

GC-MS を用いた水溶液中有機酸等の クロロギ酸エステル誘導体化による定性・定量分析（第 1 報）

坂東 健太郎*, 松岡 夏実*, 磯場 厚子*

Qualitative and quantitative analysis of organic acid by GC-MS with Chloroformate Derivatization (first report)

BANDO Kentaro*, MATSUOKA Natsumi* and ISOBA Atsuko*

*Hakodate Customs Laboratory, Bibi, Chitose, Hokkaido, 066-0012 Japan

Derivatization of organic acids by chloroformate was performed, then a qualitative and quantitative analysis was carried out using gas-chromatography-mass spectrometry. Since this reaction occurs directly in water, overall processing time for the samples can be significantly reduced. This research suggests that organic acids can be qualitatively analyzed in short time by derivatization in water at room temperature. Regarding quantitative analysis, linearity and relative standard deviation of the calibration curve were inconclusive. Further consideration of reaction and extraction conditions are needed in order to improve accuracy of quantitative analysis.

1. 緒 言

関税率表において、有機酸の添加の有無や含有量により関税分類が異なるものは複数ある。例えば同表第 07.11 項の一時的な保存に適する処理をした野菜（そのままの状態では食用に適しないものに限る。）について、亜硫酸ガス又は塩水、亜硫酸水その他の保存用の溶液により保存に適する処理をしたものは認められているが、酢酸等の有機酸などを加えると調味とみなされ、同表第 20 類の野菜の調製品に分類されることがある。有機酸は野菜の調製品以外の食品にも広く使用されている添加物であり、有機酸の定性・定量分析は関税分類において重要となる。

従来、有機酸の定性には、薄層クロマトグラフ法（以下、TLC 法と略記する）やガスクロマトグラフ法（以下、GC 法と略記する）、定量には中和滴定法や GC 法が用いられてきた¹⁾。しかし、TLC 法は有機酸の判別が困難な場合があること、GC 法は前処理や誘導体化に時間を要することやパックドカラムを使用する必要があること、中和滴定法は有機酸の組成が分からないこと等、それぞれの分析法において改善点が存在する。また、複数の有機酸を一斉に定性・定量分析可能な分析法として、ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフ法（以下、HPLC 法と略記する）もあるが²⁾、複雑なポストカラム法用の装置を組まなければならないという難点がある。そのため、浅野らによりポストカラム法を用いない HPLC 法について研究報告がなされている³⁾。一方で、ガスクロマトグラフ質量分析法（以下、GC/MS と略記する）を用

いた有機酸の定性・定量分析については、有機酸を含む短鎖脂肪酸を対象としたメタボローム解析に関する報告が複数ある³⁾⁵⁾が、食品を対象とした研究報告はほとんどない。

有機酸のような不揮発性物質を GC/MS で分析する場合、誘導体化が必要になるデメリットはあるが、目的物と夾雑成分のピークが重なる場合、選択イオン検出モード（以下、SIM モードと略記する）で測定することでその影響を排除できる場合があること、溶離液が不要であること等が HPLC 法と比較した場合の利点として挙げられる。

本研究では、誘導体化の工程を簡便かつ短時間で行うため、水中・常温でカルボキシ基を誘導体化可能なクロロギ酸エステルを誘導体化試薬として用いて、有機酸の誘導体化を行い、GC/MS による有機酸の定性分析及び定量分析を検討したので、その結果を報告する。

2. 実 験

2.1 試薬

2.1.1 有機酸標準試薬

酢酸、くえん酸 1 水和物、L(+)-酒石酸（以上、和光純薬工業）、乳酸ナトリウム、こはく酸、L(-)-りんご酸（以上、関東化学）

2.1.2 内標準物質

3-メチル吉草酸（東京化成工業）、安息香酸ナトリウム（半井化学薬品）

* 函館税関業務部分析室 〒066-0012 北海道千歳市美々

2.1.3 誘導体化試薬

クロロギ酸エチル, クロロギ酸プロピル, クロロギ酸イソブチル (以上, 関東化学)

2.1.4 アルコール

エタノール, 1-プロパノール (以上, 関東化学), 2-メチル-1-プロパノール (東京化成工業)

2.1.5 その他試薬

ピリジン, ヘキサン (以上, 関東化学), 水酸化ナトリウム, クロロホルム, ジエチルエーテル (以上, 和光純薬工業)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 ガスクロマトグラフ質量分析計

Furuhashi らの研究報告³⁾を参考に測定条件を設定した。

装置	: 8890A/5577B (Agilent technology)
カラム	: DB-5MS 30 m×0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 µm (Agilent technology)
イオン化法	: EI
注入口温度	: 260 °C
スプリット比	: 30:1
カラム昇温条件	: 40 °C (5 min) - (10 °C/min) -320 °C (10 min)
流速	: 1.0 mL/min
注入量	: 1 µL
検出モード	: SCAN または SIM

2.2.2 選択イオン検出モード (SIM モード) パラメータ

クロロギ酸プロピル

3.2-5.0 min	m/z 61, 87	(酢酸)
11.5-12.5 min	m/z 71, 117	(3-メチル吉草酸)
16.3-16.8 min	m/z 159, 177	(乳酸)
16.8-18.0 min	m/z 143, 161	(こはく酸)
22.0-23.5 min	m/z 161, 203	(りんご酸)
26.0-26.8 min	m/z 191, 305	(酒石酸)
28.5-29.5 min	m/z 167, 279	(くえん酸)

クロロギ酸イソブチル

5.0-5.7 min	m/z 56, 86	(酢酸)
13.0-13.4 min	m/z 99, 117	(3-メチル吉草酸)
17.9-18.3 min	m/z 117, 135	(乳酸)
18.3-18.5 min	m/z 101, 119	(こはく酸)
23.8-24.3 min	m/z 161, 217	(りんご酸)
24.3-24.6 min	m/z 157, 213	(くえん酸)
27.4-27.8 min	m/z 196, 251	(酒石酸)

