研 究 報 文

高速液体クロマトグラフ法を用いた過酸化水素定量法の検討

独立行政法人森林総合研究所 眞柄謙吾, 池田 努, 杉元倫子, 細谷修二

Quantitative Analysis of Hydrogen Peroxide by High Performance Liquid Chromatography

Kengo Magara, Tsutomu Ikeda, Tomoko Sugimoto and Shuji Hosoya
Forestry and Forest Products Research Institute

眞柄謙吾

池田 努

杉元倫子

細谷修二

Hydrogen peroxide is generally determined by an iodometric titration method. This method is determining the oxidation-ability of a sample solution. If any compounds that have oxidation-ability toward iodide are involved in the sample solution, the oxidation-ability of those compounds will be counted as a part of hydrogen peroxide. Accordingly, when the reaction mechanisms of oxygen or ozone bleaching are investigated using model compounds, the drawback become serious. Because some of the compounds formed during the bleaching may have oxidation-ability and be still kept in the reaction mixture after the bleaching. The method is, therefore, required to separate hydrogen peroxide from some compounds having oxidation-ability and to determine the accurate amount of hydrogen peroxide.

To satisfy these requirements, chromatographic determination of hydrogen peroxide was investigated using high performance liquid chromatography (HPLC). Hydrogen peroxide was reported to be separated by a ligand exchange type column in which a sulfonated polystyrene/divinyl benzene cation-exchange resin was packed¹⁾.

In our report, the analytical conditions to determine hydrogen peroxide were investigated using the reported column. The column body made with stainless steal resulted in the decomposition of hydrogen peroxide during the separation. This drawback was improved by the addition of EDTA in the eluent. The detection of hydrogen peroxide was accomplished by an electrochemical detector (ECD) with a platinum electrode (+0.45 V of voltammetric charge toward a reference electrode). When the highly acidic or alkaline samples were injected to the column, the separated acid or base would remove a coating by oxidized substrates on the electrode resulting in the disorder of a baseline, because the current between a working and a counter electrode changes suddenly. Therefore, sufficiently buffered solution was needed as an eluent of HPLC-ECD.

Keywords : hydrogen peroxide, high performance liquid chromatography, EDTA

分類 : K₈ 過酸化水素漂白, Y₁ 基礎化学一般, Y₀ その他

1. 緒 言

紙パルプ分野において、正確な過酸化水素の定量は必須の課題である。過酸化水素漂白においてその漂白液を調製する場合、過マンガン酸カリウム滴定法やヨウ素滴定法によって過酸化水素の定量を行うことが多い²⁾。この中でヨウ素滴定法の場合、過酸化水素は酸性条件下でヨウ化カリウムからヨウ素を遊離するが、この反応はやや遅い反応とされている。この時、酸の濃度は反応速度を増加させるが、同時に空気酸化によるヨウ素の遊離を促進する³⁾。過酸化水素が数パーセント含まれるような高い濃度の溶液の場合、これらは大した測定誤差とはならないが、希薄溶液の場合は注意を要する。また、ヨウ素滴定法では溶液中の酸化力を定量することになるが、漂白後の残存過酸化水素量を定量する場合に他に酸化力を持つような生成物が生じていれば、正確な残存過酸化水素量は得られない。

ヨウ素滴定法や過マンガン酸カリウム滴定法以外に、四塩化チタンの水溶液で比色定量を行う方法もある²⁾。この方法では鮮やかな橙色の発色が認められるが、他の過酸化水素でも同様の発色を呈するので、過酸化水素に対して選択的というわけではない。

過酸化水素の定量法は、上記したように様々な問題点を含んでいるが、それらは、濃度が高く、かつ不純物の混入していない溶液を定量する場合には、大きな問題とはならない。むしろ、酸素漂白やオゾン漂白など、活性酸素種を高度にコントロールしながらリグニンを分解する必要がある漂白反応において生成する過酸化水素量を定量する時のように、含有濃度が数マイクロモル以下のオーダーでかつ共雑物が多い場合に、定量誤差が大きくなり、正確な漂白反応の評価を困難にする。

よって、本報告では、これまでに過酸化水素を分離することができるという報告されたカラム¹⁾を用い、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 上で過酸化水素を他の反応生成物と分離し定量するための分析条件について検討した。

2. 実 験

2.1 材 料

実験に用いたリン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸ナトリウム、過酸化水素 (32.8%) 及びメタノールは純正化学より試薬特級を購入して用いた。過酸化水素の正確な濃度は、ヨウ素滴定法により決定した²⁾。バニリルアルコールは東京化成より購入し、酢酸エチルより再結晶して使用した。ベラトリルアルコールは東京化成より購入した。Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2 Na) は、試薬特級を和光純薬より購入した。アセトニトリルは、純正化学より高速液体クロマトグラフ用を購入して用いた。HPLC の溶離液に用いた水は、BOX STILL WS-12 (柴田科学) に

より蒸留しミリ Q ラボ (ミリポア) により精製した。Os ポリマー/パーオキシダーゼ混合物は、ビー・エー・エスより購入した。

2.2 検 出 器

過酸化水素の電気化学検出には、LC 4 C 電気化学検出器 (Bioanalytical systems) を用いた。検出セルは 6 mm φ の白金作用電極を備えたラジアルフローセル (ビー・エー・エス, ガスケット厚 50 μm) を使用し、溶離液を 0.4 ml/min で送液した。印加電圧は銀/塩化銀参照電極に対する電圧で示した。示差屈折率検出器による検出は、RI-101 (Shodex) を用い、0.5 ml/min の流速で溶離液を送液した。カラム温度が 40℃ の時は検出器セル部を 40℃ とし、65℃ の時は 60℃ とした。紫外分光検出器による検出は HP 1100 ダイオードアレイ検出器 (ヒューレットパカード, G 1315 A) を用い、20℃ の恒温室に設置してベースラインドリフトを防いだ。検出波長は 215 nm, バックグラウンド波長は 360 nm とした。

2.3 分析カラム

Sugar Pak KS-801 カラム (8.0 mm I. D. × 30 cm length), KS-801 D (8.0 mm I. D. × 15 cm) および OHpack SB 802.5-HQ (8.0 mm I. D. × 30 cm) は Shodex より購入した。SCR-101 N カラム (7.9 mm I. D. × 30 cm) は、島津製作所より購入した。Excelpack CHA-E 11 (7.8 mm I. D. × 30 cm) は、横河アナリティカルシステムズより購入した。Aminex HPX-87 N (7.8 mm I. D. × 30 cm) は日本 BIO-RAD より購入した。Develosil RPAQEOUS AR-3 (4.6 mm I. D. × 15 cm) は、野村科学より購入した。

2.4 サイクリックボルタモグラム (CV)

