

硫酸-臭化カリウム溶液中における L-システインの ヨウ素酸カリウムによる迅速電流滴定*

池田 早苗[®], 佐竹 弘^{**}

(1981 年 7 月 3 日受理)

L-システインを L-シスチン共存の影響なく微量分析できる 簡単かつ迅速な電流滴定法を開発した。

回転白金電極 (+0.6 V vs. SCE) を指示電極, SCE を対極とし, ヨウ素酸カリウム標準液で滴定することにより, 約 (0.2~1) mg の L-システインを 0.2% 以内の相対誤差と変動係数で精度よく定量できた。基礎液としては 0.5 M 硫酸 (1 M = 1 mol dm⁻³ 以下同様) と 0.4 M 臭化カリウムからなる溶液 (50 ml) が適当であった。共存物質として, L-シスチンが 10 倍モル共存しても約 1% の相対誤差で定量できた。他の共存物質の影響についても検討した。

本法は滴定試薬として JIS 標準試薬のヨウ素酸カリウムを用いるために標準液の調製が容易で標定の必要がなく, L-シスチン共存下で L-システインを迅速に定量できるという特徴がある。

1 緒 言

L-システインは容易に L-シスチンに酸化されることから, 両者が常に共存する可能性がある。このことから, L-システインの定量には L-シスチンの影響を考慮した分析条件が必要である。

著者らは先に回転白金電極を指示電極, SCE を対極とする電流滴定法により, 塩酸基礎液中で L-システインと L-シスチンをそれぞれヨウ素酸カリウムで定量する方法を報告¹⁾した。しかし, L-シスチンが共存すると L-システインの正確な定量が困難であった。

今回は前報¹⁾と同様な方法を用いて, L-シスチンの影響なく L-システインを定量する方法を見いだす目的で種々検討した。その結果, 硫酸-臭化カリウム基礎液を用い, 迅速に滴定する電流滴定法によって, この目的を達成することができたので報告する。

2 試薬, 装置及び実験方法

2.1 試薬及び装置

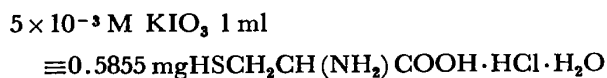
既報と同様な試薬¹⁾及び自動滴定装置²⁾を用いた。

* 回転白金電極を指示電極とする電流滴定法に関する分析化学的研究 (第 46 報)。前報は佐竹 弘, 池田 早苗, 田中雅美, 日化, **1981**, 1726

** 徳島大学工学部応用化学科: 徳島県徳島市南常三島町 2-1

2.2 実験方法

滴定セルに 5 M 硫酸 5 ml, 4 M 臭化カリウム 5 ml 及び水 35 ml を添加して 45 °C とした後, (0.2~1) mg の L-システインを含む試料溶液 5 ml を正確に量り取る。回転白金電極 (+0.6 V vs. SCE) を指示電極, SCE を対極とし, 直ちに (10⁻³~5×10⁻³) M ヨウ素酸カリウム標準液を (2~5) 秒ごとに 0.025 ml ずつ滴加 (0.025 ml/2 s) して滴定を行う。滴定曲線の 1 例を Fig. 4, 1 に示す。滴定に要する時間は 3 分以内であった。分析値は次の当量関係から求めた。



なお, 計算値は臭素酸塩滴定法³⁾によって求めた分析値から計算したものをを用いた。

3 実験結果及び考察

3.1 電流-電位曲線

著者らは前報¹⁾で回転白金電極と SCE を用い, 4 M 塩酸中で L-システインと L-シスチンをヨウ素酸カリウムで滴定した場合のヨウ素酸イオンの還元過程と電流滴定曲線の形状について報告した。

今回は 2.2 と同様な分析条件で L-システインをヨウ素酸カリウムで滴定した場合の滴定曲線の形状とヨウ素酸イオンの還元過程を検討する目的で, 前報¹⁾と同様

にポーログラフを用いて (+0.7~+0.1) V の範囲の L-システイン, ヨウ素酸イオン, ヨウ化物イオン, ヨウ素及び臭化ヨウ素の電流-電位曲線を測定した。

