吸光光度法による溶液内平衡研究への パーソナルコンピュータの応用

飯田 康夫[Ⓐ]， 古川 正道， 柴田 正三*

(1982 年 2 月 4 日受理)

パーソナル・コンピュータにより分光光度計を制御し，吸光度測定を自動化，高精度化するとともに，データのオンライン取得を可能とした．更に，吸光度滴定により得られる一連のスペクトルを行列として処理することにより，多くの利点を見いだすことができた．

例として，六つのチアゾリルアゾ安息香酸化合物の酸解離平衡の測定を行った．その結果，スペクトルの類似している中性種と陰イオン種，及び陽イオン種を含めた三つの化学種の存在が行列のランク解析により確認された．又，平衡定数及びそれぞれの化学種のスペクトルを，非線型最小二乗法を用いてパーソナル・コンピュータで計算することにより，得ることができた．

1 緒 言

エレクトロニクス技術の急激な進歩のもとに，スペクトルデータを，デジタルの形で収集し，伝送，解析することが比較的容易に実現可能となってきた．

可視・紫外の吸収スペクトル測定においても，最近では，コンピュータを利用したオン・ラインによるデータ取得が行われ，従来のアナログ式の測定とは異なったデータ処理が施され，特に，スペクトルデータを行列として取り扱うことにより，多くの利点があることが指摘されている²⁾⁷⁾．

そこで，分光光度計による吸収スペクトル測定を，市販のパーソナル・コンピュータにより制御することによって，測定の高精度化，能率化を図るとともに，スペクトルデータを直接コンピュータ内に読み込み，フロッピーディスク上に保存し，ファイルとして種々の処理を行うことができるシステムを組み立てた．

更に，このシステムの有用性を確かめるために，吸光度滴定へと応用し，当研究室で合成された吸光度滴定試薬である一連のチアゾリルアゾ安息香酸化合物³⁾の酸解離定数の測定を行った．

2 装置の構成

吸光度測定のためのシステムの概要を Fig. 1 に示

す．又，使用した機器及びインターフェイスなどの仕様を Table 1 にまとめて示す．

吸光度シグナルは分光光度計より 0～2 V のアナログ信号として出力されている．このシグナルを AD コンバーターによりデジタル化してコンピュータ内に読み込むが，AD コンバーターの入力レベルが -5 V～+5 V であるので間に直線増幅器を入れ，レベル合わせを行っている．吸光度測定は 1 波長当たり 10 回行いその平均値

Fig. 1 Block diagram of the spectrophotometric data acquisition system

PC : Personal computer; FD : Floppy disk memory; AD : AD converter; LA : Linear amplifier; DI : Digital input interface; DO : Digital output interface; RS : RS-232C interface; SP : Spectrophotometer; DT : Digital titrator; 1 : Signal of absorbance; 2 : Information about the state of spectrophotometer; 3 : Command; 4 : Readings of pH and volume added

* 工業技術院名古屋工業技術試験所：愛知県名古屋市中区平手町 1

Table 1 List of used apparatus

	Maker, model	Remarks
Personal computer	Oki, IF-800 model 20	
Spectrophotometer	Shimadzu, UV-360	
Linear amplifier	Sanko, SK-530	Input 0~2 V Output 0~2 V
AD converter	Oki, IF-80304	Input -5 V~+5 V Output 12 bit Speed 200 μ s, error <1/2 LSB
DO interface	Sanko, IF-DO32	8 bit $\times$ 4 port, TTL
DI interface	Sanko, IF-DI32	8 bit $\times$ 4 port, TTL
RS-232C interface } 5 inch. floppy disk }	Oki	IF-800 standard system
Titration assembly	Radiometer, DTS-833	Consists of Digital titrator TTT81 Autoburette ABU80 pH meter PHM84 Titration assembly TTA80
Glass pump	Tokyo Kagaku Seiki, CV-1	
Flow cell	Nihon Sekiei Garasu, T-517	Pass length 10 mm