過酸化水素、バニリルアルコールおよび EDTA-2 Na を含むリン酸ナトリウム緩衝液の CV は、ALS 611 A 型電気化学アナライザー (エー・エル・エス) を用いて取得した。作用電極は 1.6 mm φ の白金電極 (ビー・エー・エス, 002013), 対照電極は 0.8 mm φ の白金線 (ビー・エー・エス, 002233), 参照電極は銀/塩化銀電極 RE-1 B (ビー・エー・エス) を用いた。試料はアルゴンガスにより 30 分間脱気し、2 秒の静止時間の後、電位走査速度 0.2 V/sec で 1.0 から -0.8 V までの走査を 10 回繰り返した。

2.5 Os ポリマー/パーオキシダーゼによる電極の修飾

ラジアルフローセル用 6 mm φ グラッシカーボン電極 (ビー・エー・エス) 上に Os ポリマー/パーオキシダーゼ混合物 1 μL を塗布し、5℃ で 24 時間乾燥した。続いて、25% グルタルアルデヒド溶液 1 μL を Os ポリマー/パーオキシダーゼ混合物上に塗布し、5℃ で 24 時間乾燥した。これを白金作用電極の代わりにセルに取り付け、印加電圧 0 V で過酸化水素の検出を行った。

2.6 オゾン漂白モデル実験

ベラトリルアルコール約 0.4 g を 0.2 M リン酸水溶液 250 ml に溶解し、500 ml 用三つ口フラスコ中で 6% のオ

ゾンを含む酸素ガスを 0.5 ml/min の流速でバブリングして常温でオゾン酸化した。反応後、反応液中に残留するオゾンは窒素をバブリングして追い出し、生成した過酸化水素を HPLC とヨウ素滴定により定量した。反応液中のオゾンの有無は、同一試料にオゾンを選択的に分解する硫酸酸性臭化ナトリウム水溶液を添加した後¹⁾、ヨウ素滴定を行うことにより確認した。

3. 結果および考察

3.1 分離カラムの選択

液体クロマトグラフのカラムにより物質を分離する場合、親水性や疎水性、サイズ、イオン強度、特定の物質や置換基への親和性などその物質の持つ何らかの特徴を手がかりに分離方法を探索するが、過酸化水素の場合、分離の際立った特長がなく、またその分解性の高さから、そういった化合物の持つ特徴を分離に十分生かすことができなかった。

1994 年に Miyazawa 等¹⁾が、Sugar Pak KS-801 カラムを用いて過酸化水素を分離することに成功した。このカラムは本来糖分析用に開発されたカラムであり、スチレンジビニルベンゼン-スチレンスルホン酸の三元共重合体ゲルを担体として、そのスルホン酸の対イオンにナトリウムを配した、配位子交換とサイズ排除を分離機構とするものである⁵⁾。そのカラム中での過酸化水素の分離機構は現在のところ不明であるが、対イオンがナトリウムの場合、配位子交換能はほとんど働かないとされている⁵⁾ことに加え、Fig. 1-1 に示すように、メタノールの後に溶出するところから、サイズ排除が主たる分離機構であると推定する。

筆者等も、1997 年に、SCR-101 N カラムおよび KS-801 D カラムを用いてリグニンモデル化合物のオゾン酸化時に生成する過酸化水素を分離定量した⁶⁾。また、Takahashi 等⁷⁾は、1999 年に Miyazawa らと同じカラムを用いて、HPLC による過酸化水素の分離定量を報告している。

この種のカラムには、配位子に他の対イオンを用いたものもある。その中で、糖と有機酸の同時検出用に用いられる H⁺を対イオンとしたもの (Excellpack CHA-E 11) で過酸化水素の分離能を確認した。溶離液には 0.1% リン酸を用い、40℃ で分析を行ったところ、Fig. 1-2 に示すように過酸化水素はカラムのボイドボリューム部分に溶出した。このカラムの分離機構はイオン排除とサイズ排除で構成されているので、まず硫酸や塩酸などの強い酸が官能基のスルホン酸と反発して最初に溶出するが、ほぼ同じ保持時間で過酸化水素も溶出した。過酸化水素は硫酸ほど強い酸ではないので、この溶出機構は不明であるが、分離分析に適さないことは明らかとなった。

シリカ系逆相カラムでは、過酸化水素は親水性が高すぎるために、親水性/疎水性の差による分離は困難であり、また、シリカゲルに含まれる微量重金属の影響から、過酸化水素がカラム内で分解され検出感度が低下する可能性もある。Fig. 1-3 に、Develosil RPAQEOUS AR-3 による過酸化水素分析例を示した。このカラムはシリカ系充填剤を用いているが C-30 の炭素鎖を導入することにより水

Fig. 1 Chromatograms for the analysis of hydrogen peroxide

100% の溶離液での分離に対応している。しかし、過酸化水素はカラムのボイドボリューム部分に溶出しており、分離は不可能であった。

分離機構がサイズ排除によるのであれば、Gel filtration chromatography (GFC) 用カラムによる分離の可能性はある。よって、OHpack SB 802.5-HQ を用いて過酸化水素の溶出時間を確認した。結果は Fig. 1-4 に示すように KS-801 と同様な分離が可能であった。さらに低分子量物質の分画に用いる SB 802 を使用すればメタノールと過酸化水素の溶出間隔を長くすることは可能と思われるが、基材がポリヒドロキシメタクリレートのため親水性物質同士の親和性によるものと思われるピークのテリングが認められた。この他に、糖やアミノ酸を分離するためのアニオン交換カラムや陰イオンクロマト用カラムもあるが、それらは溶離液がアルカリ性となるので過酸化水素が解離してカラム基材と反応する可能性もあり、検討しなかった。

3.2 溶離液の選択

溶離液の選択は、使用する検出器の種類と密接に関係する。Miyazawa 等¹⁾は、ルミノールを用いた化学発光法により過酸化水素を検出したため、溶離液は糖分析と同じように水のみであった。この場合、KS-801 カラム本体はステンレス製であるため、カラム内での過酸化水素の分解が懸念される。これを押さえるためには、安定剤としてごくわずかのキレート剤を添加することが有効である²⁾。Taka-

Table 1 Changes in the ratio of peak areas between hydrogen peroxide and methanol*

Concentration ($\mu\text{M}/\text{mL}$)		Peak area ratio** ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Methanol}$)	
Hydrogen peroxide	Methanol	with EDTA-2 Na	without EDTA-2 Na
108.2	241.9	1.22	1.18
5.2	11.5	1.33	1.30

* Conditions of the analysis were the same with those shown in Fig. 1-1.

