル酸水素カリウムで標定した 0.1M の水酸化ナトリウム溶液を用いて滴定し、正確な硫酸濃度を求める。

準備する試薬（各自用意）

1) 0.5M の硫酸溶液をまず各自 100 ml 用意する。（100ml 容メスフラスコにあらかじめ 50ml 程度の脱塩水を入れ、そこに安全ピペットを用い、メスピペットで濃硫酸の必要量を加える。最後に脱塩水を用いて 100 ml にメスアップする。）なお、濃硫酸の濃度は 18M である。濃硫酸をこぼした場合は直ちに拭き取るが、拭き取った紙、雑巾等をそのまま放置しないこと。発熱して発火する危険があるため、必ず水につけること。また、蒸発しないため、薄い溶液であっても衣服に付くと後から穴があくので注意。各班で各自が作成した 0.5M 硫酸溶液を集めて 500ml 容ビーカーに集めてガラス棒で良く攪拌し、これを各自 100ml 容三角フラスコで保管する（不足する人がいるかもしれない、全員の実験が終了するまで廃棄しないこと）。

次に 0.5M 硫酸溶液から各自 0.05M 硫酸溶液を作成する。0.5M 硫酸溶液を 10mL ホールピペットを用いて 100ml 容メスフラスコに入れ、脱塩水を用いて 100 ml にメスアップする（この操作では安全ピペットを用いなくてよいが、口に入らないように注意深く操作を行なう。もし口に入った場合は水道水でよくすすぐこと）。この操作を二回繰り返し両者を合わせて 200ml 用意する。作成した硫酸溶液は三角フラスコに入れ、パラフィルムでふたをして保管する。

2) 1.0M の水酸化ナトリウム溶液を各自 100 ml 用意する。必要量の水酸化ナトリウムを秤取り、ビーカーを用いて 50 ml 程度の脱塩水で溶解し、完全に溶解したら、メスフラスコを用いて脱塩水で 100 ml にメスアップする。水酸化ナトリウムは潮解性であるため、天秤にこぼした場合は直ちに拭き取ること。また、強アルカリであるため目などの粘液質の部位に入った場合は大量の水で直ちに洗浄し、教官に連絡すること。

次に 1.0M 水酸化ナトリウム溶液から各自 0.1M 水酸化ナトリウム

溶液を200ml作成する（方法は硫酸の希釈と同じ。安全ピペットを用いなくてよい）。硫酸同様の方法で保管する。水酸化ナトリウム溶液は大気からCO₂を吸収し、NaCO₃の沈澱を生じるため水酸化物イオン(OH⁻)濃度が徐々に低下する。そこで毎日、フタル酸水素カリウムを用いて標定する必要がある。

3) フタル酸水素カリウム(分子量=204.2) 5gを各班毎に秤量管に入れ、100-110°Cで3-4時間乾燥する（実験室の乾燥機を利用する。秤量管を素手で触らないこと！必ずルツボ鉢を使うように。）当日間に合わないようであれば乾燥機に入れたまま放置し、翌日取り出しても大丈夫です。乾燥後、デシケータに入れ最低15分程静置して室温にもどす（この際、熱い秤量管をデシケーターに入れてデシケーターのふたを置くと、デシケーター内部の空気が膨張してふたが落ちるので、しばらくは手でふたが落ちないように保持すること）。フタル酸水素カリウムの保管はデシケータで行い、使用する度にデシケータから取り出し、使用後はデシケータに戻す。（実験を開始するデシケーターのシリカゲルの色が青色であることを確認すること。赤色が混ざっているようであれば充分な乾燥能力は無いので、シリカゲルを取り出し、まずシリカゲルを乾燥機で一晩乾燥させる）

実験操作

1. 水酸化ナトリウム濃度の標定(ファクターの算出)、この操作は各自1回行います。
 - 1-1) 200ml容の三角フラスコに0.3-0.5gのフタル酸水素カリウムを秤取する。(0.3-0.5gの間の量であれば何gでも構わないが、正確に秤量して記録すること。)
 - 1-2) 脱塩水をメスシリンダー（共通の容器を準備します）を用いて約50ml加えて溶かす。
 - 1-3) pH指示薬(phenol phtalein溶液、こちらで用意します)を2、3滴加える。
 - 1-4) ビュレットを用いて0.1M水酸化ナトリウム溶液で滴定する。
 - 1-5) 滴定量とフタル酸水素カリウムの重量から、0.1M水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

