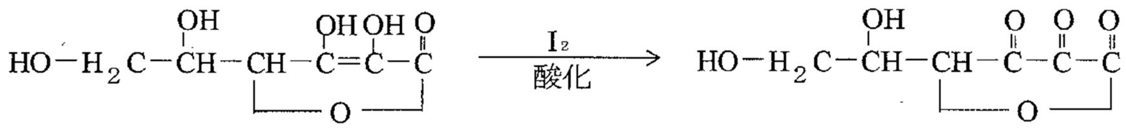
ビタミンCの熱耐性を探る

目的　ビタミン C vitamin C（正式名称：アスコルビン酸 ascorbic acid、分子式：$C_6H_8O_6$）は、ヨウ素 I_2 によって次のように酸化される。



作製したヨウ素溶液の濃度を決定し、濃度未知のアスコルビン酸水溶液の濃度を測定する。さらに、アスコルビン酸の熱耐性を探るため、加熱後のアスコルビン酸を定量する。

〔用いる試薬〕3.00×10^{-3}mol/L $Na_2S_2O_3$　チオ硫酸ナトリウム水溶液，ヨウ素液（ヨウ素 I_2 約 0.4g を 0.10mol/L のヨウ化カリウム水溶液 KIaq1.0L に溶解した溶液），デンプン水溶液，アスコルビン酸水溶液など

実験１　ヨウ素溶液の濃度決定

① 100mL ビーカーに入ったヨウ素溶液（ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液）をビュレットに入れる。

② 50mL ビーカーに入れた濃度既知（3.00×10^{-3}mol/L）のチオ硫酸ナトリウム水溶液 10.0mL をホールピペットで正確に量り取り、コニカルビーカーに入れ、これにデンプン水溶液を 10 滴程加える。

③ ビュレットからヨウ素液を滴下し、ビーカー内の色が消えずにかすかに青紫色を呈したところを終点とする。

④ 実験を数回繰り返し、ヨウ素液の濃度を決定する。

※ビュレットホールピペットは必要に応じて共洗いしたものを使用する（実験２以降も）。

	１回目	２回目	３回目	滴下量平均値
滴定担当者				
滴下前の目盛り				
滴下後の目盛り				
滴下量	mL	mL	mL	mL

実験２　アスコルビン酸水溶液の濃度測定

① 実験１のヨウ素液をビュレットに用意する。

② 200mL ビーカーに入ったアスコルビン酸水溶液をホールピペットで 10.0mL 量り取り、コニカルビーカーに入れ、これにデンプン水溶液を 10 滴程加える。

③ 実験１と同様にヨウ素液で滴定する。

	１回目	２回目	３回目	滴下量平均値
滴定担当者				
滴下前の目盛り				
滴下後の目盛り				
滴下量	mL	mL	mL	mL

＊補足

今回の実験は、酸化剤として I_2 を用いている。I_2 以外の酸化剤として過マンガン酸カリウムなどがあるが、これらは酸化作用があまりに強く、ビタミン C 以外の様々な物質をも酸化してしまうため、ビタミン C の量を正確に測定できない。また、ビタミン C 以外に酸化される物質が存在しない場合でも、前述よりさらに酸化反応が進むため、処理が複雑になる。このような理由で、この実験においてはヨウ素を用いた滴定がより適している。

実験３，４は同時進行で

実験３　加熱後のアスコルビン酸水溶液の濃度測定

① アスコルビン酸水溶液 10.0mL をはかり取り試験管に入れる。同様に 4 本準備する（内 1 本は予備)。
（実験４の分も合わせると、実際はこのタイミングで１０本準備しておく）

② 500mＬビーカーに湯を 300mL 程度入れ（給湯器の湯)、マグネチックスターラーで加熱する（約 90℃)。約 90℃になったところでビーカーに試験管 4 本（実際は 10 本）を入れ、さらにビーカーに水をたすことで水温を 70℃にし、15 分間その温度で維持する（左レバーは 300℃に設定　右レバーで撹拌子の回転をレベル２に設定)。

