

Title	最小自乗法を利用した終点決定を使ったo-, m-およびp-アミノ安息香酸の分光光度滴定
Sub Title	Spectrophotometric titration of o-, m- and p-aminobenzoic acids using the end point determination applied the calculations by the least-squares method to the regression lines
Author	鹿島, 哲(Kashima, Tetsu) 小出, 裕子(Koide, Yuko) 井本, 美佐(Imoto, Misa) 河村, 倫子(Kawamura, Michiko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1986
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.31 (1986.) ,p.1- 8
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000031-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

最小自乗法を利用した終点決定を使った
o-, *m*- および *p*-アミノ
安息香酸の分光光度滴定*

鹿島 哲, 小出裕子, 井本美佐, 河村倫子

Spectrophotometric titration of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic
acids using the end point determination applied the
calculations by the least-squares method to
the regression lines

Tetsu KASHIMA, Yuko KOIDE, Misa IMOTO and
Michiko KAWAMURA

Using a recording spectrophotometer with a digital recorder, the titration curves and the absorbances are recorded. A plot of absorbance vs. titrant gives a regression line, and the end point is determined by the intersection of the straight lines which are calculated by the least-squares method.

5—100 μ mol of *o*-, *m*-, or *p*-Aminobenzoic acid is titrated spectrophotometrically by 0.01*M* or 0.05*M* NaOH with an error of about one percent, using water-ethanol solvent containing one percent reducing sugar in an atmosphere of nitrogen.

1. まえがき

o-, *m*- および *p*-アミノ安息香酸は生化学的に興味のある物質なので、それらを微量で定量するため NaOH を試薬として分光光度滴定を試みた。アミノ安息香酸は普通のアミノ酸とは違い¹⁾²⁾、溶液中で双極イオンとしてではなく分子状態で存在するので水に溶けにくくエタノールに溶け易いので³⁾ 含水エタノールを溶媒とし、試料の酸化を防ぐため還元糖を加えて滴定した。

滴定装置は今まで報告⁴⁾⁵⁾⁶⁾したものを更に改良して使い、測定記録させた吸光度と加えた NaOH 標準溶液の量との回帰直線をパソコンを使って最小自乗法で決定し、当量点以降は吸光度が一定になることを利用して終点を求め、ますますの成績を挙げたので報告する。

2. 実験

2.1 試薬

o-, *m*- および *p*-アミノ安息香酸, 特級試薬, 和光純薬製, 0.01*M* 保存溶液。

スルファミン酸, 特級試薬, 米山薬品製。

水酸化ナトリウム標準溶液, Merck 製分析用試薬 NaOH の 50% 溶液を 80°C で数時間加温し

* 日本薬学会第 106 年会 (1986 年 4 月, 千葉) で一部発表

て炭酸ナトリウムを沈殿させ、その上澄液を希釈して 1M 保存溶液を調製し、スルファミン酸を用いて標定し、ソーダ石灰管をつけて保存。必要に応じて、その保存溶液を希釈して 0.01M または 0.05M NaOH として滴定に使用。

純水：用時、イオン交換法で精製したものを 1 時間煮沸し二酸化炭素を除いたものを使用。

エタノール、78°C で蒸留してきた留分を使用（共沸混合物，96.0 w/w%）

含水エタノール，水とエタノールの混合モル比，16/1，8/1，4/1，2/1，1/1 および 96 w/w% エタノール。

D-Fructose, Merck 製，生化学微生物学用。

D-Glucose, Merck 製，無水物，生化学用。

2.2 装置

自記分光光度計：島津デジタルダブルビーム分光光度計 UV 210-A 型，吸収スペクトルおよび吸光度を記録。単色光の波長幅 0.1 nm。

自動ビュレット：ラジオメーター ABUE 型（全量 2.5 ml，最小目盛 1 μ l）。

光度滴定装置：分光光度計の光路に光学石英板をはった層長 45 mm の石英ガラス製の円筒状セルを挿入し，マルチスターラーの回転部分のみを分光光度計の試料室に入れてセル内の試料溶液をかきまぜるようにした。回転速度は外部のスターラー本体で滴定前に一定に調節した。NaOH 標準溶液は自動ビュレットよりテフロン製毛細管をへて直接試料溶液内に加えた (Fig.1)。