2. 硫酸濃度の測定、この操作は各自 3 回行います（3 反復）。
- 2-1) ホールピペットを用いて 0.05M 硫酸溶液を 10 ml を三角フラスコに移す。
 - 2-2) pH 指示薬を 2、3 滴加える。
 - 2-3) ビュレットを用いて 0.1M 水酸化ナトリウム溶液で滴定する。
 - 2-4) 2-1)～2-3)の作業を 3 回繰り返した後、次節の誤差解析を行い、十分な精度の滴定が行えたか確認する。次節の基準に合わない場合は、さらに 2-1)～2-3)の作業を 3 回繰り返す。

誤差解析

実験には必ず誤差がつきまとうので、十分な精度の実験が行われたか検証する必要がある。今回の硫酸濃度の測定の場合、誤差を生む可能性のある作業は

- ・ホールピペットによる分注
 - ・ビュレットを用いた滴定(滴定前と滴定後の 2 回の誤差がある)
- である。今回の実験で用いたホールピペットとビュレットの体積許容差は、いずれも $\pm 0.02\text{cm}^3$ である。そこでホールピペット使用時の相対誤差は

$$\frac{0.02\text{ml}}{\text{硫酸供試量(ml)}}$$

と期待される。一方、ビュレットの目盛を読む時に生じうる相対誤差は

$$\frac{0.02\text{ml}}{\text{滴定量(ml)}}$$

である。そこで、相対誤差の総和は

$$\frac{0.02\text{ml}}{\text{硫酸供試量(ml)}} + 2 \frac{0.02\text{ml}}{\text{滴定量(ml)}}$$

となる。（ビュレットの相対誤差は滴定前後の 2 回分があるので、2 を乗じていることに注意する事。）

3 反復の滴定のデータを使って、硫酸濃度の相対誤差を求めなさい。これは次式で与えられる。

3 反復のデータの標準誤差

$$3 \text{ 反復のデータの平均値}$$

ここで標準誤差(s.e.)は、標準偏差(s.d.)

$$s.d. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

を反復数 n の平方根で除して得られる(次式)。

$$s.e. = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n}}$$

誤差解析論によれば、最終的なデータの相対誤差は、誤差を生む可能性のある作業の相対誤差の総和以下となる。そこで今回の実験の場合、以下の不等式が成立するはずである。

$$\frac{3 \text{ 反復のデータの標準誤差}}{3 \text{ 反復のデータの平均値}} \leq \frac{0.02 \text{ ml}}{\text{硫酸供試量(ml)}} + 2 \frac{0.02 \text{ ml}}{\text{滴定量の平均値(ml)}}$$

3 反復の実験データを用いてこの式を評価しなさい。もしこの不等式が成立していれば、実験の繰り返し精度が十分であったことを意味する。この不等式が成立しなければ、さらに 3 反復の滴定を行なさい。(注：さらなる 3 反復を行わず、1 回だけ滴定して、最初の 3 反復のうちの上手く選んだ 2 つのデータを加えて 3 つのデータを揃える…という人為的操作はしてはいけない。)

注意事項

- 1) 秤の使い方 (薬包紙の使い方—秤への乗せ方、薬さじの使い方、試薬の使い方) 実験を開始する前に電子天秤の使用方法、薬包紙の使い方などを熟読すること。薬包紙を電子天秤の秤の上に置いた後にゼロを取ること。試薬は、電子天秤のそばに持つていき、きれいな薬さじを用いて必要量と考えられる量よりも少ない分量をすくいとる。取り過ぎた試薬は試薬瓶に戻してはいけない。今回の実験では大量の水に溶解して廃棄する。試薬瓶は使用後かららず密封すること。
- 2) メスシリンダーの使い方 (特に濃硫酸などの取り扱いに注意を要する試薬を扱う場合) ガロン瓶 (3 リットル容の大きな試薬瓶、良く使用する) から直接メスシリンダーに試薬を移すことは