を測定値とする。分光光度計の状態に関する情報は DI インターフェイスによりコンピューターに伝えられる。測定波長については、0.1 nm ごとに分光光度計から出力されるパルスをカウントすることにより知ることがで

きる。操作に関する命令は DO インターフェイスより出力される。波長送りの開始、停止、及び前進、後進、更に、波長パルスカウンターのクリアなどが出力ポートのビット操作により行われる。又波長送りの速度は分光光度計に内蔵される (0.625~800) nm/min の 16 段切り替え、及び DO インターフェイスから、1 パルス当たり 0.003125 nm の駆動を行うこともできる性能を有する。

これらのシステムを制御し、データを取得するためのプログラムを作成した。フローチャートを Fig. 2 に示す。一定波長での時間による吸光度変化の測定、あるいは、任意の時間間隔による繰り返し測定など、目的により種々の測定を行うことが、プログラムの一部を変更することにより可能である。通常のスpekトル測定 (例えば、スキャン範囲 250 nm, サンプル間隔 5 nm) ではディスク容量は 1 spekトル当たり 1 クラスタ (2 KB) で十分であり、吸光度滴定のように 1 回に 20~30 の spekトルを測定しファイルを作成すると 5 クラスタ前後となる。

更に、吸光光度滴定を行うために滴定装置とコンピューターとを RS-232C インターフェイスで結び、測定液

Fig. 2 Flow chart of spectrophotometer operation program

Input parameters : Start and stop wavelength, sampling interval, absorbance range

の pH 値及び滴下量などの値を受けとることができるようにした。ここで使用した滴定装置はそれ自体にコンピュータを内蔵したものであるのでパーソナル・コンピュータによる制御は行わず測定タイミングを合わせることだけが必要であった。滴定セル周辺を Fig. 3 に示す。測定液は滴定セルよりガラスポンプによってフローセルに送られ、吸収スペクトルを測定され滴定セルに戻される。ポンプの動作は DO インターフェイスを通してコンピュータの命令により制御されている。滴定セルは二重底となっており恒温槽からの循環水により 25 °C に保たれている。測定液の循環のためのチューブにはテフロン製のものを使用した。他の種類のチューブでは、試料の吸着が認められ、不適当であった。

Fig. 3 Spectrophotometric titration apparatus

A: pH meter; B: Auto burette; C: Reference electrode; D: Glass electrode; E: Stirrer; F: Glass pump; G: Flow cell; H: Spectrophotometer cell compartment; I: Tubings (Teflon, inner diameter 3 mm); J: Titration cell; K: Delivery tip of titrant

3 測定例

吸光光度滴定法により、一連のチアゾリルアゾ安息香酸化合物の酸解離定数を測定した (Table 2)。これらのアゾ化合物は水あるいはアルコールなどの溶媒には溶け難いので、電位差滴定をこれらの溶媒で行うことは難しい。更に吸光光度試薬としての応用を考えると、吸収スペクトルについての知見も得られる吸光光度滴定法を行うことが望ましい。

チアゾリルアゾ安息香酸化合物は、溶液の pH とともに、次のような解離平衡をとるものと考えられるが、一般に、中性種と陰イオン種のスペクトルが類似しているために、通常の吸光光度法ではこれらの酸解離定数を求めることは困難である。

3.1 実験

実験はすべて 50 % (w/w) メタノール-水溶媒中で行い、過塩素酸ナトリウムによりイオン強度を 0.1 となるようにした。実験に使用したアゾ化合物は、元素分析、NMR、及び IR により純度を確認した。その他の試薬は市販の特級品を使用し、メタノールは再蒸留したものを使用した。窒素は酸及びアルカリで洗浄した後、滴定溶液と同じ組成の溶液をくぐらせたものを使用した。

吸光光度滴定は次のように行った。滴定セル内に 3×10^{-2} M の過塩素酸溶液 15 ml を入れ、これに 5×10^{-2} M の水酸化ナトリウム溶液を滴下することにより、電極系の標準電位を求め、ネルンストの式により水素イオン濃度を算定した⁴⁾。次に溶液を一度アルカリ側とし、これに試料溶液 2.5×10^{-5} M, 15 ml, 緩衝液 (酢酸ナトリウム, リン酸一水素ナトリウム, ホウ酸ナトリウム, それぞれを 5×10^{-3} M 含む) 5 ml を加えて滴定溶液とし、 3×10^{-2} M の過塩素酸溶液を加えることにより滴定を行った。測定は各試料についてそれぞれ 2 回以上行った。