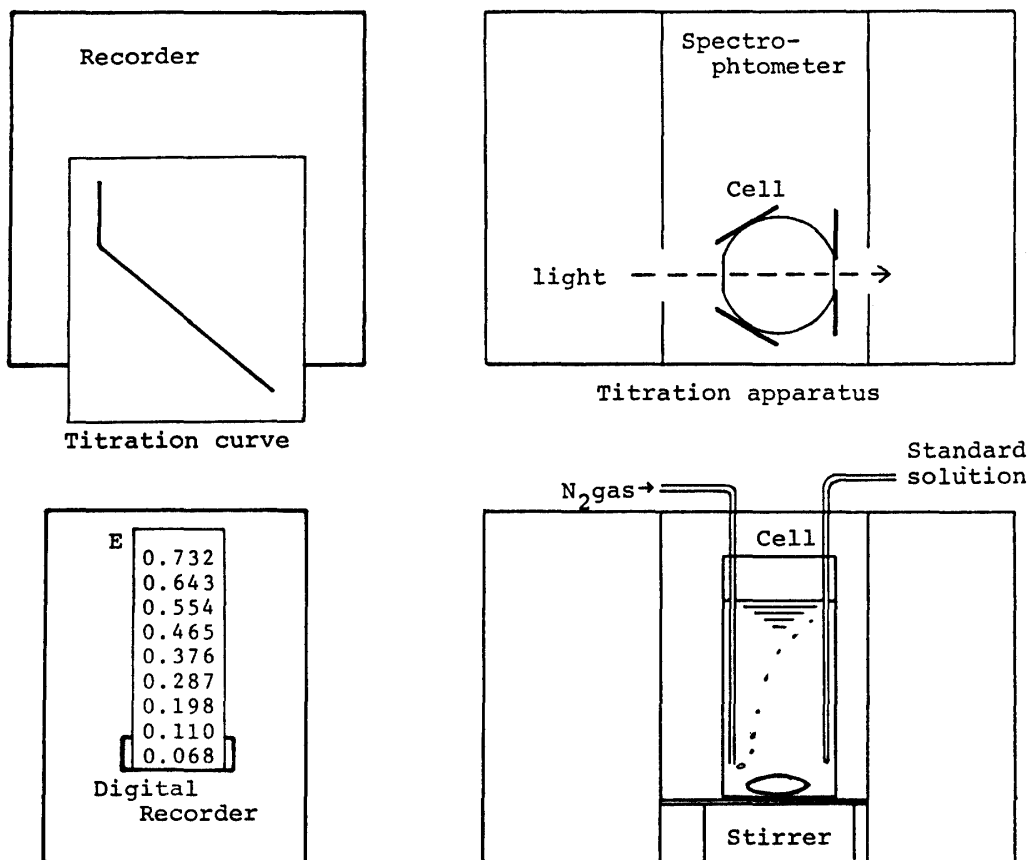


Fig. 1 System of titration apparatus

電子はかり : Mettler HL (秤量 400 g, 感量 1 mg) および 1265 型 (秤量 400 g, 感量 1 mg) いずれもプリンター付き。

2.3 実験方法

アミノ安息香酸の *o*-体は $2 \times 10^{-4} M$, *m*-体は $5 \times 10^{-4} M$ および *p*-体は $1 \times 10^{-4} M$ 含水エタノール溶液およびそれらのおのおのを NaOH で中和した溶液をつくり, それらの吸収スペクトルを測定した。ついで各アミノ安息香酸の含水エタノール溶液とそれぞれを NaOH で中和した溶液の各示差スペクトルを測定した。

5~100 μmol のアミノ安息香酸を含む試料に約 1% の還元糖を加えた試料溶液 50g を滴定用セルに入れ, 窒素ガスを通じながら 0.01M または 0.05M NaOH で滴定した。