③ 15 分後に試験管（4 本）をビーカーから出し、水冷する。

④ 試験管からコニカルビーカーに液を移し(洗液も入れる)、実験 1 と同様にヨウ素液で滴定する。

⑤ 同様な滴定をさらに 2 回行う。

	1 本目	2 本目	3 本目	滴下量平均値
滴定担当者				
滴下前の目盛り				
滴下後の目盛り				
滴下量	mL	mL	mL	mL

実験４　加熱時間によるアスコルビン酸の変化量をみる

① アスコルビン酸水溶液 10.0mL をはかり取り試験管に入れる。同様に 6 本準備する。

② 500mＬビーカーに湯を入れ（給湯器の湯)、マグネチックスターラーで加熱する（約 90℃)。約 90℃になったところでビーカーに試験管 6 本を入れ、さらにビーカーに水をたすことで水温を 70℃に維持し、規定の時間維持する。10 分～60 分の 10 分ごとデータを取る。

③ 加熱後に試験管をビーカーから出し、水冷する。

④ 試験管からコニカルビーカーに液を移し(洗液も入れる)、実験 1 と同様にヨウ素液で滴定する。

時間（分）	10	20	30	40	50	60
滴定担当者						
滴下前の目盛り						
滴下後の目盛り						
滴下量	mL	mL	mL	mL	mL	mL

15 分後のこのタイミングで実験３用の４本は抜き取り、滴定する。

実験上の注意

・基本的には中和滴定と同じ操作である。**各器具の共洗いの必要性、滴定前のビュレットの先端部分にある気泡の除去、**
➢ **ホールピペットの扱い方、目盛りを読み取る際の桁数**等、中和滴定実験時に指導を受けたことをしっかり思い出すこと。

・交代して全員が滴定操作を行い、特定の生徒だけが滴定を行うことがないように留意すること。

・可能な限り滴定の回数を多くしてデータの信頼性を高められるよう、滴定操作を行っていない班員は次の滴定操作の準備
➢ コニカルビーカーの洗浄、ホールピペットの共洗い、試料の準備など）をするなどして協力態勢を整えること。

後片付け

・デンプン水溶液以外は流してよい。ガラス器具は水道水で洗った後，純水をかけて仕上げる。

・ビュレットは大きい流し台で洗浄（先が欠けないように注意）し、逆さまにしてビュレット台に固定し、元の位置へ戻す。

・ホットスターラーは冷ましてから箱にしまう。

実験結果の処理

・実験１で、ヨウ素とチオ硫酸ナトリウムとの反応は　$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$　で表される。

・実験２～４で、ヨウ素とアスコルビン酸との反応は　$I_2 + C_6H_8O_6 \rightarrow 2HI + C_6H_6O_6$　で表される。

他班のデータ

加熱前（実験２の結果）

1 班	2 班	3 班	4 班	5 班
mol/L	mol/L	mol/L	mol/L	mol/L
6 班	7 班	8 班	9 班	10 班
mol/L	mol/L	mol/L	mol/L	mol/L

加熱後（実験３の結果）

1 班	2 班	3 班	4 班	5 班
mol/L	mol/L	mol/L	mol/L	mol/L
6 班	7 班	8 班	9 班	10 班
mol/L	mol/L	mol/L	mol/L	mol/L

加熱時間の変化（実験４の結果）

	10 分	20 分	30 分
1 班	mol/L	mol/L	mol/L
2 班	mol/L	mol/L	mol/L
3 班	mol/L	mol/L	mol/L
4 班	mol/L	mol/L	mol/L
5 班	mol/L	mol/L	mol/L
6 班	mol/L	mol/L	mol/L
7 班	mol/L	mol/L	mol/L
8 班	mol/L	mol/L	mol/L
9 班	mol/L	mol/L	mol/L
10 班	mol/L	mol/L	mol/L
	40 分	50 分	60 分
1 班	mol/L	mol/L	mol/L
2 班	mol/L	mol/L	mol/L
3 班	mol/L	mol/L	mol/L
4 班	mol/L	mol/L	mol/L
5 班	mol/L	mol/L	mol/L
6 班	mol/L	mol/L	mol/L
7 班	mol/L	mol/L	mol/L
8 班	mol/L	mol/L	mol/L
9 班	mol/L	mol/L	mol/L
10 班	mol/L	mol/L	mol/L