2.3 試薬調製及び誘導体化

2.3.1 試薬の調製

2.3.1(1) 有機酸標準液

酢酸, 乳酸ナトリウム, こはく酸, L(-)-リンゴ酸, くえん酸, L(+)-酒石酸の標準試薬を各 50 mg を別々の 50 mL メスフラスコに精秤し, 蒸留水を用いて 50 mL に定容した。

2.3.1(2) 有機酸混合液

酢酸, 乳酸ナトリウム, こはく酸, L(-)-リンゴ酸, くえん酸, L(+)-酒石酸の標準試薬を各 100 mg ずつ, 同一の 100 mL 容メスフラスコに精秤し, 蒸留水を用いて 100 mL に定容した。

2.3.1(3) 10%2-メチル-1-プロパノール水溶液

2-メチル-1-プロパノール 10 mL を 100 mL 容メスフラスコに移し入れ, 蒸留水を用いて 100 mL に定容した。

2.3.1(4) 内標準物質添加アルコール溶液

3-メチル吉草酸, 安息香酸ナトリウムを各 10 mg ずつ, それぞれ 100 mL 容メスフラスコに精秤し, エタノール, 1-プロパノール, 10%2-メチル-1-プロパノール水溶液を用いて 100 mL に定容した。

2.3.2 誘導体化

2.3.2(1) 誘導体化操作手順

山口らの研究報告⁶⁾を参考に, 誘導体化を実施した。

分析試料 2 mL をホールピペットにて, 9 mL 容スクリーバイアルに計り取った後, アルコール溶液 1 mL をホールピペットにて加え, 攪拌した。その後, ピリジン 250 µL を加えたのち, 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて, pH8-10 程度に調整した。その後, クロロギ酸エステルを加え, 30 秒間攪拌し, 発生するガスを抜いた後, 5 分間常温で静置した。なお, 今回使用したクロロギ酸エステルの種類とその添加量及びそれに対応するアルコールを Table 1 に示す。

Table 1 Derivatization reagents and alcohols in each derivatization operation.

Derivatization reagent	Addition amount(µL)	Alcohol
ethylchloroformate	100	Ethanol
propylchloroformate	300	n-Propanol
isobutylchloroformate	500	2-Methyl-1-propanol 10%aq

2.3.2(2) 抽出操作手順

2.3.2(1)にて誘導体化した溶液に対し, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 2 mL を加え, 攪拌した。その後, ヘキサン 1 mL を加え, 100 回程度上下に激しく振った後, 上層をバイアルに移し, 硫酸ナトリウムにて脱水したものをガスクロマトグラフ質量分析計 (以下, GC-MS と略記する) の測定試料とした。

2.4 実験

2.4.1 各有機酸溶液の誘導体化物解析

2.3.1 (1) で調製した有機酸標準液を, 2.3.2 (1) の手順で誘導体化し, GC-MS を用いて, 2.2.1 の条件で検出モードは SCAN に設定し, 測定を実施した。

2.4.2 内標準物質の検討及び各有機酸誘導体の分離

2.3.1 (2) で調製した有機酸混合液の 5 mL を 50 mL 容メスフラスコに採取し, 蒸留水を用いて 50 mL に定容した。

上記で調製した溶液を 2.3.2 (1) の手順で誘導体化を行った。その際に使用するアルコール溶液は, 2.3.1 (4) で調製した内標準添加アルコール溶液を使用した。

2.4.3 抽出条件の検討

2.4.2 で調製した 0.1 mg/mL 有機酸混合溶液を分析試料とし、2.3.2 (1) の手順で誘導体化を行い、2.3.2 (2) 抽出操作の条件を Table 2 のとおり変更して、再現性を検討した。その際に使用するアルコール溶液は、2.3.1 (4) で調製した 3-メチル吉草酸を添加した 10 %2-メチル-1-プロパノール水溶液を使用した。なお、誘導体化試薬は、本実験で使用した誘導体化試薬の中で、生成される誘導体化物の疎水性が最も高く、有機溶媒での抽出効率が良いと予想される、クロロギ酸イソブチルを用いた。

Table 2 Combination of solvents and additives in the extraction operation.

Extract Operation	Solvent	Addition agent
EO 1	Hexan	NaHCO ₃ aq 2mL(Saturated)
EO 2	Chloroform	NaHCO ₃ aq 2mL(Saturated)
EO 3	Diethylether	NaHCO ₃ aq 2mL(Saturated)
EO 4	Hexan	NaCl 1g
EO 5	Hexan	NaCl 1g+NaHCO ₃ aq 2mL(Saturated)

2.4.4 検量線作成用標準溶液の調整

2.3.2 (2) で調製した有機酸混合液の 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL を各 50 mL 容メスフラスコに採取し、蒸留水を用いて 50 mL に定容した。

上記で調製した溶液について、クロロギ酸イソブチルを誘導体化試薬に用いて、2.4.3 と同様の手順で誘導体化を行った。

2.4.5 誘導体化における反応時間の検討

2.4.2 で調製した有機酸混合溶液 0.1 mg/mL を分析試料とし、クロロギ酸イソブチルを誘導体化試薬に用いて、2.4.3 と同様の手順で誘導体化を行い、その常温で静置する時間を 5 分, 30 分, 1 時間, 3 時間及び 5 時間に変更し比較を行った。

2.4.6 試薬添加量の検討

2.4.2 で調製した 0.1 mg/mL 有機酸混合溶液を分析試料とし、クロロギ酸イソブチルを誘導体化試薬に用いて 2.4.3 と同様の手順で誘導体化を行い、クロロギ酸イソブチルの量を 100 μ L から 700 μ L まで、100 μ L ずつ増やして比較した。

3. 結果及び考察

3.1 各有機酸溶液の誘導体化物解析結果

誘導体化操作後の各有機酸溶液について、GC-MS による測定によって得られたマススペクトル及びそれらから推定される構造式を Fig.1-1 から Fig.3-6 に示す。