その結果, Fig. 1 に示すように L-システインは +0.35 V 付近から酸化電流を流しはじめ, (+0.5~+0.6) V に限界電流を与えた (Fig. 1, 2). ヨウ素酸イオンは Fig. 1, 5 に示すように +0.7 V 付近から還元電流を流しはじめ, (+0.6~0) V に限界電流を示した。又, 反応生成物と考えられるヨウ化物イオンは +0.4 V 付近から酸化電流が, 臭化ヨウ素は +0.5 V 付近から還元電流が流れはじめる曲線を与えた (Fig. 1, 3, 4). ヨウ素は Fig. 1, 6 のように +0.5 V 付近を境に酸化電流と還元電流を示す曲線となった。

3.2 電流滴定曲線

L-システイン (10^{-4} M, 10 ml) を 2.2 と同様な滴定条件において, 10^{-3} M ヨウ素酸カリウムで滴定した場合の滴定曲線と滴定途中における被滴定液の電流-電位曲線を示すと Fig. 2 のようになる。

すなわち, Fig. 1 と Fig. 2, (II) の電流-電位曲線からみて, 滴定曲線 {Fig. 2, (I), 1} の部分の試料の酸化電流は L-システインによるものであり, 2の部分の酸化電流にはヨウ化物イオンが大きく寄与しているものと考えられる。又, 3の部分の試料ではヨウ素の酸化電流と臭化ヨウ素の還元電流が, 4の部分では臭化ヨウ素の

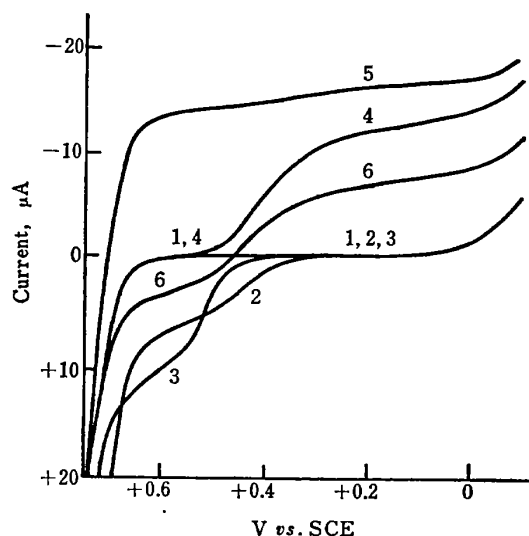


Fig. 1 Current-potential curves

(1) 0.5 M H_2SO_4 + 0.4 M KBr; (2) (1) + 5×10^{-5} M L-cysteine; (3) (1) + 1.5×10^{-5} M KI; (4) (1) + 6×10^{-6} M IBr; (5) (1) + 10^{-5} M KIO_3 ; (6) (1) + 1.5×10^{-5} M I_2 ; Indicator electrode: Rotating (2000 rpm) platinum electrode (The electrode was washed with conc. HNO_3 , and then conc. NH_3 aq. and finally with distilled water before the measurement); Voltage scan rate: 0.6 V/min

みの還元電流が認められた。5の部分ではヨウ素酸イオンの還元電流が測定されていることが分かる。なお, Fig. 2, (I) は回転白金電極を SCE に対して +0.6 V