** An average of five determinations.

hashi ら⁷⁾は、溶離液を水とし、ポストカラムで 10 mM の硫酸ナトリウムと 10 μM の EDTA-2 Na を添加した。彼等は化学発光法ではなく電気化学法を用いて過酸化水素を検出したが、ポストカラム反応液の添加は、その電気化学検出器に電解質を添加するためと、カラム分離後の過酸化水素を EDTA-2 Na で安定化させるためであると思われる。検出器に白金電極を用いた電気化学検出器を使用して過酸化水素を検出する場合、溶離液には必ず電解質を添加せねばならない。また、カラムやインジェクターおよびポンプ材質にステンレス鋼が使用されている場合、溶離液にごく微量のキレート剤を添加して過酸化水素を安定化させることが検出感度の向上に有効である。Table 1 に、カラムボディーのみステンレス鋼製で、他の接液部はすべて樹脂部品で構成された HPLC を用いて、Fig. 1-1 の条件で過酸化水素を検出した場合の、EDTA-2 Na 添加の有無による検出ピーク面積の変化を示した。この分析条件では RI 検出器を用いて検出を行ったが、その場合、EDTA-2 Na の有無によって溶離液の屈折率が変化するため、それに伴って過酸化水素のピーク面積も変化する可能性がある。よって、メタノールのピーク面積に対する過酸化水素のピーク面積の比として過酸化水素のピーク面積変化を検討した。カラムボディーのみステンレス製の場合は、配管までステンレス製の場合に比較して金属への接液面積が小さくなるので、過酸化水素の分解も限定的になると考える。それでも、過酸化水素/メタノールの面積比は EDTA-2 Na を 0.25 mM 添加することにより 1.18 から 1.22 へと増加し、EDTA-2 Na 添加による過酸化水素安定化効果が存在することを示していた。よって、Takahashi 等⁷⁾のようなポストカラムではなく、溶離液中に EDTA-2 Na を直接添加することとした。EDTA-2 Na によるステンレス腐食の可能性は否定できないが、今のところ HPLC やカラムボディーに顕著な腐食が生じたという報告はない。

電気化学検出器を使用する場合に添加する電解質の種類について、Takahashi 等⁷⁾のように緩衝能のない硫酸ナトリウムを用いると、電極表面の状態の変化によりベースラインが大きく乱れることがある。Fig. 2-1 は、25 mM の硫酸ナトリウムに 0.25 mM の EDTA-2 Na を添加した溶離液をカラムに流し、過酸化水素を検出したものである。過酸化水素試料に硫酸を少量加えて酸性化した (pH 2.5) が、このカラムの分離機構上すべての酸はボイドボリューム部分に溶出する。その硫酸により電極表面が洗浄され、

Fig. 2-1 Detection of hydrogen peroxide with a 25 mM sodium sulfate solution as an eluent

Fig. 2-2 Detection of hydrogen peroxide with a 25 mM sodium phosphate solution as an eluent

ベース電流値が大きく変化した結果、ベースラインジャンプが生じたものと考え。一方、25 mM リン酸二水素ナトリウム + 0.25 mM EDTA-2 Na と、25 mM リン酸水素二ナトリウム + 0.25 mM EDTA-2 Na から調製した pH 7 のリン酸ナトリウム緩衝液を溶離液とした場合、そのようなベースラインジャンプは認められなかった (Fig. 2-2)。よって、溶離液には緩衝能を持った電解質を添加することが安定した分析に必要と考える。また、配位子がナトリウムであることと、カラムの使用 pH 範囲が 5-9 (Aminex HPX-87 N, BIO-RAD) であることから、pH 7 程度のリン酸ナトリウム緩衝液が適していると考え。

3.3 検出器の設定

過酸化水素漂白に使用する数ミリモルレベル濃度の過酸化水素なら、Fig. 1 に示すように示差屈折率検出器を用いて検出することも可能である。この分離では溶離液に 25 mM 硫酸ナトリウム + 0.25 mM EDTA-2 Na を使用しカラム温度を 40℃ まで上げているが、過酸化水素は検出が可能であった。また、過酸化水素は 215 nm に極大吸収を持つので²⁾、もし妨害物質が共存しなければ紫外分光検出器を用いることも可能である。しかし、マイクロモル以下の濃度レベルになると、電気化学検出器を使用する必要がある。電気化学検出器で過酸化水素を検出する場合、多くは白金電極を用い、印加電圧 0.4~0.5 V で過酸化水素が酸化分解されるときに流れる電流を検出することになる。Fig. 3 (上) に、0.25 mM EDTA-2 Na を含む 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 中での過酸化水素のサイクリックボルタモグラム (CV) を示した。過酸化水素は酸化されて水と酸素に分解するので、酸化還元の可逆反応的な CV⁸⁾ は示さない。また、還元側の電流値が大きくなっていることから、酸化側ではなく還元側で検出することにより大きな感度を得られる可能性があるが、還元側では溶離液や注入試料溶液中の溶存酸素が電極上で還元されてバックグラウンド電流が高くなるため、検出が困難になるとされている⁹⁾。Fig. 3 (下) に、前記した EDTA を含むリン酸ナトリウム緩衝液の CV を示した。0 V 付近に還元ピークが認められたが、0.2~0.8 V までの間は電位の窓となっており、特異的な酸化・還元ピークは認められな

Fig. 3 Cyclic voltammograms of hydrogen peroxide and the eluent

った。そこで、本報告では、過酸化水素の電気化学検出器による検出例¹⁰⁾を参考に 0.45 V を印加電圧として設定した。

3.4 定量における問題点の検討

電気化学検出器は、電極間での電気分解による破壊型の検出器であるが、試料の電気分解と同時にその電極表面も変化を受ける。グラッシカーボン電極としてフェノール系化合物を検出すると、電極表面に試料分解物による酸化皮膜が形成され、感度が暫時低下することはよく知られている¹¹⁾。貴金属である白金電極の場合、感度の大きな低下は認められないが、電極表面の変化に伴うバックグラウンド電流の減少に伴ってベースラインがドリフトし、検出ピーク面積が大きくなることがある。Fig. 4-1 に、前出のリン酸ナトリウム緩衝液 (EDTA-2 Na を含む) を溶離液として過酸化水素検出に関するピーク面積の変化を示した。ピーク面積は時間の関数として変化しており、過酸化水素

Fig. 4-1 Changes of peak areas during the determination of hydrogen peroxide by the electrochemical detector with sodium phosphate buffer as an eluent

Fig. 4-2 Changes of peak areas during the determination of hydrogen peroxide by the electrochemical detector with sodium sulfate solution as an eluent

の電気分解に伴う電極表面の変化ではなく、ベースラインのドリフトを原因としていることが明らかである。Fig. 4-2に前出の 25 mM 硫酸ナトリウムを溶離液としたときのドリフトの状態を示した。この図では、感度が低下する方向にドリフトが進行しており、また 80 min 以降にベースラインジャンプが生じた。ベースラインジャンプは注入試料によるものと推定するが、ドリフトは、溶離液の種類、濃度、流速および電極への印加電圧等によって変化するため、分析中に時々濃度既知の標準試料を注入し、ドリフトの具合を確認する必要がある。よって、電気化学検出器の場合、他の HPLC 用検出器のように検量線を作って定量を行うと誤差が大きくなるので、何回かの試料分析毎に標準試料を定量分析し、ドリフトによる感度の変化を修正しながら一点検量を行う必要がある。