全ての有機酸誘導体において、カルボキシル基の水素原子がエチル基、プロピル基又はイソブチル基により置換されている。また、分子内に水酸基をもつ乳酸、酒石酸、りんご酸及びくえん酸については、水酸基の水素原子が添加した誘導体化試薬に対応するアルコキシカルボニル基で置換されていた。加えて、りんご酸とくえん酸については、 β 位の水酸基が脱離し、二重結合が形成されている誘導体も確認された。

各有機酸誘導体の基本的なマススペクトルは、McLafferty 転位による開裂、エチルエステル基の脱離、エトキシカルボニル基の

脱離が様々な組み合わせで生じたフラグメントイオンで構成されていると推定される。

各有機酸誘導体について、分子イオンピークが確認できない場合もあるため、実試料に含有する有機酸の同定時には標準有機酸を用いた保持時間の比較も必要になると考えられる。

3.2 内標準物質の検討結果及び各有機酸誘導体の分離

内標準物質添加アルコール溶液を用いて誘導体化した有機酸混合溶液を測定した結果、3-メチル吉草酸及び安息香酸ナトリウムの両者とも誘導体が確認され、どちらも他の有機酸誘導体のピークと重ならなかった。3-メチル吉草酸誘導体及び安息香酸誘導体の質量スペクトルは Fig.4-1 から Fig.5-2 に示す。

クロロギ酸イソブチルを使用した場合、3-メチル吉草酸については、13.2 min に誘導体が確認できた。安息香酸ナトリウムについては、16.5 min に誘導体を確認したが、23.5 min において無水安息香酸のピークも確認された。

無水安息香酸がどの時点で生成しているか不明であるが、反応系や安息香酸誘導体の生成量に影響を及ぼす可能性があり、内標準物質に適さないと考えられることから、以降は3-メチル吉草酸を内標準物質として使用することとした。

3-メチル吉草酸を内標準物質に使用し、誘導体化した有機酸混合溶液のトータルイオンクロマトグラムを Fig.6-1, 6-2 に示す。

Fig.6-1 のトータルイオンクロマトグラムは、クロロギ酸プロピルを用いて誘導体化した有機酸混合液を測定したものであり、①のピークでは Fig.2-1 酢酸誘導体 (3.6 min)、③の2本のピークは Fig.2-2 乳酸誘導体 (16.7 min) 及び Fig.2-3 こはく酸誘導体 (17.0 min)、④のピークは Fig.2-4 りんご酸誘導体 (22.4 min)、⑤のピークは Fig.2-5 酒石酸誘導体 (26.3 min)、⑥のピークは Fig.2-7 くえん酸誘導体 (28.9 min) と推定されるマススペクトルをそれぞれ確認できる。

Fig.6-2 のトータルイオンクロマトグラムは、クロロギ酸イソブチルを用いて誘導体化した有機酸混合液を測定したものであり、①のピークでは Fig.3-1 酢酸誘導体 (5.3 min)、③の2本のピークは Fig.3-2 乳酸誘導体 (18.0 min) 及び Fig.3-3 こはく酸誘導体 (18.4 min)、④のピークは Fig.3-4 りんご酸誘導体 (23.9 min)、⑤のピークは Fig.3-6 くえん酸誘導体 (24.5 min)、⑥のピークは Fig.3-5 酒石酸誘導体 (27.6 min) と推定されるマススペクトルをそれぞれ確認できる。

3.3 抽出条件の検討結果

2.3.2(2)抽出操作の抽出溶媒であるヘキサンを、クロロホルム及びジエチルエーテルに変更し抽出を試したが、いずれの溶媒も内標準物質に対する各有機酸の面積比にほとんど差が認められなかった。クロロホルムは下層となるため回収しにくい難点があり、ジエチルエーテルは特殊引火物であるため、ヘキサンを抽出溶媒として使用することとした。

また、塩析条件を検討するため、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えず塩化ナトリウム 1 g のみ加えた場合(EO 4)及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 2 mL と塩化ナトリウム 1g を両方加え

た場合(EO 5)の、内標準物質に対する各有機酸の面積比の相対標準偏差を Table 3 に示す。

EO5 において、繰り返しの再現性が最も良好となることが認められたため、2.4.4 以降の実験については飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 2 mL と塩化ナトリウム 1 g を両方加えて抽出操作を実施した。

Table 3 Reproducibility of each extraction condition.

Organic acid	RSD of Peak Area Ratio (n=3)		
	EO 1	EO 4	EO 5
Acetic acid	19.1%	19.7%	2.1%
Lactic acid	10.0%	14.3%	2.5%
Succinic acid	25.7%	27.0%	14.2%
Malic acid	30.7%	50.8%	2.5%
Citric acid	15.2%	23.0%	16.3%
Tartaric acid	2.8%	49.0%	4.7%

3.4 検量線

2.4.4 で調製した検量線作成用標準溶液を、2.2.1 の条件（検出モードは SIM モード）で測定し、検量線を作成した。酢酸、乳酸、こはく酸、りんご酸、くえん酸及び酒石酸のクロロギ酸イソブチル誘導体化物の検量線を Fig.7 に示す。

酢酸、乳酸、こはく酸及びりんご酸の誘導体の検量線については、原点付近を通過し、決定係数は 0.99 以上であり、一定程度の直線性を示した。くえん酸及び酒石酸の誘導体の検量線については、決定係数は 0.99 以下であった。

また、各濃度の検量線作成用標準溶液の再現性について検討を実施したところ、結果は Table 4 のとおりとなった。こはく酸、くえん酸及び酒石酸について、低濃度から高濃度まで全体的に面積比のばらつきがみられた。これらについては検出感度が低くピーク面積が小さいため、誘導体化時間の僅かな長短や抽出操作の誤差等の影響が出やすく、ばらつきが大きくなったものと考えられる。

3.5 誘導体化における反応時間の検討結果

誘導体化において、常温で静置する時間を変更した場合の検討結果を Fig.8 に示す。酢酸、乳酸及びりんご酸については反応時間を延長することによる、内標準物質に対する面積比の明確な変化は認められなかった。くえん酸及び酒石酸については、反応時間 1 時間まで誘導体化物の増加が認められ、1 時間経過後はほぼ横ばいとなった。こはく酸については 5 時間まで一貫して内標準物質に対する面積比の増加が認められた。