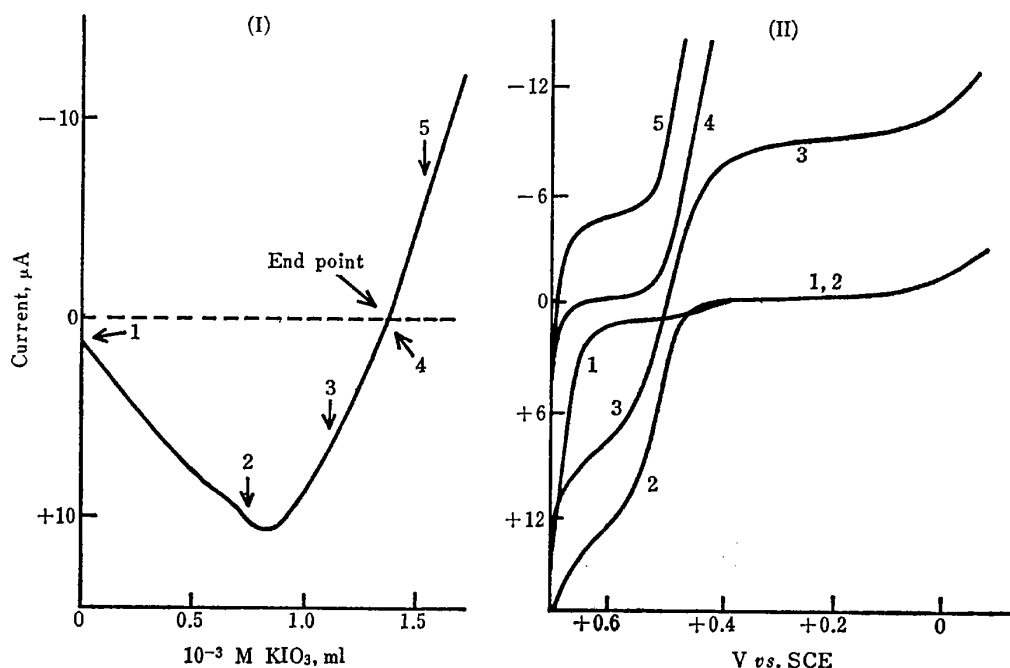
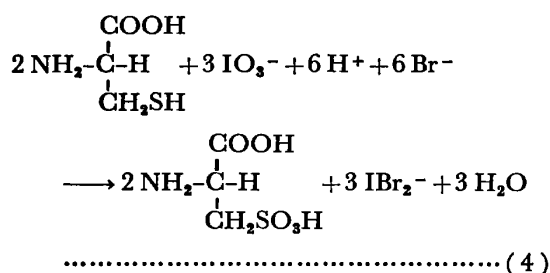
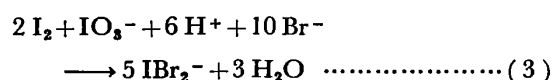
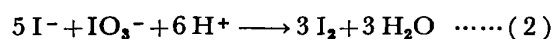
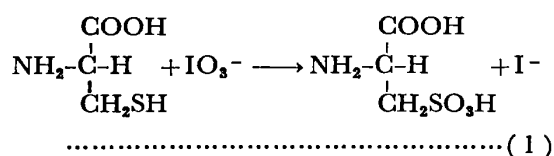


Fig. 2 A titration curve and the corresponding current-potential curves

Sample solution (50 ml) contains 10 ml of 10^{-4} M L-cysteine, 5 ml of 4 M KBr and 5 ml of 5 M H_2SO_4 ;
(I) Titration rate: 0.025 ml/2 s, titration temp.: ca. 45°C; (II) Voltage scan rate: 0.6 V/min

の電位に設定し, 硫酸-臭化カリウム基礎液中で L-システインをヨウ素酸カリウムで滴定した場合の滴定曲線の 1 例である. 終点は零電流の直線とヨウ素酸イオンの還元電流との交点からも求められるが, L-システインが共存するとヨウ素酸イオンの還元電流の直線性が悪くなり終点が求めにくくなるので (Fig. 4), 零電流の直線と終点前の直線部分との交点から求めた.

以上の結果から, 本法に用いた基礎液中における L-システインとヨウ素酸イオンとの反応は, 滴定曲線 (I) の 2 の変曲点における 滴定値とその部分における 電流-電位曲線 {Fig. 2, (II), 2} から考えると, 滴定曲線の 1→2 の範囲は, 式 (1) に示すように L-システイン 1 mol とヨウ素酸イオン 1 mol が反応して L-システイン酸とヨウ化物イオンを生成することに対応する. 次に 2 から終点までは 3 と 4 の電流-電位曲線からみて, 生成したヨウ化物イオンが滴加されたヨウ素酸カリウムにより, ヨウ素を経て臭化ヨウ素へと酸化されるものと考えられる {式 (2), 式 (3)}. このことより, 終点までの反応をまとめ, 式 (4) に示すように, L-システイン 2 mol とヨウ素酸カリウム 3 mol とが化学量論的に反応するものと考えれば, 実験結果とよく一致する.



3.3 適当な設定電位

滴定の終点が終点前の酸化電流の直線と零電流の直線との交点から求められることから, Fig. 2, (II) から考察して, (+0.65~+0.5) V の範囲に電位を設定して滴定するのが適当と考えられる.

これを確認するため, この範囲において種々電位に設定して滴定を行い, 設定電位と滴定曲線の形状との関係を検討した.