滴定を始める前の試料の吸光度が 0.8 前後になるよう, 示差吸収スペクトルの長波長側の吸収極大の波長より長い波長を任意に選び滴定した。滴定の進行状態を見るため滴定曲線を描かせた。自動ビュレットから NaOH 標準溶液の一定量 (0.05, 0.1 または 0.2 ml) ずつ加えたところの吸光度を十数回デジタルレコーダーで記録し, その値に基づく回帰直線を最小自乗法を使ってパソコン (NEC PC-9801 F3) で計算し, 当量点以後吸光度が一定になる直線との交点を計算で求め, 終点とした。

2.4 実験結果

2.4.1 アミノ安息香酸の吸収スペクトル

例として *o*-アミノ安息香酸の含水エタノール溶液および当量の NaOH を加えた溶液の吸収スペクトルを Fig. 2 にまとめた。*m*-および *p*-体でも吸収バンドの波長および吸光度は違うが同じようなスペクトルの変化を示した。

o-アミノ安息香酸の含水エタノール溶液と当量の NaOH を加えた溶液の示差スペクトルを Fig. 3 で示した。*m*-および *p*-体でも波長および吸光度は違うが, 同じような形のスペクトルが

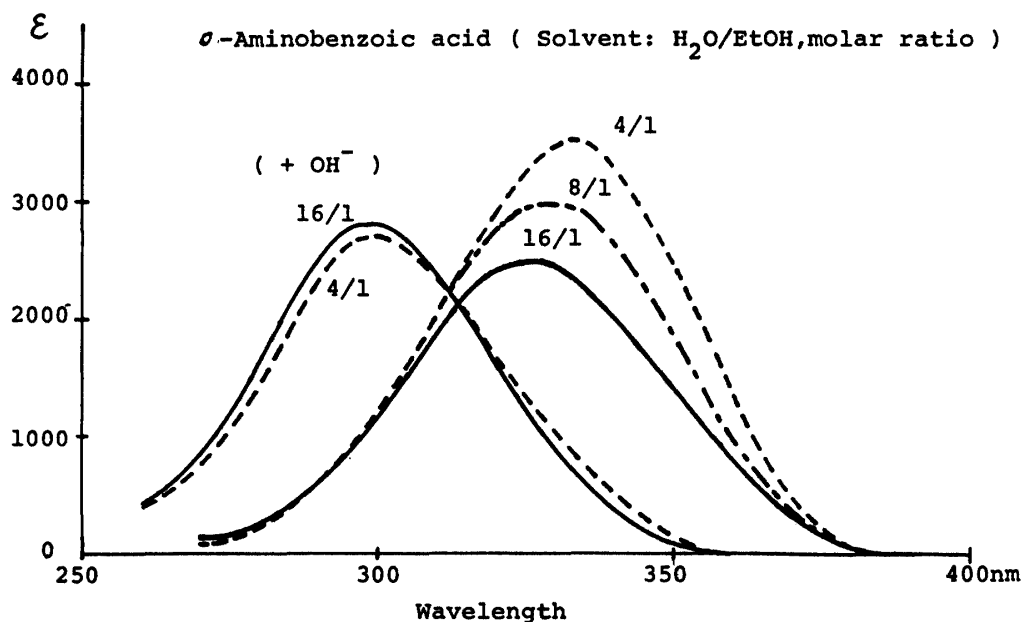
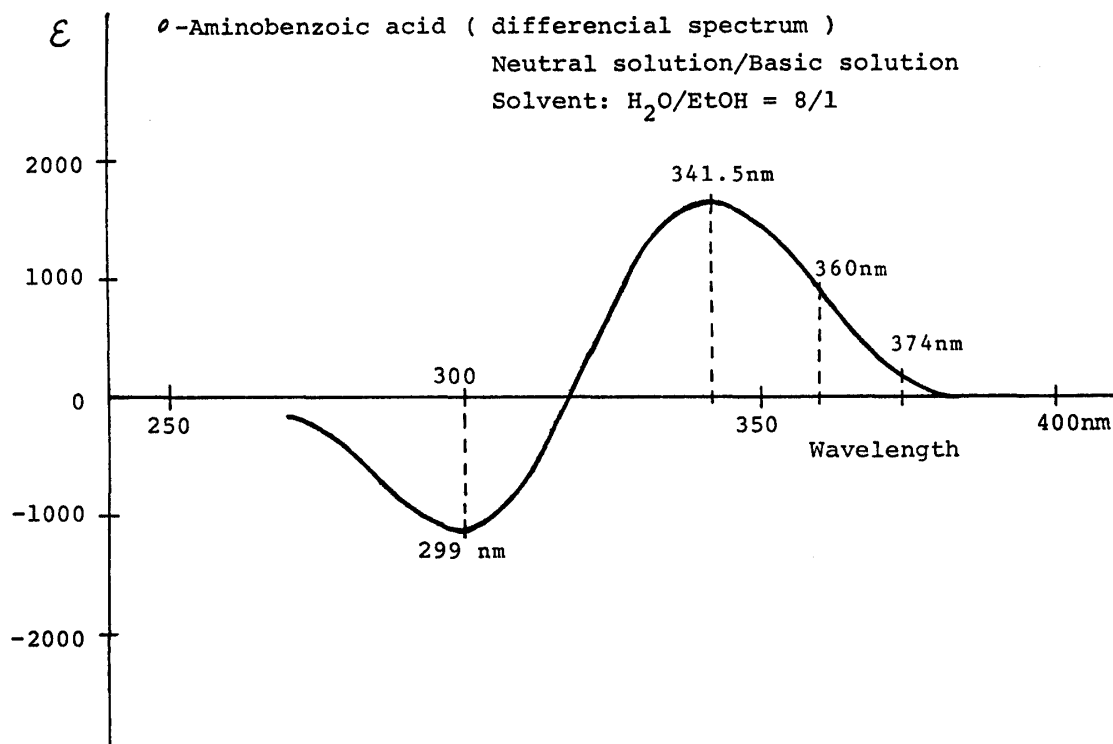