3.6 試薬添加量の検討結果

2.4.2 で調製した 0.1 mg/mL 有機酸混合溶液を分析試料とし、誘導体化試薬であるクロロギ酸イソブチルの添加量を変更し、内標準物質に対する面積比を比較し、誘導体化試薬の添加量について検討を行った結果を Fig.9 に示す。添加量を 100 μ L から 600 μ L まで 100 μ L ずつ増やすごとに各誘導体のピーク面積比の増加が確認できたが、700 μ L まで増加させるとそれまで確認できなかった誘導体化試薬のピークとその他複数のピークが確認され、さらに各有機酸誘導体のピーク面積も下降したため、本研究のスケールでは 600 μ L 程度までの誘導体化試薬が適切と確認できた。

4. 要 約

本研究では、有機酸の定性・定量分析を GC-MS で行う方法を開発すべく、クロロギ酸エステルによる誘導体化を用いて検討を行った。

誘導体化後のマススペクトルの解析により、各有機酸の誘導体と推定されるピークが確認された。本法により、標準有機酸と実試料に含有される有機酸を誘導体化し、マススペクトル及び保持時間を比較することで、有機酸の定性分析を簡便な前処理かつ短時間で実施可能となることが期待できる。

定量分析については、今回クロロギ酸イソブチルによる誘導体化において検討を行ったが、検量線の精度・再現性共に不十分であるため、引き続き反応条件・抽出条件等について検討することで、精度向上を目指していく。

Table 4 Reproducibility of each concentration solution.

Organic acid	RSD of Peak Area Ratio (n=3)					
	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml
Acetic acid	2.43%	3.59%	1.24%	4.66%	3.23%	3.09%
Lactic acid	13.73%	2.41%	3.60%	1.43%	4.36%	1.78%
Succinic acid	5.10%	7.47%	9.24%	6.60%	6.05%	3.07%
Malic acid	1.12%	6.00%	8.34%	2.49%	2.68%	1.16%
Citric acid	9.20%	7.94%	6.98%	7.49%	10.00%	10.65%
Tartaric acid	25.36%	3.14%	2.52%	6.61%	9.05%	10.12%

文 献

- 菅原龍幸, 前川昭男: 新 食品分析ハンドブック, P.240 (2000) (建帛社)
- 浅野紗也佳, 加藤 真実, 立川 敦生, 竹内 孝幸, 松本 啓嗣: 関税中央分析所報, **61**, 73 (2021)
- Takeshi Furuhashi, Genki Ishihara アジレント・テクノロジー株式会社: 「自動サンプル前処理を用いた GC/MS による哺乳類糞便中の短鎖脂肪酸の分析」(2018), <https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5991-9103JAJP.pdf>, (2022 年 10 月 14 日閲覧)
- Y.Qiu, M.Su, Y.Liu, M.Chen, J. Gu, J.Zhang, W.Jia: *Analytica Chimica Acta*, **583**, 277 (2007)
- X.Zheng, Y.Qiu, W.Zhong, S.Baxter, M.Su, Q.Li, G.Xie, B.M.Ore, S.Qiao, M.D.Spencer, S.H.Zeisel, Z.Zhou, A.Zhao, W.Jia: *Metabolomics*. 2013 Aug 1;**9**(4):818 (2013)
- 山口保彦, 力石嘉人, 横山祐典, 大河内直彦: *Res. Org. Geochem.* **25**, 71 (2009)

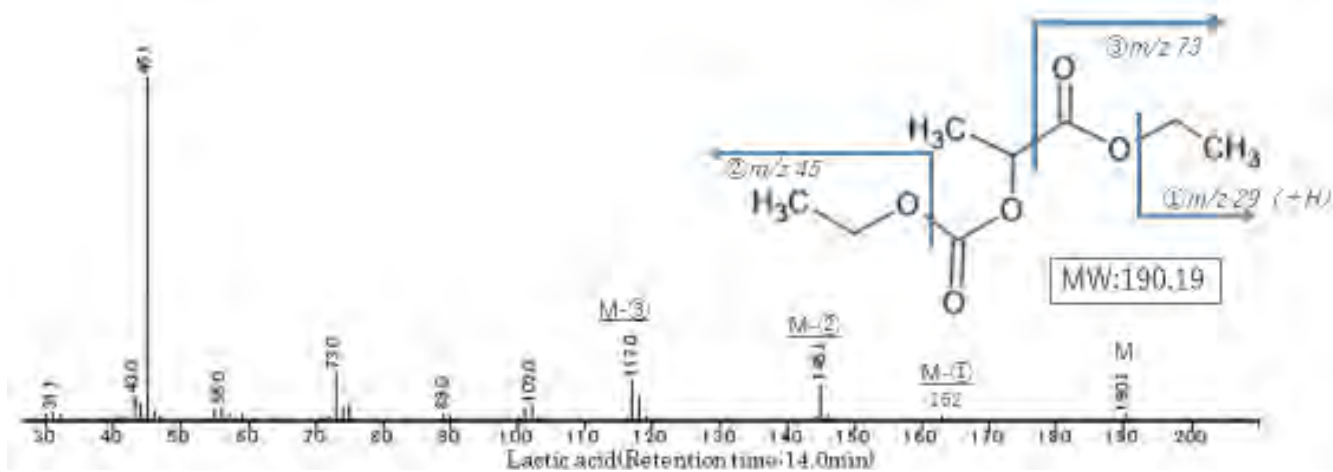


Fig.1-1 Mass spectrum of lactic acid as an ethyl ester and ethoxy carbonyl derivative