すなわち, Fig. 3 のように (+0.57~+0.65) V で滴

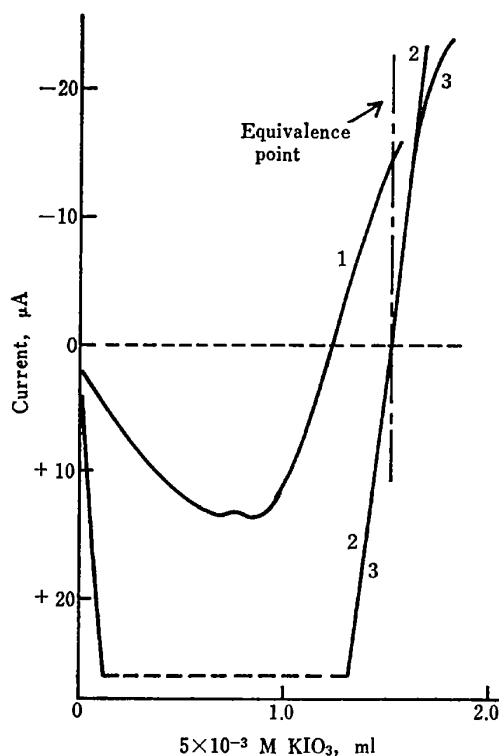


Fig. 3 Effect of applied potential on the titration curves of L-cysteine

Applied potential vs. SCE: (1) +0.5 V; (2) +0.6 V; (3) +0.65 V; Sample solution (50 ml) contains 5 ml of 10^{-3} M L-cysteine, 5 ml of 5 M H_2SO_4 and 5 ml of 4 M KBr; Titration rate: 0.025 ml/2 s; Titration temp.: ca. 45°C; The broken line indicates the region that could not be measured with the recorder.

定可能であった. 特に +0.6 V の場合には終点前と終点後の直線性がよく終点も計算値とよく一致することが分かった.

3.4 適当な分析条件

L-システイン (10^{-3} M, 5 ml) を用い, 滴定時における硫酸と臭化カリウムの濃度の影響について検討した.

その結果, 最終濃度が (0.2~0.8) M になるよう硫酸を, (0.3~0.8) M になるよう臭化カリウムを添加した溶液 50 ml を用いることにより, L-システインを精度よく定量できることが分かった. 一方, 滴定時の温度の影響について検討したところ, (37~55) °C の範囲が適当であった.

又, 滴定速度の影響について検討したところ, Table 1 に示すように標準液を (1~5) 秒ごとに 0.025 ml ずつ滴加するという比較的大きい滴定速度で滴定するのが適当であった. なお, 滴定速度が小さい場合には式 (2) で生成したヨウ素が揮散するために分析値が小さくなるものと考えられる.

Table 1 Effect of titration rate on the determination of L-cysteine

Titration rate	L-Cysteine (mg)		Relative error (%)	Coefficient of variation (%)
	Calcd.	Found†		
0.025 ml/1 s	0.8773	0.8740	-0.4	0.2
0.025 ml/2 s	0.8773	0.8775	+0.0 ₂	0.1
0.025 ml/5 s	0.8773	0.8775	+0.0 ₂	0.2
0.025 ml/10 s	0.8773	0.8555	-2.5	0.3
0.025 ml/20 s	0.8773	0.8320	-5.2	0.8

Sample solution (50 ml) contains 5 ml of 10^{-3} M L-cysteine, 5 ml of 4 M KBr and 5 ml of 5 M H_2SO_4 ; Titration temp.: ca. 45 °C; Titrant: 5×10^{-3} M KIO_3 ; † Average of four titrations

結局、最適分析条件として、0.5 M 硫酸に 0.4 M になるよう臭化カリウムを溶解した基礎液 50 ml を用いて約 45 °C とし、ヨウ素酸カリウム標準液を (2~5) 秒ごとに 0.025 ml ずつ滴加して滴定することにした。

3.5 定量限界と精度

本法による定量可能な濃度範囲とその分析値の正確度及び精度について検討した。

Table 2 に示すように、最終濃度が ($2 \times 10^{-5} \sim 10^{-4}$) M の L-システインが 0.2 % 以内の相対誤差と変動係数で最も精度よく定量された。なお、L-システインの濃度が 2×10^{-4} M 以上になると負の誤差が増加する傾向が認められた。又、低濃度 (4×10^{-5} M 以下) では窒素雰囲気中で滴定を行った。