ドリフトによる検出感度の変化以外に定量精度に影響を及ぼす問題として、共雑物とのピークの重なりがある。特にグアヤコールやバニルアルコール、トリメトキシフェノールといったフェノール性水酸基を持つ化合物が存在すると、それらは使用カラムの基材であるスチレン-ジビニルベンゼン共重合体に強く保持されて一回の分析時間内には溶出されず、分析何回か後に溶出されてくる。この場合、それら化合物の溶出時間を予測することが困難なため、試料注入をずらして重なりを回避することが難しい。Fig. 5-1 にバニルアルコールによる一例を示した。バニルアルコールのなだらかなピークの上に過酸化水素のピークが乗る形になっているが、ベースラインが直線ではないことと、単純にピークが上についているように見えるがベース電流値がバニルアルコールのピークにより変化していることにより、正確な過酸化水素のピーク面積を算出することは不可能である。こうした時には、化合物の CV を元にその印加電圧値を変化させて検出選択性を高めることが可能である。Fig. 6 に pH 7 でのバニルアルコールの CV を示した。印加電圧 0.45 V におけるバニルアルコールの酸化還元電流は約 0.7×10^{-5} A であるが、これを 0.3 V まで下げることにより 0.2×10^{-5} A まで減少させることが可能であった。結果を Fig. 5-2 に示した。この印加電圧の変更により過酸化水素も同様に酸化還元電流値が小さくなるので感度は低下するが、バニルアルコールと比較するとその度合いが小さいため、過酸化水素検出の選択性を向上させることができる。

バニルアルコールなどの保持時間を短縮するためには、アセトニトリルなどの有機溶媒の添加が効果的である。KS-801 カラムの場合、最大 20% まで添加が可能であるので 20% のアセトニトリルを溶離液に添加し、その効果を検討した。Fig. 5-3 に示したようにアセトニトリルの添加は、バニルアルコールの溶出を早めることが可能であった。しかし、この方法では電解質でないアセトニトリルを添加したため、過酸化水素の検出感度が添加しない場合と比較して低下した。また、塩化ナトリウムや塩化カリウムの水溶液を内部液として使用した銀-塩化銀参照電極を用いる場合、有機溶媒の内部液への混入により参照電極の電位が不安定となる場合があるので注意を要する¹²⁾。

Fig. 5-1 A peak of hydrogen peroxide on the peak-tail of vanillyl alcohol (+0.45 V of voltammetric charge toward the reference electrode)

Fig. 5-2 A peak of hydrogen peroxide on the peak-tail of vanillyl alcohol (+0.30 V of voltammetric charge toward the reference electrode)

Fig. 5-3 Rapid elution of vanillyl alcohol by the addition of acetonitrile in the eluent (+0.45 V of voltammetric charge toward the reference electrode)

検出選択性を向上させる他の方法として、電極を酵素等で修飾することが可能である。Heller ら¹³⁾は、Poly (1-vinylimidazol) と Osmium 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl chloride の錯体を用いてグラッシカーボン電極上にパーオキシダーゼを固定化し、印加電圧 0 V により過酸化水素を検出した。この錯体を用いて、カーボンをプリントしたフィルム電極上（作用電極 3 mm φ）にパーオキシダーゼを固定し、過酸化水素検出に供した。結果は、Fig. 7 に示すようにネガティブピークとなったが、バニルアルコールの溶出に伴うベースラインの乱れは認められなかった。また、ピーク面積は 6 mm φ の白金電極 (0.45 V) と比較して約 1/2 となったが、作用電極面積が 1/4 となっているこ

Table 2 Hydrogen peroxide generated during ozonation* of veratryl alcohol

Reaction time (min)	Generated hydrogen peroxide ($\mu\text{M}/10\text{ ml}$)		Remained veratryl alcohol ($\mu\text{M}/10\text{ ml}$)
	HPLC	Iodometry	
0	0.0	0.0	96.7
10	37.8	98.0	73.9
22	65.5	160.1	0.2

*Ozonation was carried out in 0.25 M phosphate solution at room temperature.

Fig. 6 Cyclic voltammogram of 10 mM Vanillyl alcohol in 25 mM sodium phosphate buffer at 25°C, pH 7

Fig. 7 A detection peak of hydrogen peroxide with a carbon electrode modified with peroxidase immobilized by an osmium-polyvinylpyrrolidone complex (+0.0 V of voltammetric charge toward the reference electrode)

とを考慮すると、むしろ感度は向上したと言える。よって、Os ポリマー/パーオキシダーゼ混合物による電極の修飾は、酵素を使用するため、強酸性や強アルカリ性の試料を直接注入することは難しいと思われるが、過酸化水素の検出選択性や感度を向上させるためには有効な手段であると判断する。また、さらに種々の化合物に対する確認は必要であるが、Heller らの報告にあるように¹³⁾、フローインジェクションにより過酸化水素センサーとして使用できる可能性もあるので、カラムを除去し流速を 0.15 ml/min とし過酸化水素の検出を検討した。EDTA を含まないリン酸

Fig. 8 Improvement of the progressive decrease of peak area by the addition of EDTA in the eluent on the hydrogen peroxide detection with the enzymatically modified electrode

ナトリウム緩衝液 (25 mM, pH 7.0) を溶離液として流した場合、Fig. 8 に示すように、EDTA を 0.25 mM 含むリン酸ナトリウム緩衝液と比較して初期感度は高くなったが、分析途中の低下が著しかった¹⁴⁾。この検出感度の経時的な低下は EDTA を溶離液に 0.25 mM 添加することにより認められなくなり、定量を行うことが可能となった。フローインジェクションでは一試料あたり数分で分析が終了するので、リアルタイムで過酸化水素の濃度をモニタするには有効な手段であると考えられる。

3.5 オゾン漂白モデル実験における過酸化水素の定量

これまで検討した HPLC-ECD での分析条件を用いて、オゾン漂白モデル実験において生成する過酸化水素を定量し、その HPLC 法とヨウ素滴定法による差異を検討した。よって、漂白モデル化合物には、その反応機構からフェノール性より多くの過酸化水素を生成可能な非フェノール性モデル化合物のベラトリルアルコールを用いた¹⁵⁾。ベラトリルアルコールをオゾン酸化すると多量の過酸化水素が生成するが、オゾン酸化後に反応液を pH 2 以下の酸性にするとその過酸化水素量の増加が認められる¹⁵⁾。これは、反応直後に残留している有機過酸化物が、その後の酸性条件下で加水分解され、過酸化水素を遊離することによるものと思われる。Table 2 に、オゾン酸化終了直後の過酸化水素を HPLC 法とヨウ素滴定法のそれぞれにより定量した