やさしい t 検定

Excel を利用した t 検定①

$\boxed{1}$データを入力する

＜例＞ビタミンＣの含有量の熱変化

K3 ｜ f_x ｜ 2.98

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	加熱なし	3.21	3.34	3.26	3.22	3.15	3.21	3.08	3.32	3.15	3.07	
3	加熱あり	2.84	2.97	2.91	3.02	3.05	2.91	2.92	3.04	2.96	2.98	
4												

（単位は$\times 10^{-3}$ mol/L）

上の結果から「加熱するとビタミンＣの含有量が減少する」と判断してよいでしょうか。平均は加熱ありの方が小さいですが，本当は差がほとんどないのにたまたまこの結果が出たということはないでしょうか。

こうした問題を解くために編み出されたのが「仮説検定」という方法です。仮説検定には様々な種類があり，その実験内容によって適切な検定方法が異なります。

今回の場合は２つの母集団の平均の比較をしたいので t 検定を行います。 t 検定にも様々な種類がありますが，今回は２つの母集団の分散が等しいとは限らないと考えて検定を行うことにします。この方法をWelch（ウェルチ）のt検定といいます。

$\boxed{2}$標本平均，不偏分散を計算する。

・標本平均・・・標本（得られたデータ）の平均

・不偏分散・・・母集団の分散の不偏推定量（標本の属する母集団の分散を推定したもの）

$\overline{X}$: 加熱なしの場合の標本平均　$\overline{Y}$: 加熱ありの場合の標本平均

μ_X：加熱なしの場合の母平均　　μ_Y：加熱ありの場合の母平均

$\widehat{\sigma_X}^2$：加熱なしの場合の不偏分散　$\widehat{\sigma_Y}^2$：加熱ありの場合の不偏分散

※不偏分散の計算式　$\widehat{\sigma_X}^2 = \frac{1}{m-1}\sum_{i=1}^{m}(x_i - \bar{x})^2$，　$\widehat{\sigma_Y}^2 = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2$　【データ数－１で割る】

標本分散の計算式　$\widehat{\sigma_X}^2 = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m}(x_i - \bar{x})^2$，　$\widehat{\sigma_Y}^2 = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2$　【データ数で割る】

つまり，（不偏分散）＝m/m-1（標本分散）

※Excel 上での関数　標本平均『＝AVERAGE(B2:K2)』　不偏分散『＝VAR(B2:K2)』

M3 ｜ f_x ｜ =VAR(B3:K3)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	不偏分散
2	加熱なし	3.21	3.34	3.26	3.22	3.15	3.21	3.08	3.32	3.15	3.07	3.201	0.008277
3	加熱あり	2.84	2.97	2.91	3.02	3.05	2.91	2.92	3.04	2.96	2.98	2.96	0.0044

3 仮説検定の考え方

帰無仮説H_0：主張したいことの逆の仮説 対立仮説H_1：もともと主張したい仮説

←*「正しくない」と言いたい*

←*帰無仮説が「正しくない」と言うことで*

「正しいと」言える

仮説H_1「加熱するとビタミンＣの含有量が減少する」←*証明したい仮説*

ひっくり返す↓

仮説H_0「加熱してもビタミンＣの含有量は変わらない」←*その反対の仮説*

仮説を検証↓

仮説H_0は実験で得られたデータと矛盾する

↓

よって，仮説H_0は正しくない。つまり，仮説H_1は正しい。

4 帰無仮説H_0 ，対立仮説H_1を立てる。

帰無仮説H_0：含有量は加熱あり／なしで変わらない。$\mu_X = \mu_Y$ 対立仮説H_1：加熱すると含有量が減少する。$\mu_X > \mu_Y$

→帰無仮説H_0が成り立つとして，計算を進めます。

片側検定で行い，有意水準は５％とします。

※有意水準α・・・仮説を検証するための判断基準（帰無仮説H_0を棄却する基準）

5 統計検定量T を求める。

2で求めた値，$\mathrm{m} = \mathrm{n} = 10$(データ数)を代入する。帰無仮説$H_0$より，$\mu_X - \mu_Y = 0$とします。

$$T = \frac{\left(\overline{X} - \overline{Y}\right) - (\mu_X - \mu_Y)}{\sqrt{\frac{\widehat{\sigma_X}^2}{m} + \frac{\widehat{\sigma_Y}^2}{n}}} = \boxed{(1)\qquad\qquad}$$