3.2 結果

3.1 により得られた吸収スペクトルの一例を Fig. 4 に示す。まず、アゾ化合物の酸解離平衡に何種類の吸収を示す化学種が含まれているかを知るために、スペクトル行列のランク解析を行った⁵⁾⁶⁾。スペクトル行列は滴定における溶液の番号を行、波長の番号を列として作成し、この行列のランクを行列演算を行うことにより求めた。プログラムは, Alcock らにより開発された TR- IANG⁷⁾ を使用した。Fig. 5 に解析の結果を示す。ここで横軸はランクを求めるために必要な誤差行列の要素の大きさであり、本実験における吸光度測定の推定誤差は、0.005 である。この例では 0.0012 から 0.0096

Fig. 4 Spectra of thiazolylazo compound at varied pH

Reagent : 2-(5-Methyl-2-thiazolylazo)-5-dipropylamino-benzoic acid, 1×10^{-5} M; pH—1: 1.21, 2: 2.13, 3: 2.78, 4: 3.84, 5: 7.19

の間でスペクトル行列のランクは3となり、平衡にあづかる三つの化学種が存在することを示している。又吸光度の変化から十分に解離定数の測定が可能であることが分かる。他のチアゾリルアゾ化合物においても吸収を示す化学種の数は3と推定された。

Fig. 5 において、比較のためにピリジルアゾ化合物についての結果を示したが、この化合物では中性種と陰イオン種のスペクトルの最大吸収波長が (40~50) nm 離れているために誤差の大きな吸光度測定を行っても、スペクトルから、平衡系に吸収を示す三つの化学種が含まれていることが判断できることを示している。

Fig. 5 Matrix rank analysis of acid-dissociation equilibria of azo compounds

A : 2-(3,5-Dibromopyridylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid; B : 2-(5-Methylthiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid; pH range : 1~8

次に酸解離定数 (pK_a) 及び各波長における、それぞれの化学種のモル吸光係数を求めた。吸光光度法では、求めるパラメーターの数が多く、非線形 (pK_a) あるいは、線形 (モル吸光係数) としてスペクトル行列と関連しているために、グラフ法あるいは通常の最小二乗法では、解析が困難である。そこで Gampp らにより開発されたプログラム ELORMA⁸⁾ により解析を行った。このプログラムは単精度のコンピューターにおいても有効数字に対する安全性が考慮されており、更に、線形、非線形のパラメーターを分離して収束させる、などの特徴を持っている。

Table 2 List of reagents examined

1	TAPB	2-(2-Thiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid
2	Methyl-TAPB	2-(5-Methyl-2-thiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid
3	Dimethyl-TAPB	2-(4,5-Dimethyl-2-thiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid
4	Bromo-TAPB	2-(4-Bromo-2-thiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid
5	BTAPB	2-(2-Benzothiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid
6	Ethoxy-BTAPB	2-(6-Ethoxy-2-benzothiazolylazo)-5-dipropylaminobenzoic acid

Table 3 Acid dissociation constants and spectral absorption data of azo compounds

Reagents	pK_{a1}	pK_{a2}	Cation		Neutral molecule		Anion	
			λ_{max}	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ_{max}	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ_{max}	$\epsilon \times 10^{-4}$
TAPB	1.39 ± 0.03	4.40 ± 0.04	590	8.2	510	4.6	510	4.9
Methyl-TAPB	1.66 ± 0.04	4.43 ± 0.04	595	6.8	515	3.8	510	4.2
Dimethyl-TAPB	1.96 ± 0.04	4.64 ± 0.04	595	6.2	515	3.5	515	4.1
Bromo-TAPB	<1	4.15 ± 0.05	605	7.2	530	4.3	530	4.8
BTAPB	<1	4.18 ± 0.05	605	8.2	535	4.8	535	5.3
Ethoxy-BTAPB	<1	4.08 ± 0.05	620	7.2	540	5.0	535	5.4