してはいけない。必ずビーカーに一度移した後にメスシリンダーに分注すること。

- 3) 計量容器の使い方（試薬の溶解の仕方、ビーカーから移すとき、メスアップのやりかた一机の上に置く方針で、器具の洗浄方法）試薬の溶解はビーカーを用いて行なうこと。最終的にメスアップするのに必要な容量よりも少ない容量で溶解すること。ビーカーからメスシリンダー、メスフラスコに移す時に中身を回収するのに必要な液量も考慮すること。ビーカーから計量容器に移す際にはガラス棒を伝わらせてゆっくりと行なうことが望ましい。メスアップする時には平らな机の上において自分の目の高さを液面に合わせて行なうこと。ただし、それが不可能な場合には手で持ち、目の高さに合わせること。また、溶液の入っている部分、また入る部分を手で持たないこと（温度が加わり容量が変化するため）。**メスフラスコを用いて定容した場合は、溶液を採取する前に必ずふたを閉め、容器を数回反転させて中身を良く混合すること。** 計量容器は洗浄に際してブラシを用いないこと（原則）。また、乾燥は自然乾燥で行なう。
- 4) ファクター(factor, f.) 標準溶液で $0.1M \cdot HCl$ と記したものは、その濃度は厳密に $0.1M$ である。しかし、自分で作成した溶液等の場合、実際の濃度は $0.1M$ とずれる場合が多い（たとえば $0.1035M$ ）。この溶液は $0.1M \cdot HCl$ （標準溶液）の 1.035 倍の HCl を含むことを意味するから、この 1.035 を係数（ファクター）と考え $0.1M \cdot HCl$ ($f = 1.035$) と記す習慣が広く行われている。

参考：中和滴定と中和指示薬

中和滴定法は中和反応を利用する方法であり、酸一塩基の中和反応の終点をみるために普通は中和指示薬が使われる。指示薬は pH によって変色する色素で、例えはメチルレッドは pH4.2 より酸性側では赤色、pH6.3 よりアルカリ性側では黄色で、pH4.2～6.3 の間で赤色から黄色に変色する。これを変色域という。

塩酸のような強い酸を水酸化ナトリウムのような強い塩基で中和する場合の中和滴定曲線は図 1 に示した A～C のように

なる。この場合は広い pH 範囲にわたって中和滴定曲線が垂直になっているので中和指示薬としてメチルレッド（変色域：pH4.2～6.3）を使っても、フェノールフタレン（変色域：pH8.3～10.0）を使ってもほとんど当量点の決定に大きな差を与えない。しかし酢酸のような弱い酸を水酸化ナトリウムのような強い塩基で中和すると、中和滴定曲線は B～C のように変化するから、フェノールフタレンの変色域は中和滴定曲線の垂直部に入るので当量点の決定に正しい結果を与えるが、メチルレッドでは変色域の pH が小さい方にあるため中和滴定の垂直部からはずれて正しい結果が得られない。