結果を示したが, 反応開始後 10 分及び 22 分とも, ヨウ素滴定法で過酸化水素として定量された酸化力のうち, HPLC による定量から実際に過酸化水素として溶液中に存在していたのはその約 40% に過ぎないことが明らかとなった。よって, 測定試料中に過酸化水素以外に酸化力を持つ物質が存在する可能性がある場合には, HPLC 法により過酸化水素を分離定量するべきであると考ええる。

4. ま と め

スチレン—ジビニルベンゼン—スチレンスルホン酸ナトリウムの三元共重合体ゲルを充填した糖分析用カラムと白金電極を持った電気化学検出器を用いることにより, HPLC 上で過酸化水素を容易に分離し定量することが可能である。この場合, 過酸化水素とそれを検出する電気化学検出器の特性上, 溶離液に少量の EDTA を添加することと, 分析雰囲気中の pH 変動を抑制することが重要であった。

References

- 1) Miyazawa T., Lertsiri S., Fujimoto K. and Oka M. : J. Chromatogr., 667, 99 (1994)
- 2) The Japan Society for analytical chemistry : Bunseki Kagaku Bin-ran, The second revised edition, Maruzen, 1971, 28
- 3) Takagi S. : Quantitative Analysis, Experiments and calculations II, Volumetric Analysis, A revised edition, Kyoritsu Shuppan Co. Ltd., 1967, 451
- 4) Taube H. and Bray W. C. : J. Am. Chem. Soc. 62 (12) 3357-3373 (1940)
- 5) Rassi Z. E. : JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY LIBRARY Vol. 58, carbohydrate analysis, ELSEVIER, 1995, 157
- 6) Magara K., Tomimura Y. and Hosoya S. : Proceedings of The 42 th Lignin Symposium, Sapporo Japan, 1997, p 113-116
- 7) Takahashi : Anal. Sci. 15, 481 (1999)
- 8) Ohosaka T., Koyama N. and Ohosaka T. : Denki Kagaku Ho-Kiso Sokutei, Khodan-sha Scientific Co., 1989, 94
- 9) Kissinger P. T. and Heineman W. R. : Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, MARCEL DEKKER, 1996, 116
- 10) LC Application News No. 35 Sensitive Analysis of Choline and Acetylcholine by a immobilized enzyme column, YOKOGAWA ANALYTICAL SYSTEMS, 1993. 9 pub. TI 16 C 1 A 1-035
- 11) Kissinger P. T. and Heineman W. R. : Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, MARCEL DEKKER, 1996, 303
- 12) The Electrochemical Society of Japan : New Collection of Techniques in Electrochemistry, The Electrochemical Society of Japan, 1998, 175
- 13) Ohara T. J., Rajagopalan R. and Heller A. : Anal. Chem. 66, 2451-2457 (1994).
- 14) Osborne P. G. and Yamamoto K. : J. Chromatography B 707, 3-8 (1998)
- 15) Magara K., Sugimoto T., Ikeda T., Tanaka R. and Hosoya S. : J. Pulp Paper Sci. 31 (3) 153-157 (2005)

(受理 : '07. 7. 25)

JAPAN TAPPI JOURNAL accepts scientific papers written either in Japanese or in English. We, JAPAN TAPPI, translate them into the other of the two languages (Japanese into English and English into Japanese) and print them in addition to the originals under the permission of the authors. We believe that this service of translation will help our subscribers to find and understand the scientific value of the original paper more clearly, and will contribute to the development of science and technology in the paper industry.

- Regarding figures and tables, refer to the original article in Japanese.
- The copy right of the translated version belongs to JAPAN TAPPI.
- If there is any inconsistency between the two versions, the original is always true.
- JAPAN TAPPI is not responsible to any outcomes based on the translated version.

1. Introduction

It is indispensable to quantitatively measure hydrogen peroxide in pulp and paper science. When hydrogen peroxide is used for bleaching, its concentration is determined by either potassium permanganate titration or iodometric titration²⁾. When an iodometric titration method is used, iodine is released from potassium iodide with hydrogen peroxide in an acidic condition. This reaction proceeds rather

slowly. The acidic condition favorably accelerates the reaction. But, its also accelerates the release of iodine with oxygen in the air³⁾. If the concentration of hydrogen peroxide is high enough like several percents, the effect with oxygen in the air is negligible. If its concentration is small, much care should be taken of. An iodometric titration method measures oxidative capability of the solution. When residual hydrogen peroxide after bleaching is measured by the iodometry, the presence of other oxidative

compounds in the solution will cause error in its value.

Other than titration methods with iodine and potassium permanganate, there is a colorimetric method using titanium tetrachloride²⁾. In this method, the color changes brilliantly to orange. But, oxidative compounds also induce this reaction, and it is not specific to hydrogen peroxide.

In spite of the problems described above, those methods work fine as long as hydrogen peroxide concentration is high and there are no troublesome contaminants. However, in bleaching with oxygen or ozone, where lignin has to be decomposed by finely controlled active oxidative species, hydrogen peroxide is generated in the order of less than several micromoles with the presence of many other contaminants. It is in this case where hydrogen peroxide is not quantitatively determined and the bleaching reaction may be misunderstood.

In this paper, we studied to separate hydrogen peroxide from other reaction compounds by high performance liquid chromatography (HPLC) using columns that were reported to be able to do the separation.

2. Experiment

2.1 Chemicals

Sodium dihydrogen phosphate, sodium sulfate and hydrogen peroxide (32.8%) were a special reagent grade, purchased from Jyunsei Chemical Co., Ltd. The exact concentration of hydrogen peroxide was determined by an iodometric method²⁾. Vanilyl alcohol, purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., was re-crystallized with ethyl acetate. Veratryl alcohol was purchased from Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2 Na) was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Acetonitrile was a grade for HPLC, purchased from Jyunsei Chemical Co., Ltd. Water was distilled by BOX SILL WS-12 (Shibata Scientific Technology Ltd.), was refined with Milli-Q-Lab (Millipore Co., Ltd.), and was used as an eluent for HPLC. Os polymer/peroxidase mixture was purchased from B. A. S.

2.2 Detectors

LC 4 C electro-chemical detector (Bioanalytical Systems) was used to determine hydrogen peroxide quantitatively in an electrochemical system. A detection cell was of a radial flow cell type equipped with a platinum electrode of 6 mm ϕ (B. A. S gasket thickness : 50 μ m). An eluent was fed at the rate of 0.4 ml/min. Voltammetric charge was expressed using a silver/silver chloride electrode as a reference. RI-101 (Shodex) was used for differential refractive index detection. An eluent flow rate was 0.5 ml/min. When the column temperature was 40°C, the cell in the detector was heated to 40°C. When the column temperature was 65°C, the cell temperature was 60°C. HP 1100 diode-al-

ley detector (Hewlett-Packard G 1315 A) was used for ultraviolet spectroscopy. It was located in a constant temperature chamber of 20°C to prevent base line drift. A wave length for detection was 215 nm, and that of the background was 360 nm.