Table 2 Determination of L-cysteine

Concentration (M)		L-Cysteine (mg)		Relative error (%)	Coefficient of variation (%)
L-Cysteine	KIO_3	Calcd.†	Found††		
3.2×10^{-4}	10^{-2}	2.788	2.875	-3.0	0.1
2×10^{-4}	10^{-2}	1.797	1.775	-1.2	0.1
1.2×10^{-4}	5×10^{-3}	1.078	1.078	± 0.0	0.0
10^{-4}	5×10^{-3}	0.8747	0.8747	± 0.0	0.1
4×10^{-5}	10^{-3}	0.3594	0.3588†††	-0.2	0.1
2×10^{-5}	10^{-3}	0.1797	0.1795†††	-0.1	0.1
2×10^{-6}	10^{-4}	0.01767	0.01692†††	-4.2	0.3

† Bromatimetric titration³⁾; †† Average of five titrations;

††† The titration was performed under nitrogen atmosphere.

又、本法をA社製 L-システインとB社製 L-システイン・1 塩酸塩・1 水和物の 2 種類の市販試薬の純度測定に適用したところ、Table 3 に示すような結果が得られた。

本法はヨウ素滴定法とよく一致することから、L-システインの純度測定及び標定に利用できるものと考えられる。なお、L-システインは中性及びアルカリ性溶液においては分解しやすいので、試薬は窒素気流中で除酸素水

Table 3 Determination of the purity of commercial reagent

Sample	Iodometry ⁴⁾ (%)		Present method (%)	
	Purity†	c. v.††	Purity†	c. v.††
$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	98.12	0.2	98.06	0.1
$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	{ 97.83 97.36	{ 0.1 0.2	{ 97.67 97.19	{ 0.1 0.1

† Average of five determinations; †† Coefficient of variation

100 ml と 10 M 硫酸 5 ml に溶解して試料溶液を調製した。

3.6 共存物質の影響

硫酸-臭化カリウム基礎液を用い、L-システイン (10^{-3} M, 5 ml) の滴定に及ぼす L-シスチンの影響について検討したところ、Fig. 4 のような結果が得られた。

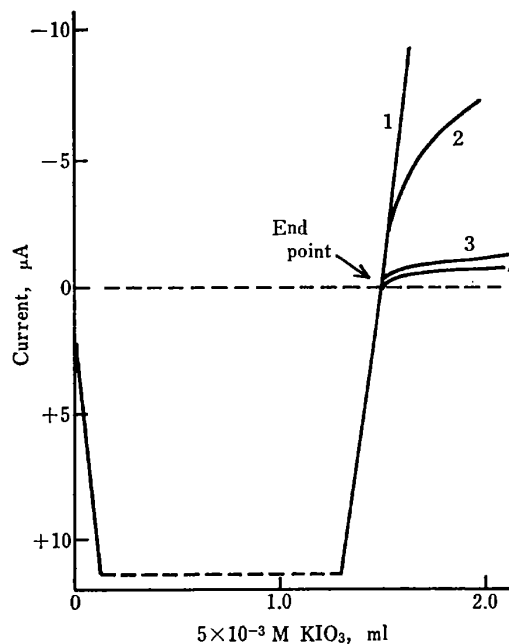


Fig. 4 Effect of L-cystine on the titration curves of L-cysteine

(1) Without L-cystine; (2) With 2×10^{-5} M L-cystine; (3) With 10^{-4} M L-cystine; (4) With 2×10^{-4} M L-cystine; Sample solution (50 ml) contains 10^{-4} M L-cysteine, 0.4 M KBr and 0.5 M H_2SO_4 ; The broken line indicates the region that could not be measured with the recorder.