したがって、弱酸を強塩基で、あるいは弱塩基を強酸で中和するような場合には適切な指示薬を選ばなければならない。主要な中和指示薬と変色域を表 1 に示す。

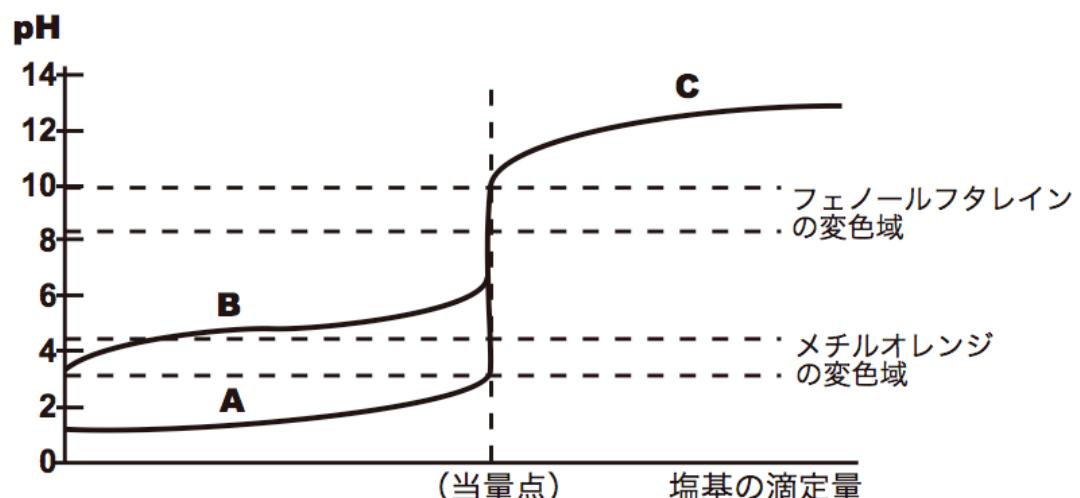


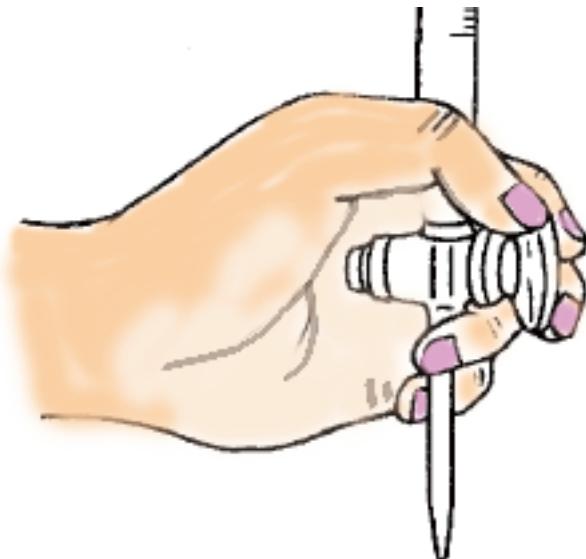
図 1 滴定曲線

表1 指示薬と変色域

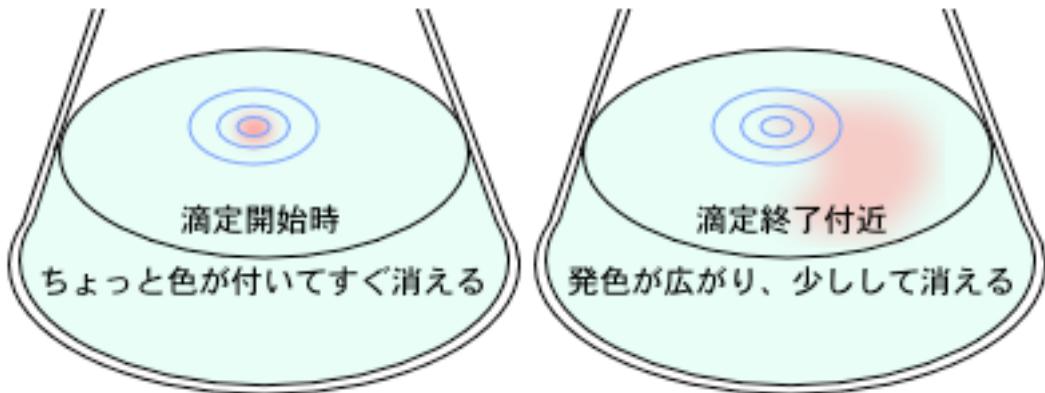
指示薬	酸性 側	アルカリ 側	変色域 (pH 範囲)
チモールブルー	赤	黄	1.2 ~ 2.8
メチルオレンジ	橙赤	黄	3.1 ~ 4.4
ブロムフェノールブルー	黄	青	3.0 ~ 4.6
メチルレッド	赤	黄	4.2 ~ 6.3
ブロムフェノールレッド	黄	赤	4.8 ~ 6.4
ブロムクレゾールパープル	黄	紫	5.2 ~ 6.8
ブロムチモールブルー	黄	青	6.0 ~ 7.6
フェノールレッド	黄	赤	6.8 ~ 8.4
クレゾールレッド	黄	赤	7.2 ~ 8.8
チモールブルー	黄	紫	8.0 ~ 9.6
フェノールフタレイン	無色	赤	8.3 ~ 10.0
チモールフタレイン	無色	青	9.2 ~ 10.6

滴定の方法

- 1) ビュレットに滴定用溶液を入れ、廃液用ビーカーを下に置いておく。コックを開けて滴下し、コックから先端までの間にあら氣泡を抜く。
- 2) 内壁に残った滴定用溶液が落ちるまで 30-60 秒程度待ち、ビュレット内の滴定用溶液の容量を読み取る。
- 3) 試料溶液に指示薬を加える。
- 4) 片手で三角フラスコを持ち、もう片方の手でビュレットのコックを開き滴定用溶液を滴下する。滴下は慎重に行う。この時ビュレットを持っている手でコックをビュレット本体の方に引き付けながら開閉の操作を行なうように心掛けて下さい。
(まずは脱塩水で練習することをおすすめします) 滴下を勢いよく行なうと、内壁に滴定用溶液を残し誤差の原因となる。



- 5) 滴下する度に三角フラスコを攪拌する。慣れれば攪拌しながら滴下することも出来るようになる。
- 6) 滴定を始めた時点では、滴定用溶液が試料溶液に落ちた瞬間に、落ちた場所に指示薬の発色が見られるが瞬時に色が消えてしまう。滴定終点に近付くと、発色する範囲と時間が拡大していく。