Fig. 2 Absorption spectra of *o*-aminobenzoic acid

Fig. 3 Differential spectrum of *o*-aminobenzoic acidTable I *o*-Aminobenzoic acid

Absorption spectra				
Solvent	Ethanol solution		Basic solution	
H ₂ O/EtOH	λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{\max} (nm)	ϵ
16/1	326.5	2480	310	2800
8/1	329.5	2990	310	2770
4/1	333	3510	311.5	2710
2/1	334	3640	313	2650
1/1	335	3680	314	2580
96%EtOH	335	3560	315	2510
Differential spectra (Ethanol solution/Basic solution)				
16/1	342.5	1230	300.5	-1240
8/1	341.5	1780	299	-1100
4/1	343	2320	298.5	-1110
2/1	343	2450	299	-1000
1/1	343.5	2500	299.5	-960
96%EtOH	344	2420	300.5	-974

Table II *m*-Aminobenzoic acid

Absorption spectra				
Solvent	Ethanol solution		Basic solution	
	λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{\max} (nm)	ϵ
H ₂ O/EtOH				
16/1	308.5	1070	300.5	1760
8/1	310.5	1380	300.5	1730
4/1	312.5	1660	301	1680
2/1	314.5	1730	301	1620
1/1	316.5	1700	301.5	1540
96%EtOH	320	1650	302.5	1460
Differential spectra (Ethanol solution/Basic solution)				
16/1	330.5	255	295.5	-835
8/1	327	522	293.5	-663
4/1	325.5	832	291.5	-534
2/1	326	939	291	-498
1/1	327	966	291	-483
96%EtOH	330.5	1040	292.5	-525

Table III *p*-Aminobenzoic acid

Absorption spectra				
Solvent	Ethanol solution		Basic solution	
	λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{\max} (nm)	ϵ
H ₂ O/EtOH				
16/1	281.5	13700	264.5	13910
8/1	284.5	14260	264.5	13750
4/1	286.5	14960	265.5	13080
2/1	287.5	15020	266.5	12330
1/1	288.5	15050	267	11950
96%EtOH	290	14810	268.5	11260
Differential spectra (Ethanol solution/Basic solution)				
16/1	295.5	7700	255.5	-4760
8/1	295.5	8840	255.5	-5390
4/1	296	9460	255.5	-5360
2/1	296	8980	255.5	-5000
1/1	296	9270	256	-5070
96%EtOH	296	8930	257	-4870