（小数第３位四捨五入）

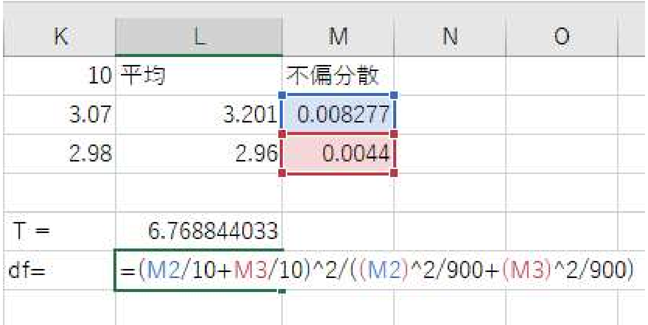
J	K	L	M	N
9	10	平均	不偏分散	
3.15	3.07	3.201	0.008277	
2.96	2.98	2.96	0.0044	
	T =	=(L2-L3)/SQRT(M2/10+M3/10)		

6　棄却域を設定する。

統計検定量T は帰無仮説H_0が正しいとすれば，自由度df　のｔ分布にしたがいます。
ただし，自由度df　の値は次のように計算します。

$$df=\frac{\left(\frac{\widehat{\sigma_X}^2}{m}+\frac{\widehat{\sigma_Y}^2}{n}\right)^2}{\frac{\left(\frac{\widehat{\sigma_X}^2}{m}\right)^2}{m-1}+\frac{\left(\frac{\widehat{\sigma_Y}^2}{n}\right)^2}{n-1}}=\boxed{(2)\qquad\qquad} \longrightarrow \boxed{(3)\qquad}$$

（小数第３位四捨五入）　　（最も近い整数）



K	L	M	N	O
10	平均	不偏分散		
3.07	3.201	0.008277		
2.98	2.96	0.0044		
T =	6.768844033			
df=	=(M2/10+M3/10)^2/((M2)^2/900+(M3)^2/900)			

自由度	0.1	0.05	0.025	0.01
1	3.078	6.314	12.706	31.821
2	1.886	2.92	4.303	6.965
3	1.638	2.353	3.182	4.541
4	1.533	2.132	2.776	3.747
5	1.476	2.015	2.571	3.365
6	1.44	1.943	2.447	3.143
7	1.415	1.895	2.365	2.998
8	1.397	1.86	2.306	2.896
9	1.383	1.833	2.262	2.821
10	1.372	1.812	2.228	2.764
11	1.363	1.796	2.201	2.718
12	1.356	1.782	2.179	2.681
13	1.35	1.771	2.16	2.65
14	1.345	1.761	2.145	2.624
15	1.341	1.753	2.131	2.602
16	1.337	1.746	2.12	2.583
17	1.333	1.74	2.11	2.567
18	1.33	1.734	2.101	2.552
19	1.328	1.729	2.093	2.539
20	1.325	1.725	2.086	2.528
21	1.323	1.721	2.08	2.518
22	1.321	1.717	2.074	2.508
23	1.319	1.714	2.069	2.5
24	1.318	1.711	2.064	2.492
25	1.316	1.708	2.06	2.485