- 7) 滴定終点に近付いたら、一滴ずつ、もしくは一滴以下の量を少しづつ加える。一滴以下の量を加えるには、ビュレットのコックをわずかに開き、液滴が滴下しない程度に少し出し、これをガラス棒の先端に受け取り、三角フラスコの内壁に付けるか、試料溶液の水面にガラス棒の先端を少し浸けるかして、試料溶液に混ぜる。
- 8) 滴定終点の判断は初めての場合、難しい。フェノールフタレンを指示薬とした場合、滴定終点を過ぎると試料溶液がピンク色に染まる。淡くピンク色に染まる最低限度の滴下量が滴定終点である。それを超えてしまうと、その上さらに滴定用溶液を入れてもピンク色のままである。そこで初めての場合は、滴定用溶液を入れ過ぎてしまう失敗をおかしやすい。滴定終点に近付いたら、少量ずつ滴定用溶液を加え、攪拌しても淡いピンク色が残るようであれば、そこを滴定終点とする。初めのうちには、溶液の色の変化に注意し、怪しいと思ったらビュレットの目盛をこまめに記録しておくのがよい。

フェノールフタレンが発色するのは pH8.3～pH10.0 の範囲である。このアルカリ状態では大気中の CO_2 が溶け込み、滴定終点まで滴定しても数十秒程度で、 $\text{CO}_2 + \text{OH}^- = \text{HCO}_3^-$ の反応が起き、pH が低下してピンク色の発色が消えてしまうことがある。攪拌しても数秒から十数秒間淡いピンク色が持続すれば滴定終点である。その後にピンク色が消えても気にする必要はない。

基礎学生実験2：「クロロフィルの測定」

96%エタノール溶液に溶解する葉に含まれるクロロフィルの量を定量する。特に吸光度計の利用方法を習得する。

準備する試薬（各自用意）

- 1) 96%エタノールを各自約50mlを三角フラスコに取る。
- 2) どこからでも良いので葉をサンプリングしてくる。取った場所、時間、もし分かれば種、その他気づいた点をメモしておく。
- 3) 葉を可能な限り細かく裁断し、約1gを精秤し、エタノールに入れる。
- 4) パラフィルムで密封して一晩放置する。
- 5) よく混ぜた後に5Aのろ紙を用いて濾過する。ポリロート（ガラスでも問題は無い）を使って、100mlメスフラスコに直接取り、ろ紙、残さをよくエタノールで洗浄して最終的に100mlにメスアップする。
- 6) 分光光度計で波長665nmと649nmの吸光度で測定する。クロロフィルaおよびクロロフィルbは次式にて与えられる。