2.3 Analytical columns

Columns, Sugar Pak KS-801 (8.0 mm I.D. $\times$ 30 cm length), KS-801 D (8.0 mm I.D. $\times$ 15 cm) and OHpack SB 802.5-HQ (8.0 mm I.D. $\times$ 30 cm) were purchased from Shodex. A column, SCR-101 N (7.9 mm I.D. $\times$ 30 cm), was purchased from Shimadzu Corporation. A column, Excel-pack CHA-E 11 (7.8 mm I.D. $\times$ 30 cm), was from Yokogawa Analytical Systems. A column, Aminex HPX-87 N (7.8 mm I.D. $\times$ 30 cm), was from Nippon BIO-RAD Laboratories. A column, Develosil RPAQOEUS AR-3 (4.6 mm I.D. $\times$ 15 cm), was from Nomura Chemical Co., Ltd.

2.4 Cyclic Voltammogram (CV)

CVs of hydrogen peroxide, vanilyl alcohol, sodium phosphate buffer solution containing EDTA-2 Na were obtained by ALS 611 A electro-chemical analyzer (A. L. S). A working electrode was a platinum electrode of 1.6 mm ϕ (B. A. S). A counter electrode was a platinum wire of 0.8 mm ϕ (B. A. S 002233). A reference electrode was a silver/silver chloride electrode RE-1 B (B. A. S). Samples were evacuated with argon gas for 30 minutes, kept still for 2 seconds, and then scanned repeatedly for 10 times from 1.0 V to 0.8 V at the scanning rate of 0.2 V/sec.

2.5 Modification of electrode by Os polymer/peroxidase

A glassy carbon electrode of 6 mm ϕ for a radial flow cell (B. A. S) was coated with 1 μ L of Os polymer/peroxidase mixture, and was dried for 24 hours at 5°C. Then, it was over-coated with 1 μ L of glutal aldehyde solution (25%), and was dried for 24 hours at 5°C. It was fixed to the cell as replacement to a working platinum electrode. Hydrogen peroxide was detected at the voltammetric charge of zero volt.

2.6 Model ozone bleaching

Veratryl alcohol (about 0.4 g) was dissolved in to 250 ml of 0.2 M phosphoric acid. The solution was bubbled with oxygen gas, which contained ozone at the concentration of 6%, at the flow rate of 0.5 ml/min at the room temperature in a 500 ml three neck flask. After the reaction, the ozone in the flask was purged by bubbling with nitrogen gas. Hydrogen peroxide generated in the reaction was determined by HPLC and iodometry. Whether ozone was completely purged or not had to be checked. Sodium bromide solution acidified with sulfuric acid, which selectively decomposed ozone, was added to the solution⁴⁾, and it was measured by iodometry again.

3. Result and discussion

3.1 Selecting a suitable separation column

When someone wants to separate a compound by liquid chromatography, characteristics of the compound like affinity to water, molecule size, ion intensity and affinity to specific functional groups are a clue to find a suitable system. As hydrogen peroxide does not have such distinguishable traits, and is very oxidative in nature, the method was not developed yet.

In 1994, Miyazawa et al.¹⁾ succeeded to separate hydrogen peroxide using Sugar Pak KS-801 column. This column was originally developed for separating sugars. It consisted of ter-polymer gel of three components, that were styrene, divinyl benzene and styrene sulfonate, and had sodium ion as counter ion to sulfonate group. Its separating was based on two functions, which were ligand exchange and size exclusion⁵⁾. It is not clear yet why hydrogen peroxide was separated by that column. We assume that the size exclusion was a main separating function by following facts. It was reported that when sodium was a counter ion, the ligand effect exchanging at its site rarely happened⁵⁾. As in Fig. 1-1, hydrogen peroxide came out right after methanol.

In 1997, we quantitatively determined hydrogen peroxide generated in ozone bleaching of lignin model compounds using columns, SCR-101 N and KS-801 D, for the separation⁶⁾. In 1999, Takahashi et al. reported on quantitative determination of hydrogen peroxide using the column by Miyazawa⁷⁾.

These columns have ions other than sodium as a counter. Among them, a column used for detecting sugars and organic acids (Excelpack CHA-E 11), which had H^+ as a counter ion, was confirmed to be able to separate hydrogen peroxide. It is shown in Fig. 1-2, where hydrogen peroxide was eluted out at the void volume of the column with 0.1% phosphoric acid as an eluent at 40°C. As the column makes its separation by ion exchange and size exclusion, the column is supposed to elute strong acids like sulfuric acid and hydrochloric acid first due to their repulsion against its functional sulfonic acid group. However, hydrogen peroxide eluted out almost in the same retention time. As hydrogen peroxide is not a strong acid like sulfuric acid, it is not known yet why it eluted out. It is clear that the column is not suitable for the separation.

As hydrogen peroxide is too hydrophilic, a column of a silica reverse phase type that uses the difference in affinity to water will not work for the separation. Moreover, trace of heavy metals contaminated in silica gel may decompose hydrogen peroxide during the separation, and reduce its sensitivity. The separation by a column, Develosil RPAQOEUS AR-3, is shown in Fig. 1-3. The column

was packed with silica gel modified with C-30 carbon chain, and could make separation with 100% water as an eluent. As hydrogen peroxide eluted out in the void volume, it was not separable.

If separation of hydrogen peroxide is based on the size exclusion, a column for gel filtration chromatography (GFC), will work. A column, OHpack SB 802.5-HQ, was used and the result is in Fig. 1-4. It was able to make separation as KS-801 did. A column SB 802 which was usually used for separating compounds of small molecular weight was also supposed to work. But, tailing at the peak was observed. As the column base was poly-hydroxy methacrylate, its affinity to hydrophilic compounds may cause the tailing. There are some other columns like anion exchanging columns for sugar and amino acid separation and anion chromatography columns. As their eluent is alkaline, hydrogen peroxide may dissociate and then may react with packing materials. So, we did not investigate them.