すなわち、0.2 倍モルの L-シスチンが共存しても、Fig. 4, 2 のように L-システインの終点後ヨウ素酸イオンの還元電流が測定されることから、L-シスチンとヨウ素酸イオンとの反応はかなり遅いものと考えられる。1 倍モルの L-シスチンが共存すると Fig. 4, 3 のようにヨウ素酸イオンの還元電流は小さくなるが、L-システイ

システインの終点には影響を与えなかった。又、10 倍モルの L-シスチンが共存しても L-システインを約 1% の相対誤差と 0.1% の変動係数で定量でき、L-シスチンは分析にほとんど影響を与えないことが分かった (Table 4)。

このことから、硫酸-臭化カリウム基礎液中では、L-シスチンが共存しても、L-システインとヨウ素酸イオンが優先的に反応して滴定されるため、ほとんど定量の妨害にならないものと考えられる。

又、L-シスチン (10^{-3} M, 5 ml) 共存下で L-システインの定量に及ぼす他の共存物質の影響について検討したところ、Table 4 に示すような結果が得られた。

Table 4 Effect of concomitant compound on the determination of L-cysteine in the presence of L-cystine

Concomitant compound	Molar ratio [Compound] [L-Cysteine]	Relative† error (%)	Coefficient of variation (%)
L-Cystine	1	-0.1	0.1
	10††	-1.0	0.1
L-Methionine	0.2	+6.6	0.1
L-Tyrosine	1	+2.1	0.1
L-Histidine	10	-0.1	0.1
L-Phenylalanine	10	+0.1	0.2
NH ₄ Cl	50	+0.1	0.1
Na ₂ SO ₄	50	+0.1	0.1
KNO ₃	10	+0.1	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	+0.1	0.2
BaCl ₂ ·2H ₂ O	10	+0.1	0.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10	+0.1	0.1
Sr(NO ₃) ₂	10	-0.1	0.1
Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	10	-0.1	0.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	-0.1	0.1
Al(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	10	-0.1	0.2
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	10	+0.1	0.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5	-0.1	0.1
Cr(NO ₃) ₃	2	-1.8	0.3
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10	+0.1	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	±0.0	0.2
Pb(NO ₃) ₂	2	-0.1	0.1
Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O	2	-1.4	0.2
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	10	-0.1	0.2
HgCl ₂	0.4	-1.6	0.2

Sample solutions: L-cysteine (10^{-3} M, 5 ml) + L-cystine (10^{-3} M, 5 ml); Titrant: 5×10^{-3} M KIO₃; † Average of four titrations; †† Sample solution: L-Cysteine (10^{-4} M, 5 ml)

すなわち、50 倍モルの塩化アンモニウム、硫酸ナトリウム、10 倍モルの L-ヒスチジン、L-フェニルアラニン、硝酸カリウム、塩化カルシウム、塩化バリウム、塩化マグネシウム、硝酸ストロンチウム、硝酸ニッケル、硫酸亜鉛、硝酸アルミニウム、硝酸コバルト、塩化鉄(III)、硝酸カドミウム、5 倍モルの塩化マンガン(II)、2 倍モルの硝酸鉛は滴定に影響を与えなかった。0.2 倍モルの L-メチオニン、1 倍モルの L-チロシンは正の誤差を与えた。又、2 倍モルの硝酸クロム、硝酸ビスマス、0.4 倍モルの塩化水銀(II)は 2% 程度の負の誤差を与えるが、L-システインの定量は可能であることが分かった。

3.7 分析方法の比較

L-システイン単独及び L-システインと L-シスチン混合物の試料溶液を用いて、ヨウ素滴定法⁴⁾、臭素酸塩滴定法³⁾ (以上目視法)、ヨウ素酸塩滴定法⁷⁾、塩化水銀(II)滴定法⁵⁾、本法 (以上電流滴定法) 及びフェリシアン化物滴定法⁶⁾ (デッドストップ法) の 6 方法で L-システインを定量した。

Table 5 に示すように、L-システイン単独の場合、塩化水銀(II)滴定法が本法と比較して低い値を示したが、他の方法では本法とよく一致する分析結果が得られた。又、L-システインに対して 1 倍モルの L-シスチンを含む混合試料中の L-システインを分析したところ、塩化水銀(II)滴定法⁵⁾、フェリシアン化物滴定法⁶⁾ 及びヨウ素滴定法⁴⁾ では本法とよく一致する分析値が得られた。臭素酸塩滴定法³⁾ 及びヨウ素酸塩滴定法⁷⁾ の場合には L-シスチンが滴定に影響を与えた。

本法は塩化水銀(II)滴定法⁵⁾ などのようにアルカリ性で滴定する場合と比較して、L-システインが安定な酸性溶液中で滴定できることから、分析操作が簡単、迅速で精度のよい定量が可能である。又、前報¹⁾ の塩酸基礎液中で滴定した場合に比べて、硫酸-臭化カリウム基礎液を用いるため L-シスチンの影響なく、L-システインを定量できるという特徴がある。