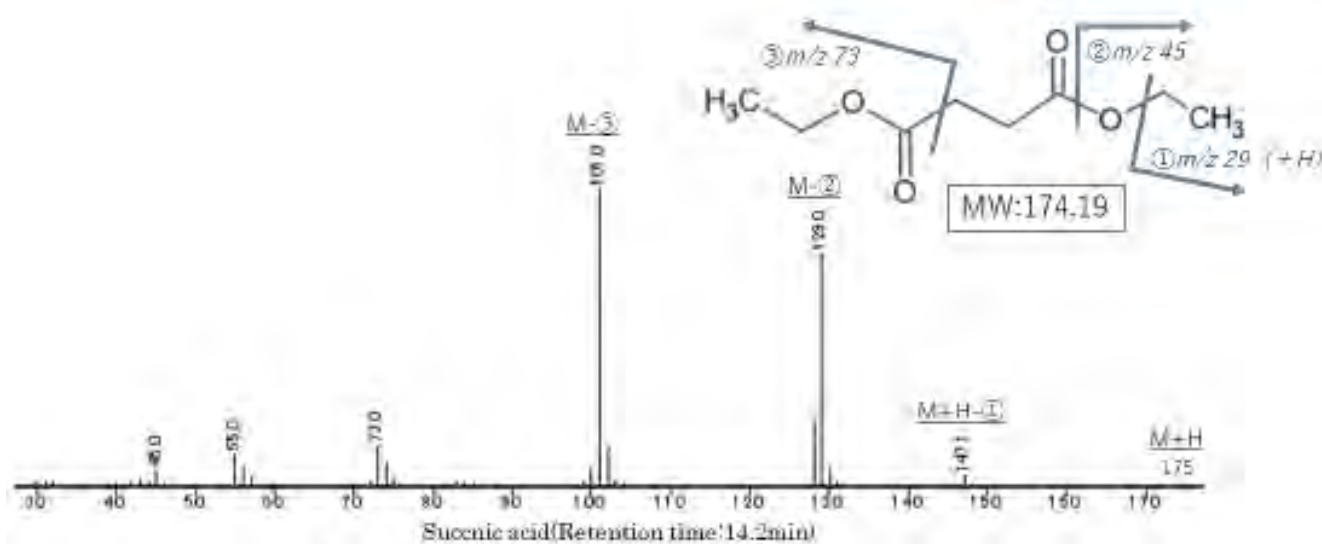


Fig.1-2 Mass spectrum of succinic acid as an ethyl ester derivative

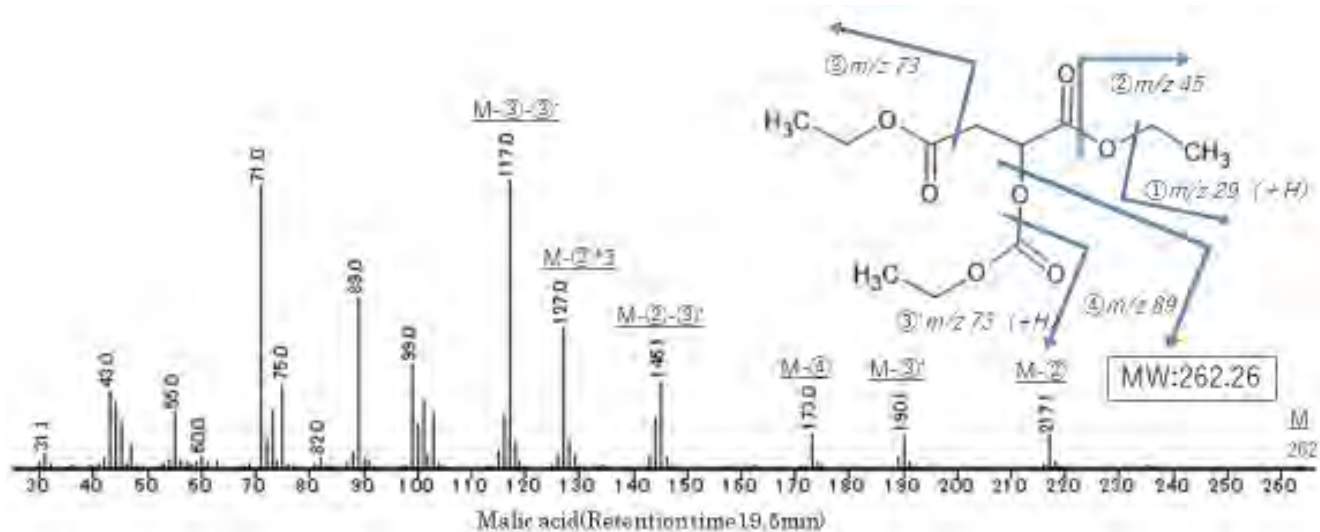


Fig.1-3 Mass spectrum of malic acid as an ethyl ester and ethoxy carbonyl derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

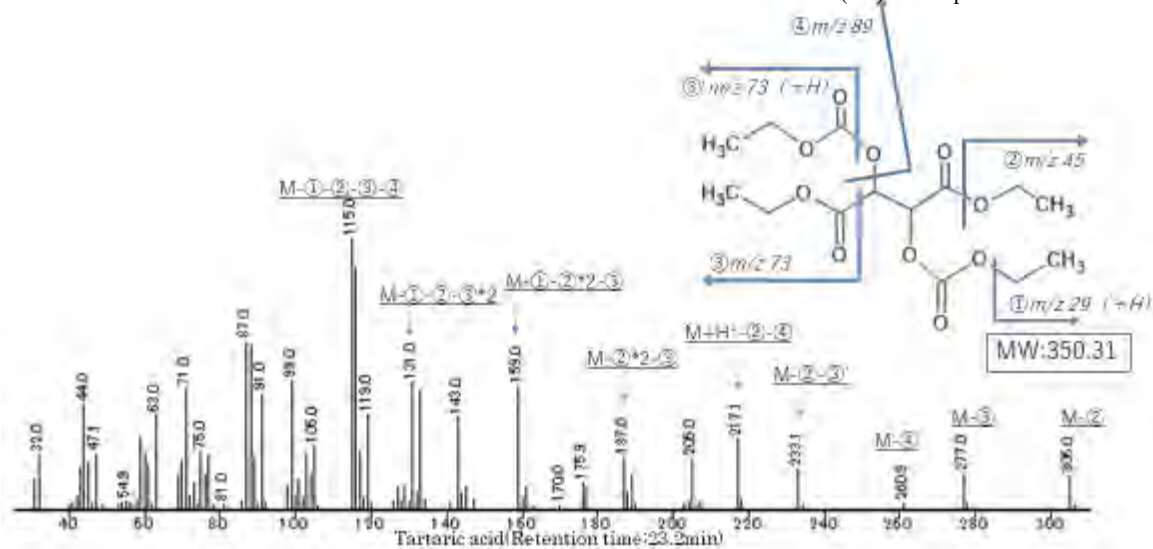


Fig.1-4 Mass spectrum of tartaric acid as an ethyl ester and ethoxy carbonyl derivative