λ_{max} : Wavelength of maximum absorpiton, nm

6種類のチアゾリルアゾ化合物について解析した結果を Table 3 に示す. 得られた解離定数の値についての誤差は主に pH 測定における精度に帰因すると考えることができる. 特に, Bromo-TAPB, 及びベンゾチアゾリル化合物では, K_{a1} についての平衡がかなり酸性側に偏っているので, 平衡定数を求めることは困難であった. K_{a2} については, Fig. 4 におけるように, 中性種と陰イオン種とが類似したスペクトルを示し, 最大吸収波長 (λ_{max}) も近接しているにもかかわらず, 解析結果は良好であった. 又, 測定の再現性もよく, 繰り返し測定によるばらつきは, 測定値の (1~2)% 程度であった. 最大吸収波長及びモル吸光係数は, 滴定により得られたスペクトルと pK_a 値とを考慮して算定したものである. Fig. 6 に解析によりそれぞれの化学種に分離されたスペクトルの一例を示す. スペクトルは 25 nm ごとのモル吸光係数を求めたものであるが, それぞれの化学種のスペクトルの特徴を示している. 陽イオン種, 中性種, 陰イオン種ともに Ethoxy-BTAPB が最も長波長側にピークを持っている. チアゾリル系の化合物においては, TAPB > Bromo-TAPB > Methyl-TAPB > Dimethyl-TAPB の順に最大モル吸光係数が減少していることが分かる.

Fig. 6 Molar absorptivities against wavelength for absorbing species of azo compound in acid dissociation equilibria

Reagent : 2-(5-Methylthiazolylazo)-5-dipropylamino-benzoic acid

4 結 言

分光光度計にパーソナル・コンピュータを接続する

ことにより, 測定データのオン・ライン取得が可能となり, 測定の精度, 信頼性を向上させることができた. 又, 吸光度滴定にシステムを応用し, 得られる一連のスペクトルを行列として取り扱うことにより, 平衡系に含まれる吸収を示す化学種の数を推定し, 更に平衡定数, 化学種それぞれのスペクトルをパーソナル・コンピュータで求めることが可能となった.

大型コンピュータと比較して, パーソナル・コンピュータにおいては, 記憶容量, 計算速度, 精度など幾つかの点が弱点となるが, 測定機器を効率的に制御し, 自動化を図るとともに, オン・ラインでデータを取得することができることは大きな利点である. 更に演算能力においても, 今回使用した ELORMA[®] のように計算精度に留意したプログラムであれば非線形最小二乗法などの高度な数学的処理を加えることも可能であり, 研究室におけるパーソナル・コンピュータの利用価値が大きいものであることを確認することができた.

文 献

- 1) D. E. Metzler, C. M. Harris, R. L. Reeves, W. H. Lawton, M. S. Maggio : *Anal. Chem.*, **49**, 864A (1977).
- 2) M. Maeder, H. Gampp : *Anal. Chim. Acta*, **122**, 303 (1980).
- 3) 古川正道, 飯田康夫, 柴田正三 : 日本分析化学会第 30 年会講演要旨集, p. 107 (1981).
- 4) 垣花秀武, 大滝仁志, 荻野 博, 増田嘉孝, 佐佐木行美 : 分化, **17**, 264 (1968).
- 5) J. S. Coleman, L. P. Varga, S. H. Mastin : *Inorg. Chem.*, **9**, 1015 (1970).
- 6) R. M. Wallace, S. M. Katz : *J. Phys. Chem.*, **68**, 3890 (1964).
- 7) F. R. Hartley, C. Burgess, R. M. Alcock : "Solution Equilibria", p. 313 (1980), (Ellis Horwood Ltd., Chichester).
- 8) H. Gampp, M. Maeder, A. D. Zuberbühler : *Talanta*, **27**, 1037 (1980).