3.2 Selecting a proper eluent

A type of a detector affects selection of a proper eluent. Miyazawa et al. used water that was a common eluent for sugar separation, as they detected the presence of hydrogen peroxide by chemiluminescence method with luminol¹⁾. In their case, the body of KS-801 column was made of stainless steel so that some hydrogen peroxide might be decomposed. To suppress the decomposition, a small amount of chelating agent was added effectively to it²⁾. Takahashi et al. used water as an eluent, and added sodium sulfate (10 mM) and EDTA-2 Na (10 mM) at the post column⁷⁾. They detected hydrogen peroxide by an electrochemical method, not by the chemiluminescence method. The reason of adding the post column solution was supposed to stabilize hydrogen peroxide with EDTA-2 Na after separates at the column as well as to feed an electrolyte to the detector of the electrochemical type. It is necessary to add an electrolyte to an eluent when a detector of an electrochemical type has a platinum electrode. It also effectively increases the sensitivity of detection to add a small amount of chelating agent to an eluent, when stainless steel is used as a part of the column, injector and pump. Table 1 shows the effect. The HPLC was made of plastic parts except the body of the column. Hydrogen peroxide was detected under the same condition as in Fig. 1-1. The effect of EDTA-2 Na was demonstrated by comparing the ratio of the peak areas with and without EDTA. A detector of an RI type was also used in same condition. As the refractive index of the eluent changes by the presence of EDTA-2 Na, it is probable that the peak area of hydrogen peroxide will also change with a detector of this type. So, the ratio of a peak area of methanol to that of hydrogen peroxide was an indicator, and its change was studied. Generally speaking, the less the surface area of stainless

steel is exposed to an eluent, the less is the decomposition of hydrogen peroxide. Our case is that only the column body was of stainless steel. Even in our case, the ratio of the peak areas (hydrogen peroxide/methanol) increased from 1.18 to 1.22 by adding 0.25 mM of EDTA-2 Na. The addition worked fine. So, we added EDTA-2 Na to the eluent, not to the post column solution as Takahashi et al. did⁷⁾. There is a chance of corrosion of stainless steel by EDTA. There have been no reports on the corrosion at HPLC or the column body.

When a detector of an electrochemical type is used, some electrolytes like sodium sulfate that Takahashi et al. used and which had no buffering effect may disturb the base line, depending on the surface condition of the electrode. In Fig. 2-1, hydrogen peroxide was detected with an eluent that consisted of sodium sulfate (25 mM) and EDTA-2 Na (0.25 mM). A small amount of sulfuric acid was added to a hydrogen peroxide sample to make it acidic (pH 2.5). As the function of this column, all acids were eluted out in the void volume. As the surface of the electrode was washed with the sulfuric acid added, the base line current greatly changed. As a result, there occurred a jump in the base line. No such jump was observed with an eluent that was made of a mixture of the solution (sodium dihydrophosphate (25 mM) + EDTA-2 Na (0.25 mM)) and its buffer solution of pH 7 (See Fig. 2-2). It is necessary to add an electrolyte that has a buffering function to a counter ion for stable separation. As the column (Aminex HPX-87 N, BIO-RAD) has sodium as a ligand and is used in the pH range from 5 to 7, sodium dihydrogen phosphate buffer, whose pH is 7, is suitable.

3.3 Setting of detector

If the concentration of hydrogen peroxide is in the range of several millimoles that is usual in hydrogen peroxide bleaching, a detector of a differential refractive index type can work as in Fig. 1. In this trial, the eluent was a mixture of sodium sulfate (25 mM) and EDTA-2 Na (0.25 mM), and the column was heated at 40°C. As hydrogen peroxide has the maximum absorption peak at 215 nm²⁾, a detector of an ultra violet spectroscopy type will be fine if disturbing compounds are not present. If its concentration is less than a micromole, a detector of an electrochemical type is a must. In most cases, platinum electrode is used. It detects the current generated when hydrogen peroxide is decomposed at the voltammetric charge between 0.4 V and 0.5 V. Fig. 3 (upper) is a cyclic voltammogram (CV) of hydrogen peroxide in a buffer solution (pH 7) of sodium phosphate (25 mM) containing EDTA-2 Na (0.25 mM) in it. As hydrogen peroxide is oxidized to water and oxygen, CV specific to a reversible oxidation-reduction reaction will not appear⁸⁾. As the current level in the reduction side was larger than that in the oxidation side, detecting in the

reduction side would give better sensitivity. It was reported, however, that dissolved oxygen in an eluent and in a sample solution injected was reduced on the electrode surface, increased the back ground current, and made the detection difficult.⁹⁾ Fig. 3 (lower) is a CV of sodium phosphate buffer containing EDTA-2 Na. There was a peak around 0 V. The range from 0.2 V to 0.8 V was an electrochemical window, and there was no peak specific to oxidation/reduction. So, referring to the data by electrochemical detection¹⁰⁾, we set the voltammetric charge to 0.45 V.

3.4 Problems in quantitative determination

An electrochemical detector is a destructive type in which electrolysis occurs between the electrodes. As electrolysis goes on, the electrode surface undergoes some change in quality. A following case is well known¹¹⁾. When phenolic compounds were detected with a glassy carbon electrode, decomposed compounds from the sample deposited on the electrode surface. The deposit gradually reduced the sensitivity of detection. With a platinum electrode, one of rare metals, the loss of the sensitivity is supposed to be negligible. But, it may be probable that the back ground current becomes less, and the base line starts drifting due to some quality change in the electrode surface. This will increase the area of a detected peak. Fig. 4-1 shows how the area of the peak was dependent on eluting time. The analytical condition was one shown before where hydrogen peroxide was eluted out with a buffer solution of sodium phosphate containing EDTA-2 Na. The area was a function of the eluting time. It suggested that it was caused by the drift of the base line, not by the change of the surface condition of the electrode by the electrolysis. Fig. 4-2 is for the drift with sodium sulfate (25 mM) as an eluent, which was also shown before. In this figure, the drift went toward reducing the sensitivity, and there was a base line jump after 80 minutes. The base line jump was supposed to be due to the sample injection. The drift is affected by factors relating to an eluent, such as its type, concentration and feeding rate, and the voltammetric charge. So, it is necessary to inject a standard sample whose concentration is known from time to time to check the drift. Detectors except an electrochemical type use calibration curves for the measurement. With an electrochemical detector, error caused by the drift makes the use of a calibration curve unreliable so that the sensitivity change due to the drift should be corrected by repeatedly measuring the standard sample during the determination.

A factor affecting the accuracy of the determination, other than the sensitivity change by the drift, is the piling of peaks of contaminants. Compounds having phenolic hydroxyl group such as guaiacol, vanillyl alcohol, and trimethoxyphenol are strongly retained on the packing materials, that is of styrene-divinyl benzene ter-polymer,

and can not be eluted out in one simple elution. Then, they come out in one of successive elutions. As their elution times are unpredictable, it is difficult to escape the piling even by controlling sample injection intervals. One example in Fig. 5-1 shows a case for vanillyl alcohol. The peak of hydrogen peroxide was on the slender peak of vanillyl alcohol. But, to calculate the exact area of the hydrogen peroxide peak is impossible by the following two reasons. One is that the base line was not linear. The other is that the base current itself was changed by the peak of vanillyl alcohol, though the peak of hydrogen peroxide looked like simply piling on. In this case, there is one probable way of increasing the sensitivity by selecting a proper voltammetric charge, taking a look at their CV s. Fig. 6 is the CV of vanillyl alcohol at pH 7. The oxidation-reduction current of vanillyl alcohol was $0.7 \times 10^5 \text{ A}$ at the voltammetric charge of 0.45 V. It became $0.2 \times 10^5 \text{ A}$ at the reduced voltammetric charge of 0.3 V. The result is in Fig. 5-2. The sensitivity of hydrogen peroxide, as well as that of vanillyl alcohol, was reduced by decreasing the voltammetric charge, as its oxidation-reduction current became less. However, the reduction of the sensitivity of hydrogen peroxide was less than that of vanillyl alcohol. So, the selectivity of detecting hydrogen peroxide increased.