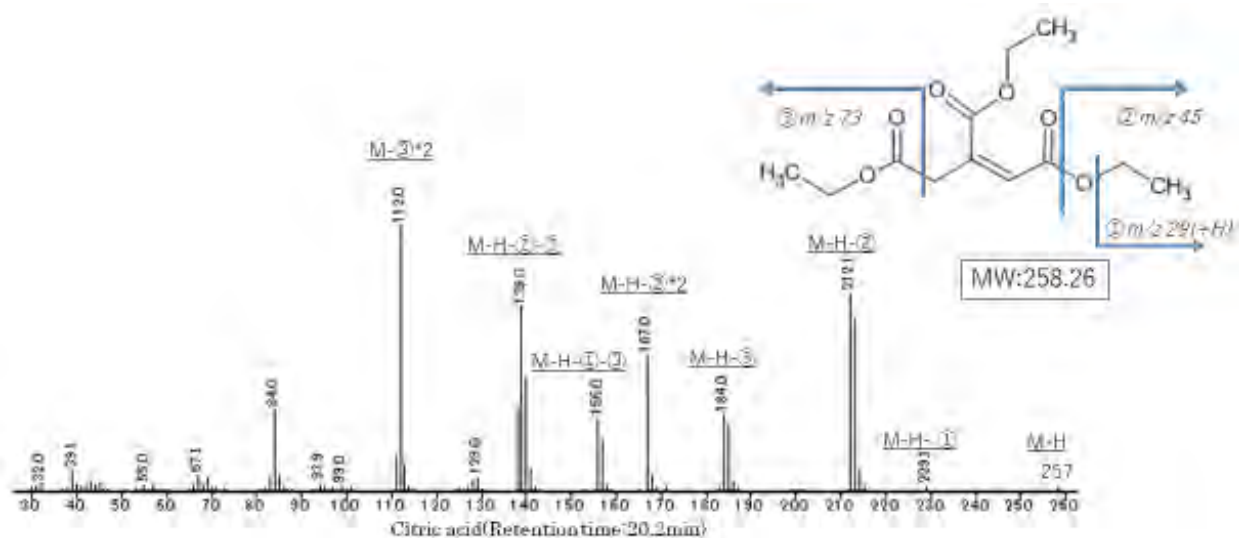


Fig.1-5 Mass spectrum of citric acid as an ethyl ester and ethoxy carbonyl derivative