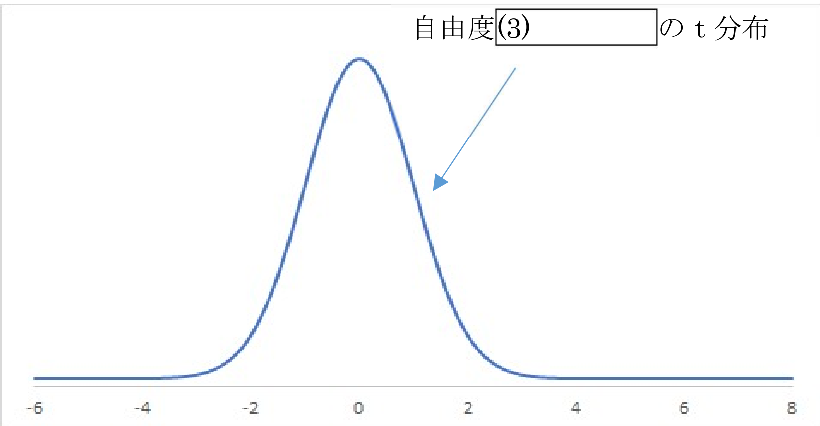
ｔ分布表（右表）により，自由度 (3) 　　のｔ分布の上側５％点は, (4) 　　　です。これが棄却域の境界値になります。

7　帰無仮説が正しいかどうかを検証する。重要

①　横軸上に（４）の値をプロットし，
　横軸に垂直に線分を引く。

②　①の線分，グラフ，横軸で囲まれた部分を塗る。これが棄却域である（斜線部分の確率は５％)。

③　横軸に上（１）の値をプロットする。



棄却域に入る理由は以下の２つ

(A)実験データから求めた$\bar{X}-\bar{Y}$が，たまたま
　滅多にないほど大きかったから。

(B)帰無仮説で仮定した$\mu_X-\mu_Y=0$が，実際
　より小さかったから。
　（＝実際は$\mu_X-\mu_Y>0$だから）

→理由(A)は滅多に起こらないので，仮説検
　定では(B)を採用します。

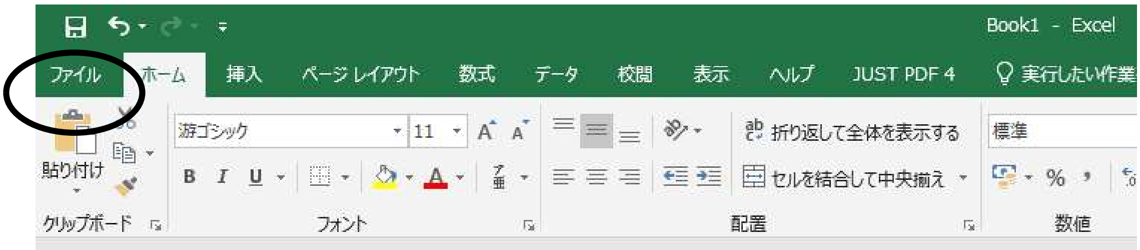
※ただし，５％の危険は含んでいます。

$$\boxed{(4)\qquad\qquad} < \boxed{(1)\qquad\qquad\qquad}$$

であるので，棄却域に含まれます。したがって，帰無仮説H_0は棄却され，対立仮説H_1が採択されます。すなわち，加熱なしの場合のビタミンＣの含有量と，加熱ありの場合のビタミンＣの含有量の平均には，有意な差があることがわかります。