To shorten retention time of a compound like vanillyl alcohol, adding an organic solvent like acetonitril is effective. KS-801 column affords up to 20% addition. So, 20% of acetonitril was added to an eluent and its effect was studied. As in Fig. 5-3, the addition of acetonitril accelerated vanillyl alcohol elution. As acetonitril was not an electrolyte, the sensitivity of detection for hydrogen peroxide became less than that without the addition. In a case where a silver/silver chloride electrode, which was filled with sodium chloride or potassium chloride, was used, one should take care of a chance that the voltage of the reference electrode becomes unstable due to contamination of an organic solvent in to the solution within the electrode.

The other way of improving the detection sensitivity is to modify an electrode with enzymes. Heller et al. fixed peroxidase on a glassy carbon electrode by using a complex of poly (1-vinylimidazol) osmium 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl chloride, and detected hydrogen peroxide at the voltammetric charge of 0.3 V¹³⁾. We used a film electrode (a working electrode 3 mm ϕ) on which carbon was printed, and fixed peroxidase on it with that complex. The result is in Fig. 7. Though the peak was negative, the disturbance caused by the elution of vanillyl alcohol was not observed. The peak area was about a half of that measured with a platinum electrode of 6 mm ϕ (0.45 V). Taking in to account that the working area of the electrode was one fourth, the sensitivity was rather increased. Therefore, the modification of an electrode with Os poly-

mer/peroxidase mixture is an effective way of increasing the selectivity and sensitivity of detection of hydrogen peroxide, though samples of strong acidity or alkalinity can not be directly injected because of the enzymatic modification. As in the report by Heller et al.¹³⁾, there is a chance of using it as a sensor for hydrogen peroxide in flow injection. So, we removed the column, kept the flow (0.15 ml/min.), and tried to detect hydrogen peroxide. The result was shown in Fig. 8. One was with sodium phosphate buffer solution (25 mM, pH 7) as an eluent. The other was with the same buffer solution with EDTA (0.25 mM) added. Though the former had high sensitivity at the start, the gain decreased as time went¹⁴⁾. This loss of the sensitivity did not occur by adding EDTA (0.25 mM) to the buffer solution. The method can be used for qualitative determination. As a flow injection method can finish the measurement in several minutes per sample, it will be an effective way of monitoring hydrogen peroxide concentration in real time.

3.5 Quantitative determination of hydrogen peroxide in model ozone bleaching

Using the analytical condition for HPLC-ECD developed in this paper, hydrogen peroxide concentration was monitored in a model experiment for ozone bleaching. The result was compared with that by an iodometric method. A model compound was veratryl alcohol which was non-phenolic, and would generate more hydrogen peroxide than phenolic compounds as expected from its reaction mechanism¹⁵⁾. When veratryl alcohol was oxidized by ozone, a large amount of hydrogen peroxide was produced. Being acidified to pH 2 after the reaction, the amount of hydrogen peroxide increased further¹⁵⁾. It is supposed that residual peroxide compounds were hydrolyzed by reducing the pH, and new hydrogen peroxide was released. The hydrogen peroxide concentration right after the ozone oxidation was measured by HPLC and iodometric titration. They are in Table 2. The measurement was done at 10 minutes after the start of the reaction, and 22 minutes after the start. Out of the oxidizing power which was determined as hydrogen peroxide by iodometry, only 40% was equivalent to the amount of hydrogen peroxide determined by HPLC. If there is a chance that some compounds which have oxidizing power exist in the reaction, hydrogen peroxide should be determined by HPLC.

4. Conclusion

Hydrogen peroxide was quantitatively determined by HPLC, using a column for sugar analysis that was filled with gel ter-polymer of three components, styrene-divinyl benzene-styrene sodium sulfonate, and an electrochemical detector that had a platinum electrode. It was important to add a small amount of EDTA which was specifi-

cally needed in stabilizing hydrogen peroxide. Suppressing pH change during the measurement was also important to maintain the electrochemical detector.

References

- 1) Miyazawa T., Lertsiri S., Fujimoto K. and Oka M. : J. Chromatogr., 667, 99 (1994)
- 2) The Japan Society for analytical chemistry : Bunseki Kagaku Bin-ran, The second revised edition, Maruzen, 1971, 28
- 3) Takagi S. : Quantitative Analysis, Experiments and calculations II, Volumetric Analysis, A revised edition, Kyoritsu Shuppan Co. Ltd., 1967, 451
- 4) Taube H. and Bray W. C. : J. Am. Chem. Soc. 62 (12) 3357-3373 (1940)
- 5) Rassi Z. E. : JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY LIBRARY Vol. 58, carbohydrate analysis, ELSEVIER, 1995, 157
- 6) Magara K., Tomimura Y. and Hosoya S. : Proceedings of The 42 th LigninSymposium, Sapporo Japan, 1997, p 113-116
- 7) Takahashi : Anal. Sci. 15, 481 (1999)
- 8) Ohosaka T., Koyama N. and Ohosaka T. : Denki Kagaku Ho-Kiso Sokutei, Khodan-sha Scientific Co., 1989, 94
- 9) Kissinger P. T. and Heineman W. R. : Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, MARCEL DEKKER, 1996, 116
- 10) LC Application News No. 35 Sensitive Analysis of Choline and Acetylcholine by a immobilized enzyme column, YOKOGAWA ANALYTICAL SYSTEMS, 1993. 9 pub. TI 16 C 1 A 1-035
- 11) Kissinger P. T. and Heineman W. R. : Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, MARCEL DEKKER, 1996, 303
- 12) The Electrochemical Society of Japan : New Collection of Techniques in Electrochemistry, The Electrochemical Society of Japan, 1998, 175
- 13) Ohara T. J., Rajagopalan R. and Heller A. : Anal. Chem. 66, 2451-2457 (1994)
- 14) Osborne P. G. and Yamamoto K. : J. Chromatography B 707, 3-8 (1998)
- 15) Magara K., Sugimoto T., Ikeda T., Tanaka R., Hosoya S. : J. Pulp Paper Sci. 31 (3) 153-157 (2005)