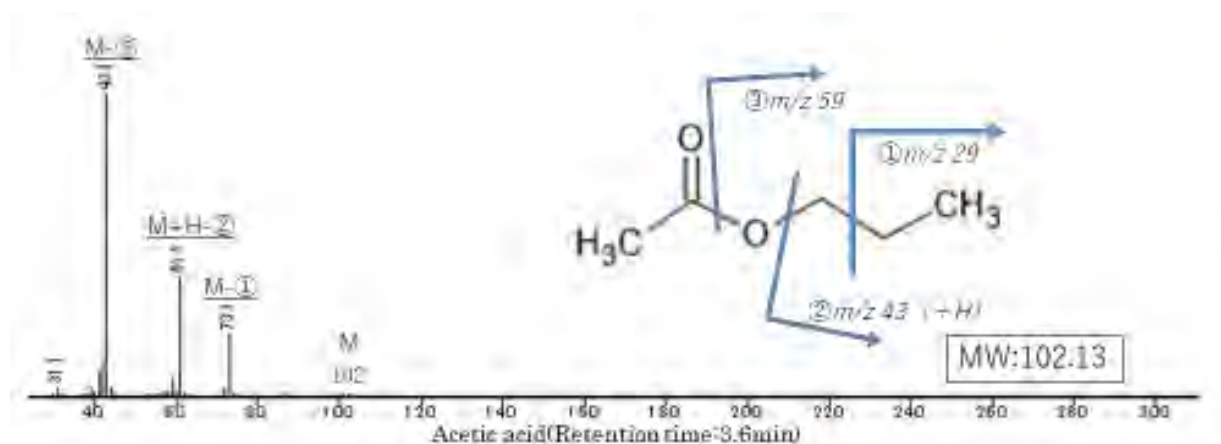


Fig.2-1 Mass spectrum of acetic acid as a propyl ester derivative

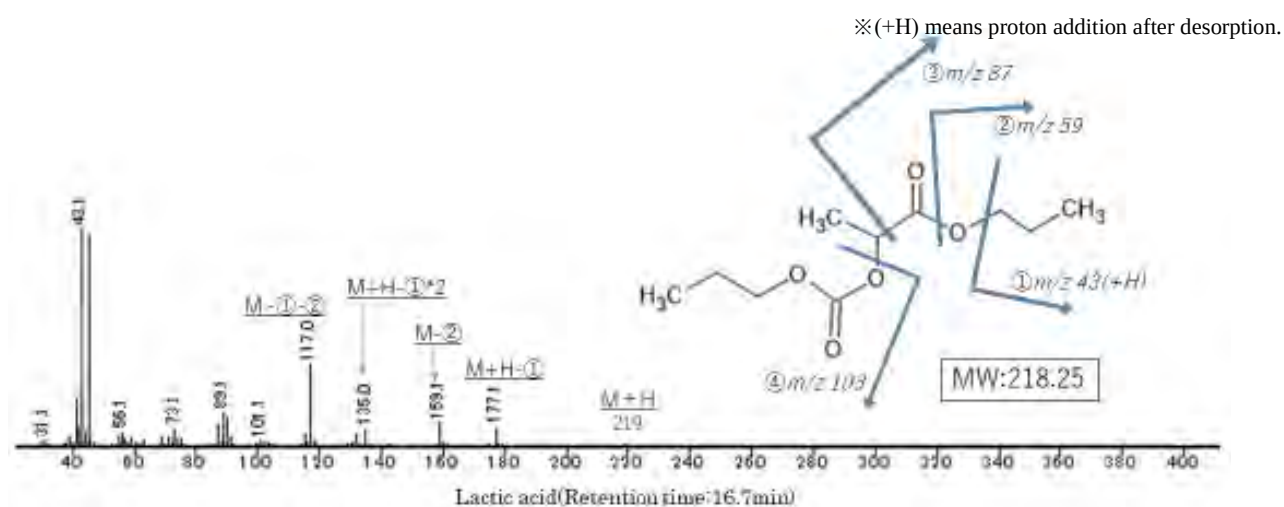


Fig.2-2 Mass spectrum of lactic acid as a propyl ester and propoxy carbonyl derivative

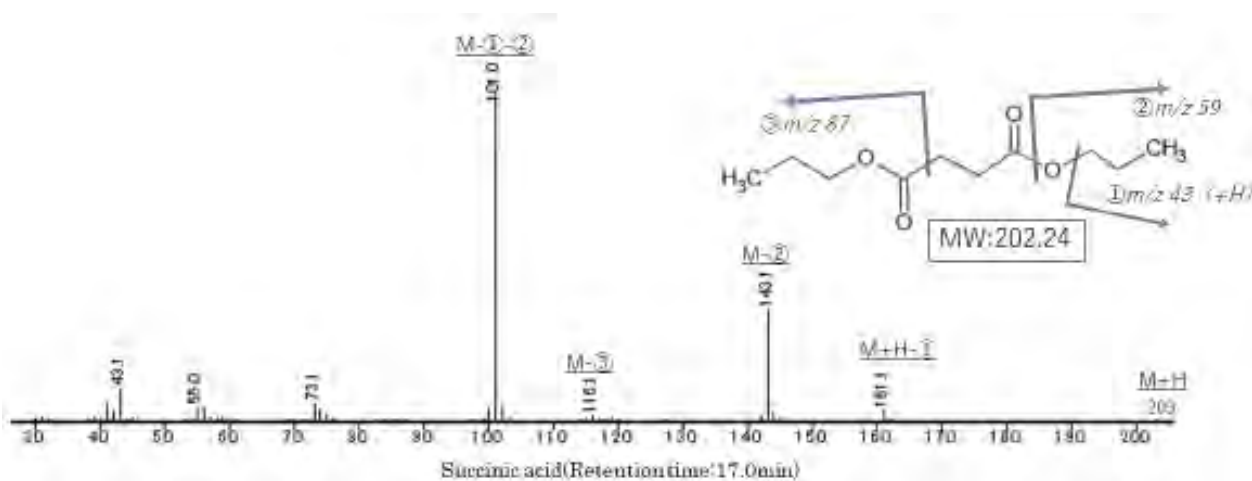


Fig.2-3 Mass spectrum of succinic acid as a propyl ester derivative

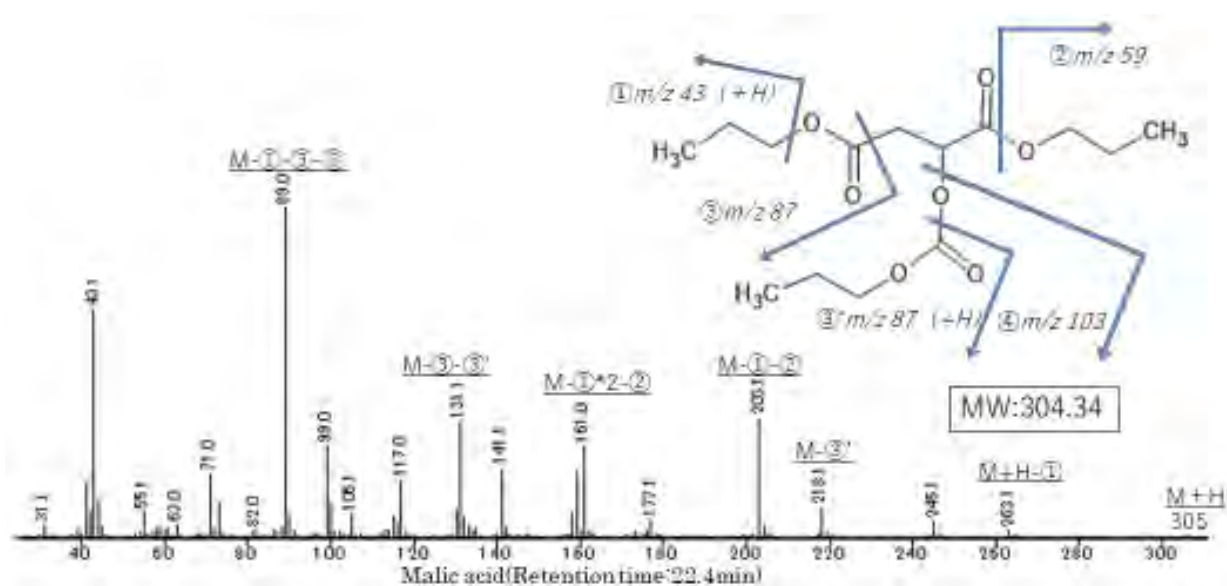


Fig.2-4 Mass spectrum of malic acid as a propyl ester and propoxy carbonyl derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