Table IV Determination of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acid

<i>o</i> -Aminobenzoic acid				<i>p</i> -Aminobenzoic acid			
Solvent, H ₂ O/EtOH=8/1 mol containing 1%Fructose				Solvent, H ₂ O/EtOH=16/1 mol containing 1%Glucose			
μmol	Found %	S. D. %	λ nm	μmol	Found %	S. D. %	λ nm
5	98.4	0.95	347	5	97.4	0.75	316
10	97.4	0.79	360	10	97.4	0.90	322
20	96.9	0.35	365	20	96.8	1.03	325
25	97.4	1.06	368	25	97.4	1.06	326
50	96.8	0.95	374	50	97.2	0.92	329
100	96.3	0.35	378	100	96.7	0.42	332

<i>m</i> -Aminobenzoic acid			
Solvent, H ₂ O/EtOH=4/1 mol containing 1%Fructose			
5	98.1	0.69	330
10	97.8	0.41	335
20	97.3	0.44	342
25	97.8	1.09	348
50	97.6	0.91	356
100	97.4	—	362

Standard solution 0.01 M	
Sample 5, 10 and 20 μmol	
Standard solution 0.05 M	
Sample 25, 50 and 100 μmol	
N ₂ gas flowing	

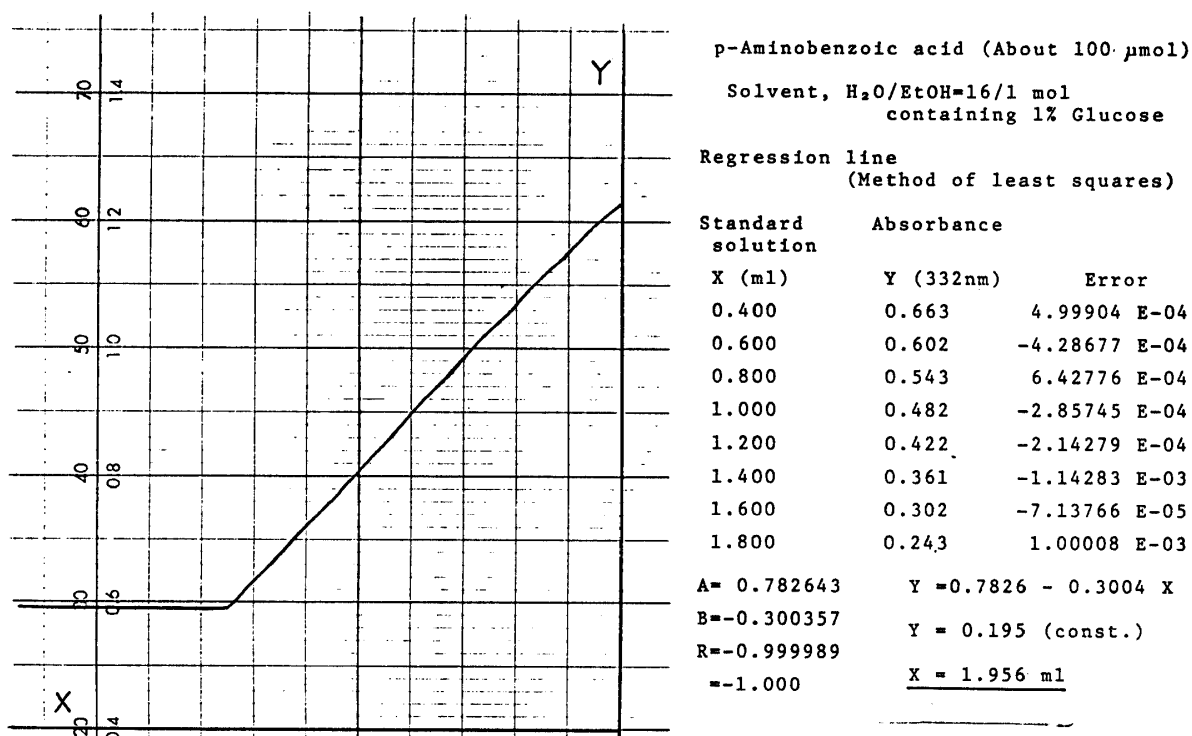


Fig. 4 Titration curve and determination method of the end point

えられた。

各アミノ安息香酸の吸収スペクトルおよび示差スペクトルのデータは Table I, II および III にまとめた。

2.4.2 アミノ安息香酸の滴定

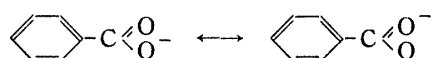
スペクトルのデータに基づいて *o*-体は水/エタノールのモル比 8/1 (24.2 w/w% エタノール) の溶媒を, *m*-体は 4/1 (40.0 w/w%) の溶媒を, *p*-体は 16/1 (13.8 w/w%) の溶媒を使い, 測定波長を 310~380 nm の間で選んで吸光度約 0.8 で滴定を始めた。

例として *p*-アミノ安息香酸の記録された吸光度と滴定量との回帰直線をパソコンを使って最小自乗法で求め, 当量点以後吸光度が一定の直線との交点を終点とする計算法と記録された滴定曲線を Fig. 4 に示した。*o*-体および *p*-体についてもほぼ同じである。