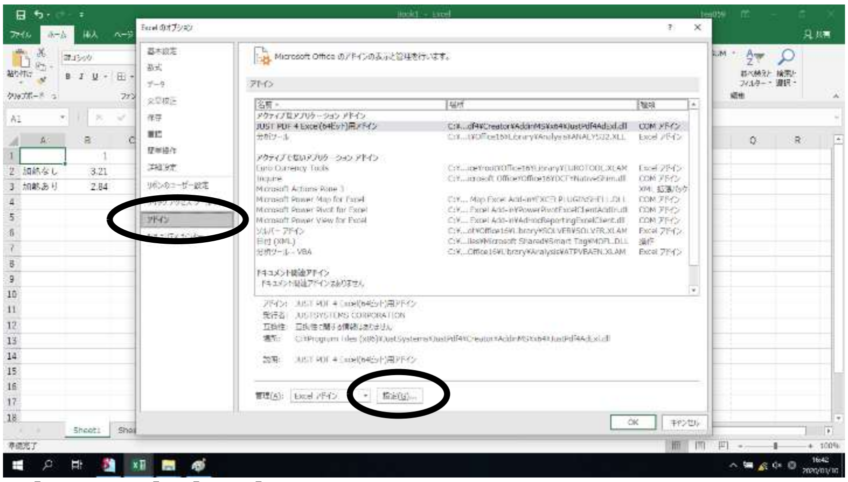
Excel を利用した t 検定②

1 分析ツールを読み込む

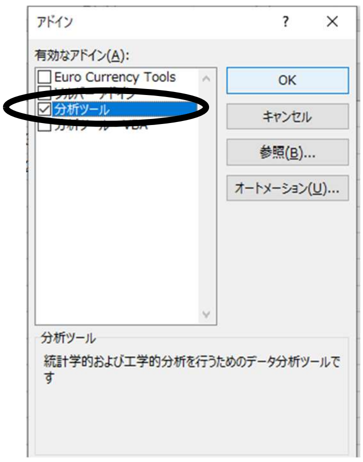


① [ファイル]タブをクリック

②[オプション]をクリック

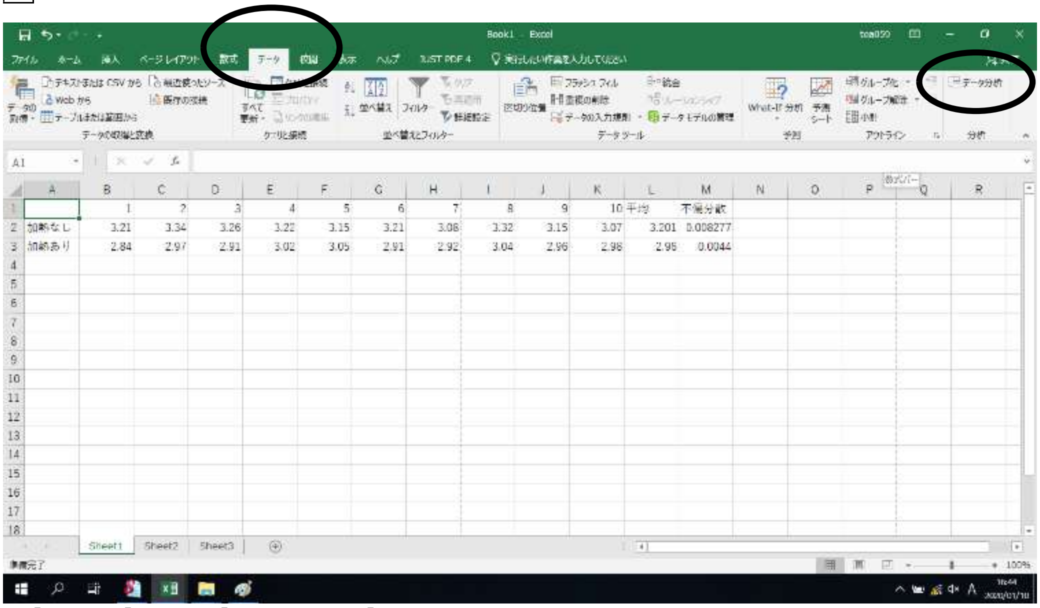


③[アドイン]→[設定]をクリック

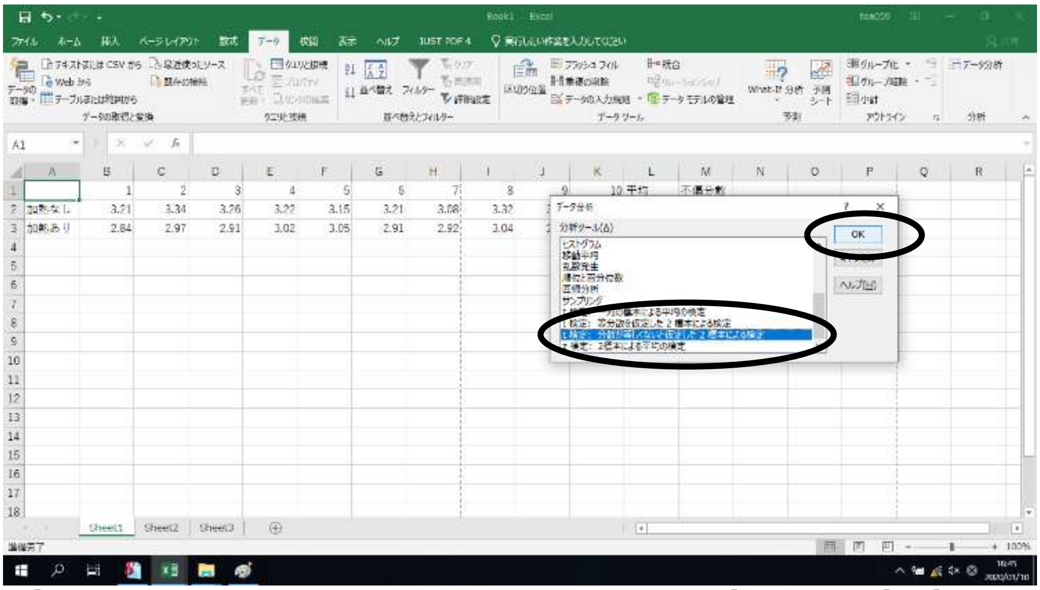


④[分析ツール]チェックボックスをオンにして[OK]をクリック

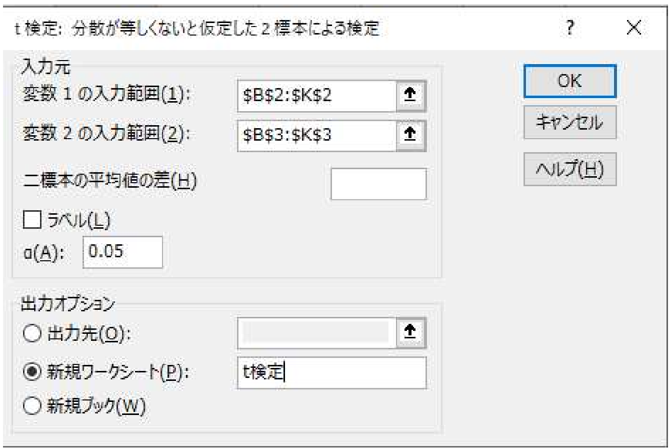
2 読み込んだ分析ツールを利用して t 検定を行う



①[データ]タブ→[分析ツール]をクリック



②[t 検定：分散が等しくないと仮定した２標本による検定]を選択し，[OK]をクリック



③変数１の入力範囲：加熱なしのデータ範囲
④変数１の入力範囲：加熱ありのデータ範囲

⑤α ：有意水準５％の検定

⑥出力オプション：t 検定という名前のシートに結果を出力する

→[OK]をクリック

3　検定結果

	A	B	C
1	t-検定: 分散が等しくないと仮定した２標本による検定		
2			
3		変数 1	変数 2
4	平均	3.201	2.96
5	分散	0.008277	0.0044
6	観測数	10	10
7	仮説平均との差異	0	
8	自由度	16	