☆

An application of personal computer to the spectrophotometric study of equilibrium in solution. Yasuo IIDA, Masamichi FURUKAWA, and Shozo SHIBATA (Government Industrial Research Institute, Nagoya, 1, Hirate-machi, Kita-ku, Nagoya-shi, Aichi)

A spectrophotometric titration system was constructed with Oki IF-800 personal computer and Shimadzu UV-360 spectrophotometer. For the titration system, series of spectra of equilibrium solution were automatically introduced to the personal computer by using linear amplifier and digital input interface, and these data were stored in floppy disk file. The file was used to calculate the number of absorbing species by matrix rank analysis and to determine their spectra and underlying equilibrium constants. The

system avoids the error-prone manual handling of a large amount of data, and also it saves time and can overcome some difficulties in spectrophotometry, such as overlapping of the spectra of similar species. As an example, the acid dissociation equilibria of the six thiazolyl-azo-benzoic acid derivatives were studied by this spectrophotometric titration system. The compounds have similar spectra at neutral and anionic form. Under the condition of addition of cationic one at pH range 1~8, three species were recognized by matrix rank analysis with this system. The equilibrium

constants and each spectrum were obtained by the modification of the Newton-Gauss non-linear least-squares method.

(Received Feb. 4, 1982)

Keyword phrases

personal computer controlled spectrophotometry; acid dissociation equilibria of azo compounds; matrix rank analysis; spectrophotometric titration.

アナログ変換による定周波パルス型電子捕獲検出器の 応答の直線化と昇温分析への応用

竹 内 正 博*

(1982 年 4 月 10 日受理)

定周波パルス型電子捕獲検出器の応答をアナログ変換し、昇温分析への適用性を検討した。アナログ変換した応答は通常の応答に比べて直線性が著しく改善され、特に印加するパルスの周期 (t_p) を 2000 μ s に設定したとき、 10^3 以上のダイナミックレンジが得られた。又、これまで濃度検出型に属すると考えられていた電子捕獲検出器は、セル内で起こっている電子捕獲反応の種類及び t_p によって質量検出型としても機能することが明らかとなった。昇温分析においては、応答がキャリアーガス流量の影響を受けない質量検出型として機能させることが望ましく、解離型電子捕獲反応を行う試料の場合は t_p を 2000 μ s に設定すればよいことが分かった。以上の結果に基づいて、数種の有機塩素系農薬を混合した試料について昇温分析を行ったところ、良好な結果が得られた。

1 緒 言

著者は先に定周波パルス型電子捕獲検出器 (ECD) を用いる昇温ガスクロマトグラフィーについて検討し、印加するパルスの周期 (t_p) を適切に設定することによって実用的な昇温分析が可能であることを示した¹⁾。今回は更に、応答をアナログ変換することによって直線性を改善し、それを昇温分析に適用したところ良好な結果が得られた。又、これまで一般的に濃度検出型 (Concentration-sensitive) と考えられていた ECD は²⁾、被検成分の種類及び t_p によって質量検出型 (Mass-sensitive) としても機能することが分かったので、それについて電子捕獲反応の観点から考察した。

2 実 験

2.1 装 置

既報¹⁾と同様に、ECD 用として独立した恒温槽を有する島津 GC-5A 型ガスクロマトグラフ (GC) に ⁶³Ni (10 mCi) を線源とする島津 EDC-5 型 ECD (共軸型電極方式) を取り付け、更に同 GC に付属する ECD 用電源の代わりに DuMont 404 型パルス発生器を接続した。パルス幅及び電圧はそれぞれ 2.0 μ s, 30 V に設定した。又、通常の ECD-GC は $(I_b - I_e)$ に比例する信号によってクロマトグラムを記録するので、アナログ変換器を接続して $(I_b - I_e)/I_e$ に比例する信号によってクロマトグラムを記録するようにした³⁾⁴⁾。ただし、 I_b は検出器内にキャリアーガスのみが流れているときの電離電流、 I_e は電子捕獲種が存在するときの電離電流である。

記録計は大倉電気製 D2R-2M 型を使用し、(1~10)

* 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町 3-24-1