試料溶液中のアミノ安息香酸の濃度が $1\sim 20\times 10^{-4} m$ と低いので, 空気酸化などの影響を除き安定化をはかるため, *o*-体および *m*-体には 1% のフラクトースを, *p*-体には 1% のグルコースを加えて滴定した。その定量成績は Table IV にまとめた。なお, フラクトースおよびグルコースは波長 310~380 nm 間のスペクトルには影響を与えなかった。

3. 考 察

アミノ安息香酸のスペクトル⁷⁾ は水酸化ナトリウムで中和すると, 共鳴による安定化により,



いずれも 10~20 nm 短波長に移動し, そのモル吸光係数は 5~30% 減少する。そこで以上の 2 つのスペクトルの差をとった示差スペクトルの吸収極大の波長を使って光度酸塩基滴定することができる。

アミノ安息香酸は普通のアミノ酸とは違い水溶液中では大部分 $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ の分子状態で存在¹⁾ するのだから, 比誘電率が比較して低い含水エタノール中では勿論分子として存在するものと考えられる。溶媒中のエタノールの含量が増加するとアミノ安息香酸の吸収極大の波長は約 10 nm ほど長波長に移動し, それらのモル吸光係数はエタノールの含量が水と等モルになるまで増加し, *o*-体および *m*-体ではその大きさが倍程度になるが, *p*-体では僅かであった。またアミノ安息香酸の pK_a は 4.6~4.9⁸⁾ と酢酸程度なので, モル吸光係数の小さい *m*-体の溶媒にはエタノールの含量を多くし, 吸光係数の大きい *p*-体には少なくして滴定した。

o-および *m*-アミノ安息香酸の 330 および 310 nm の吸収バンドは, そのモル吸光係数が約 3500 および 1700 であることから, ベンゼンに電子吸引性のアミノ基およびカルボキシル基が結合したため長波長に移動したベンゼノイドバンド (B-吸収バンド) である。*p*-体の 280~290 nm の吸収バンドはモル吸光係数が約 15,000 と 1 桁大きいことから, ベンゼンのパラ位にアミノ基とカルボキシル基が結合したため, その共役二重結合の吸収バンド (K-吸収バンド) が長波長にシフトしたもので, ベンゼノイドバンドはその中にかくれて測定されない。

光度滴定の終点は, 記録された滴定曲線または測定された吸光度と標準溶液の量をプロットした 2 つの直線の交点として作図によって求めてきたが, その際線の引き方による誤差が 0.5~1% になることもあった³⁾³⁾⁵⁾。そこで吸光度に対し滴定量をプロットした回帰直線を最小自乗法を使ってパソコンで計算し, その相関係数が 0.9999 以上のものを, 終点後の吸光度が 0.002 以内で