9	t	6.768844	
10	P(T<=t) 片側	2.25E-06	
11	t 境界値 片側	1.745884	
12	P(T<=t) 両側	4.51E-06	
13	t 境界値 両側	2.119905	

太枠の数値を記入し，Excel を利用した t 検定①で求めた数値と一致することを確かめよう。

① 分散：標本を元に計算された、母集団の分散の推定値（不偏分散）

② 自由度：分散が等しくないと仮定した２標本による検定（Welch 検定）のため、正確には小数点以下も数値があるが、Excel 上では四捨五入された整数値が表示される。

③ $P(T \leq t)$片側：帰無仮説が真であるとしたときに、このデータが得られる確率

$2.25\mathrm{E}-06 = 2.25 \times 10^{-6} = 0.00000225(= 0.000225\%)$

有意水準 0.05(5%)より小さくなっています。つまり、２つのデータの平均が等しいという仮説の域に入らない（棄却域に入る）ため、帰無仮説は棄却され，２つのデータの平均には有意な差があることがわかります。

④ t境界値片側：片側検定で有意差が認められる境界値

1.745884 に対して、与えられたデータから計算した t 値が 6.7888844 となり、境界値よりも大きくなっています。つまり、２つのデータの平均値が等しいという仮説の域に入らない（棄却域に入る）ため、帰無仮説は棄却され，２つのデータの平均には有意な差があることがわかります。