$$\text{クロロフィル a}(\text{mg/l}) = 13.95(A_{665}) - 6.88(A_{649})$$

$$\text{クロロフィル b}(\text{mg/l}) = 24.96(A_{649}) - 7.32(A_{665})$$

吸光度が1を越した場合は96%エタノールで希釈すること。
なお、セルはガラス製を用いること。

注意事項

- 1) ブランクに何を取るのかを考えること。
- 2) セル誤差を忘れずに。

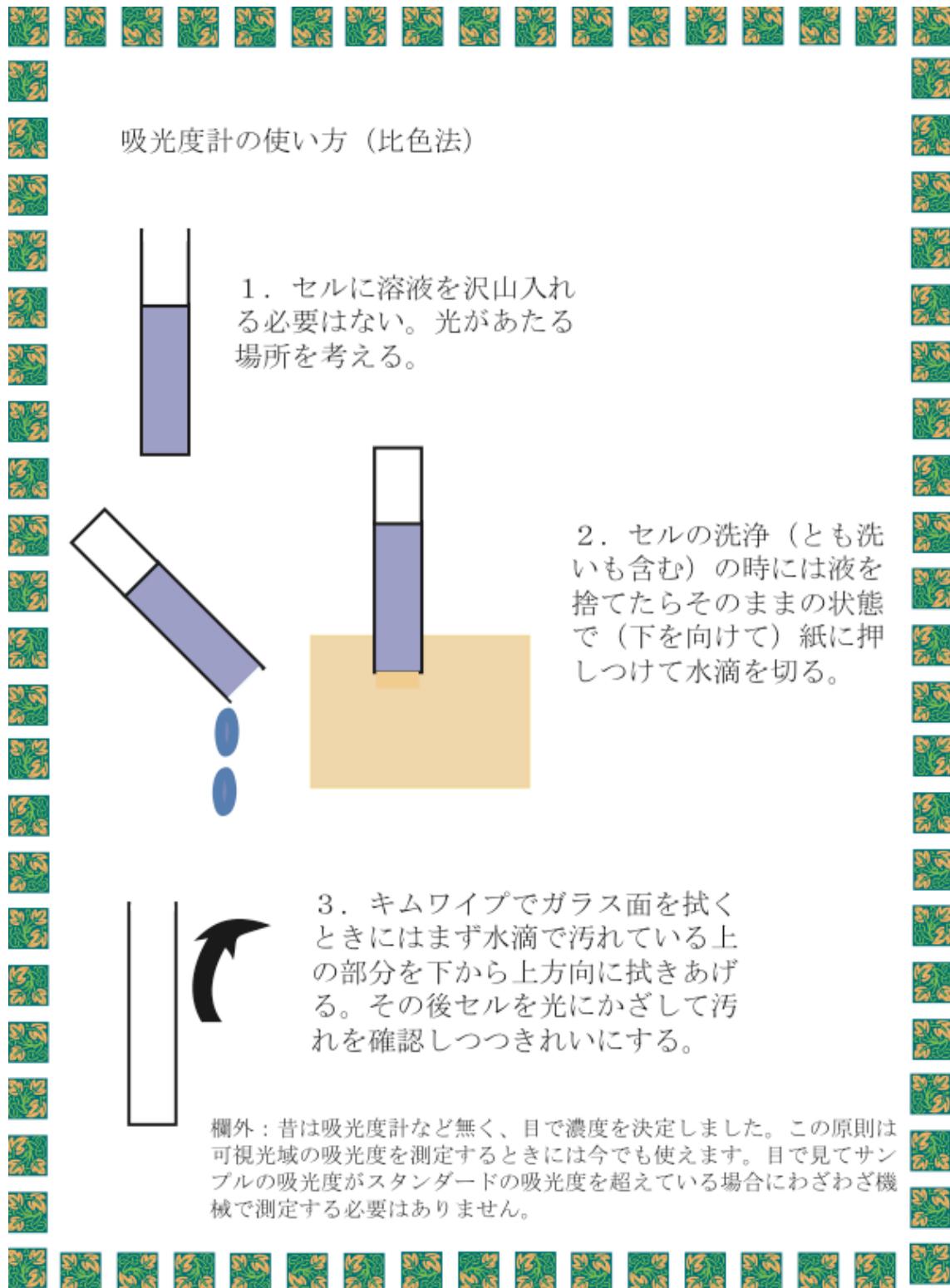
分光光度計の原理

分光光度計とは光源から出た光を波長ごとに分ける部分（分光部）と、この分けられた光が試料溶液を通過した後に届いた光の強さを測定する部分（光度計）から構成されます。光の元の強さをAとして、試料溶液を通過した後の強さをBとした場合に、以下の式から透過率(T%)が算出されます。

$$T = B/A \times 100 (\%)$$

吸光度 = $-\log(T/100)$ となり、吸光度と試料中の物質の濃度が比例関係を持ちます。吸光度と溶液中の物質の濃度が比例する理由について

は Lambert-Beer の法則に従います。(興味があれば勉強を)



表覽一
實驗器具

平成4年4月

美馬舞台 上(2人以付)

実験台下(2人用)

レポート

実験終了時に各班毎で相談をし、各自レポートを提出してもらいます。

必須記入事項：各自の測定値、平均値、班の中での各自のデータのばらつき。

実験を行なって気付いた点、反省事項。

ばらつきの考察に関しては、実験計画法で学んだ統計手法を活用して下さい。各班で同じ H_2SO_4 溶液を使っているので、全員が同じ濃度になるはずです。だから分散分析(有意水準 1%)を行えば、有意な差がないはずです。もし有意な差が出た場合、何らかの作業が誤差を生んだことになります。それは何だったのか？。分散分析で有意差がでたら、Tukey の多重比較をさらに行って下さい。全員がバラバラだったのか？一部の人だけ違う値だったのか？、が分かるはずです。これが誤差の原因を解き明かすのヒントになるかもしれません。Tukey の多重比較を行った後、班のみんなで何が誤差の原因だったのか話し合って下さい。その考察をレポートで報告して下さい。