一定の直線との交点を計算で求め終点とした。この方法により各測定値の誤差もキャンセルされ結局、終点の誤差は0.1%程度になった。

アミノ安息香酸を NaOH で電位差滴定したときは、試料溶液中に窒素ガスを通じるだけで正確に定量できたが⁹⁾、今回はその濃度が前回より1~2桁低い $1\sim 20\times 10^{-4}M$ なので試料の酸化を押え安定化をはかるため還元糖を加えて滴定したところ、加えない場合と比較して、その誤差を数分の1にすることができた。加えた還元糖は測定波長のところでは吸収スペクトルに殆んど影響を与えることがなかった。

光度滴定するときは通例、滴定前の吸収と当量点における吸収との差の大きい波長、つまり示差スペクトルの吸収極大の波長を使って滴定するが¹⁰⁾、それでは吸光度を測定精度のよい0.8~0.2の範囲で測定することができにくい。そこで今回は滴定が進行するにつれて吸光度が減少するので、試料溶液の吸光度が0.8前後になる波長を選択して滴定を始めた。その条件でも Fig. 4 でわかるように試料の濃度が低いため当量の20%から90%までほとんど完全にベールの法則が成立しよい成績がえられた。

なお、示差スペクトルでは吸収の差の大きいバンドが2箇処で生じるが、吸光度の差が大きく測定誤差の少ない長波長バンドを使って滴定した。また、試料溶液が50g(約50ml)なので、加えるNaOHの量0.5~2mlによる希釈誤差は測定誤差に対して無視できるものである。含水エタノール溶液を使ったが、試料は電子ばかりで重量で秤りだったので温度による体積変化を無視できるばかりでなく測定精度を上げるうえで役立った。

4. 結 論

o,m-および *p*-アミノ安息香酸 5~100 μmol と 0.5g の還元糖を含む含水エタノール溶媒の試料 50g を 0.01M または 0.05M NaOH で窒素ガスを通じながら、試料溶液と滴定後の試料溶液の吸光度の差が大きい波長で、滴定を始めるときの吸光度を約0.8になるよう定めて滴定したところ、0.4~1%の精度で定量することができた。

マイクロビュレットから加えた NaOH の液量と吸光度との回帰直線をパソコンを使って最小自乗法で定め、その直線と当量点以後一定の吸光度を示す直線との交点を計算で求めて終点とした。その方法により在来の作図法より1桁高い精度で終点を決定することができた。

文 献

- 1) J.P. Greenstein, M. Winitz : "Chemistry of the amino acids" (1961), John Wiley and Sons, New York.
- 2) 鹿島 哲, 小出裕子, 伊藤文子, 大矢公子, 河村倫子 : 共立薬大年報, No. 30, 15 (1985).
- 3) J.T. Edsall, M.H. Blanchard : *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 55, 2337 (1933).
- 4) 鹿島 哲, 河村倫子, 熊谷佳子 : 共立薬大年報, No. 28, 17 (1983).
- 5) 鹿島 哲, 河村倫子, 谷原範子, 小出裕子 : 同誌, No. 29, 1 (1984).
- 6) 鹿島 哲, 谷原範子, 笹木貴子, 鈴木裕子, 河村倫子 : 同誌, No. 30, 7 (1985).
- 7) L. Dede, A. Rosenberg : *Ber.*, LXVII, 147 (1934).
- 8) J.M. Vandenberg, C. Henrich, S.G. Vandenberg : *Anal. Chem.*, Vol. 25, 726 (1954).
- 9) 谷原範子, 土師佳子, 藪 淳子, 鹿島 哲, 河村倫子 : 日本薬学会第104年会発表 (1984).
- 10) M.A. Leonard : "Photometric titrations", *Comprehensive analytical chemistry*, edited by G. Svehla, Vol. VIII, Chap. III (1977), Elsevier, Amsterdam.