Table 5 Comparison of the results obtained by various methods

Method	L-Cysteine (mM)	L-Cysteine (%)			
		Purity	c. v.†††	Purity††	c. v.†††
Amperometric method	KIO ₃ †	0.005	97.26	0.2	97.11
	KIO ₃ ¹⁾	0.005	97.40	0.2	—†††
	HgCl ₂ ⁵⁾	0.005	96.34	0.3	96.50
Dead-stop method	K ₃ Fe(CN) ₆ ⁶⁾	0.2	96.87	0.2	96.70
Visual method	KBrO ₃ ³⁾	0.1	97.20	0.2	—†††
	I ₂ -KI ⁴⁾	0.2	97.40	0.2	97.20

† Present method; †† Mixed solution of L-cysteine and L-cystine (Molar ratio=1:1); ††† L-Cysteine interfere the titration; †††† Coefficient of variation

4 結 論

回転白金電極 (+0.6 V vs. SCE) を指示電極, SCE を対極とする電流滴定法により, 硫酸-臭化カリウム基礎液中で L-システインをヨウ素酸カリウムで簡単かつ迅速に微量分析できる方法確立し, L-シスチン存在下においても L-システインが定量できることを明らかにした。

基礎液としては 0.5 M 硫酸と 0.4 M 臭化カリウムからなる溶液 (50 ml) が適当であり, 滴定温度約 45 °C においてヨウ素酸カリウム標準液を (2~5) 秒ごとに 0.025 ml ずつ滴加して電流滴定することにより, (0.2~1) mg の L-システインを精度よく定量することができた。滴定に要する時間は 3 分以内で極めて迅速な定量が可能である。

なお, 本法はヨウ素酸イオンが L-システインと優先的に反応することを利用したもので, L-シスチンの妨害を受けずに前者のみを選択的に定量できるという特長を持っている。

(1980 年 10 月, 日本分析化学会)
(第 29 年会において一部発表)

文 献

- 1) 佐竹 弘, 池田早苗, 田中雅美 : 日化, **1981**, 1726.
- 2) 佐竹 弘, 池田早苗 : 分化, **28**, 468 (1979).
- 3) Y. Okuda : *J. Biochem.* (Tokyo), **5**, 201 (1925).
- 4) S. Ashutosh : *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **287**, 316 (1977).
- 5) I. M. Kolthoff, W. Stricks, L. Morren : *Anal. Chem.*, **26**, 366 (1954).

- 6) H. G. Waddill, G. Gorin : *Anal. Chem.*, **30**, 1069 (1958).

☆

Rapid amperometric titration of L-cysteine with potassium iodate in sulfuric acid-potassium bromide media. (Studies on analytical methods by amperometric titration using a rotating platinum electrode. XLVI.) Sanae IKEDA and Hiromu SATAKE (Faculty of Engineering, Tokushima University; Minamijosanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima)

A rapid and precise method for the determination of L-cysteine in the presence of L-cystine was developed by amperometric titration using a rotating (2000 rpm) platinum indicator electrode at the potential of +0.6 V vs. SCE. L-Cysteine could be titrated at ca. 45 °C by adding 0.025 ml portions of potassium iodate solution at intervals of (2~5) s in the presence of 0.4 M potassium bromide and 0.5 M sulfuric acid. L-cysteine {(0.2~1) mg} was determined with a relative error and a coefficient of variation of less than 0.2 %. L-Cysteine in ten-times excess amounts of L-cystine could be determined with a relative error of less than 1 %. The titration required only 3 min. The recommended procedure is as follows. Place 5 ml of sample solution containing (0.2~1) mg of L-cysteine into the titration cell. Add 5 ml of 5 M sulfuric acid, 5 ml of 4 M potassium bromide and 35 ml of water. Titrate the resultant solution with (10^{-3} ~ 5×10^{-3}) M potassium iodate standard solution amperometrically.

(Received July 3, 1981)

Keyword phrases

determination of L-cysteine in the presence of L-cystine with potassium iodate; amperometric titration; rotating platinum electrode; sulfuric acid-potassium bromide; L-cystine.