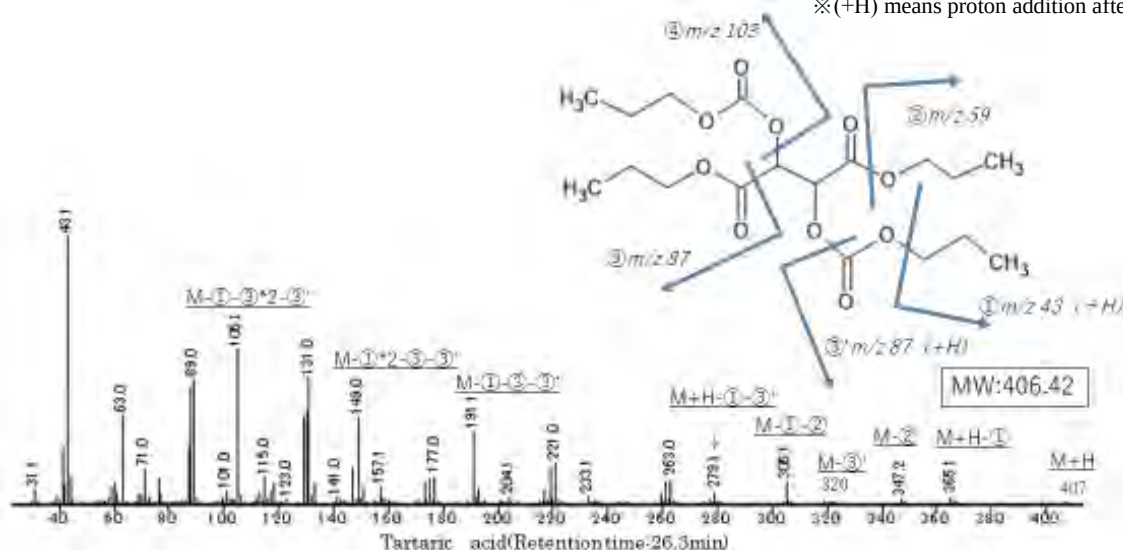


Fig.2-5 Mass spectrum of tartaric acid as a propyl ester and propoxy carbonyl derivative

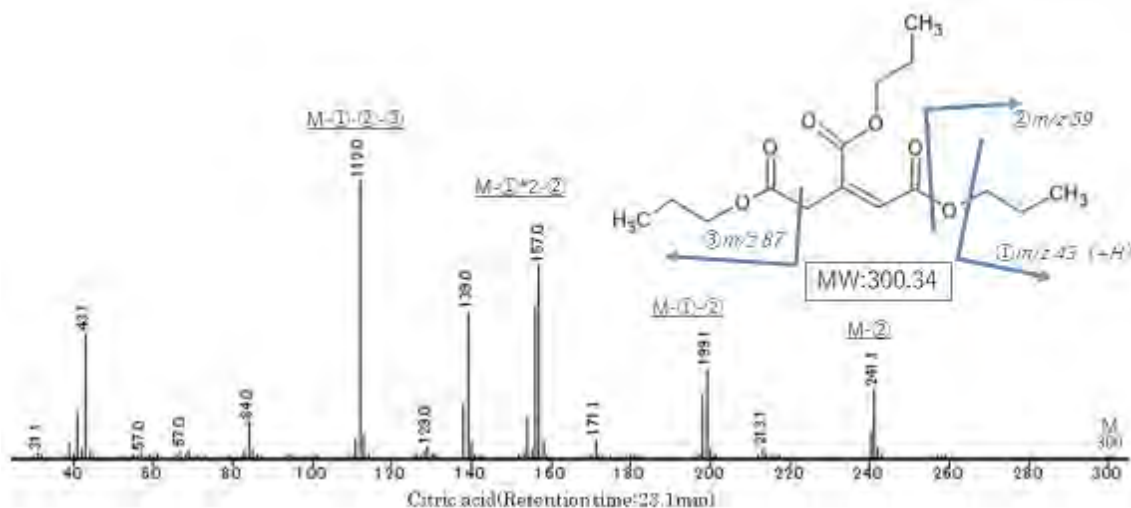


Fig.2-6 Mass spectrum of citric acid as a propyl ester derivative

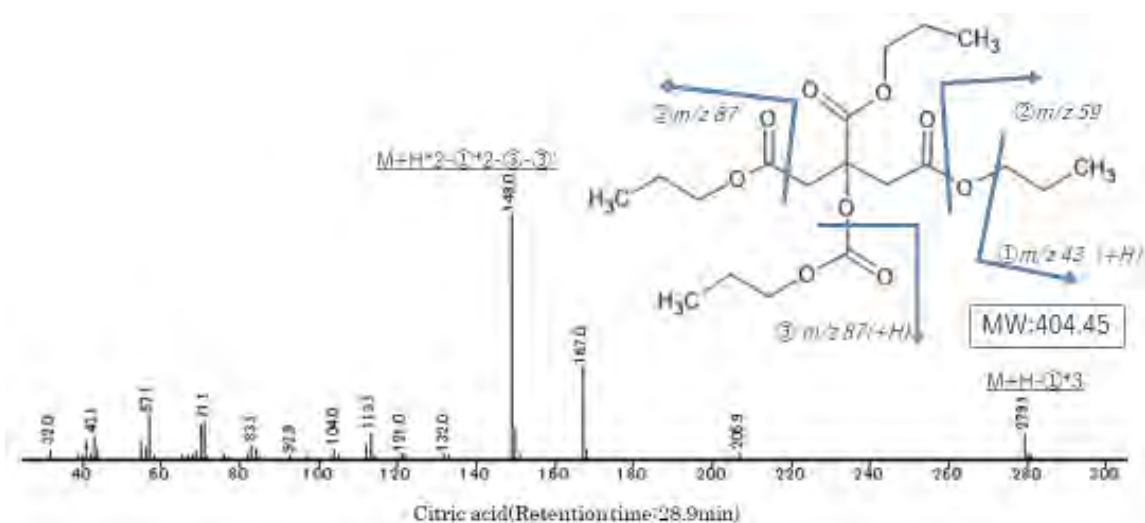


Fig.2-7 Mass spectrum of citric acid as a propyl ester and propoxy carbonyl derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

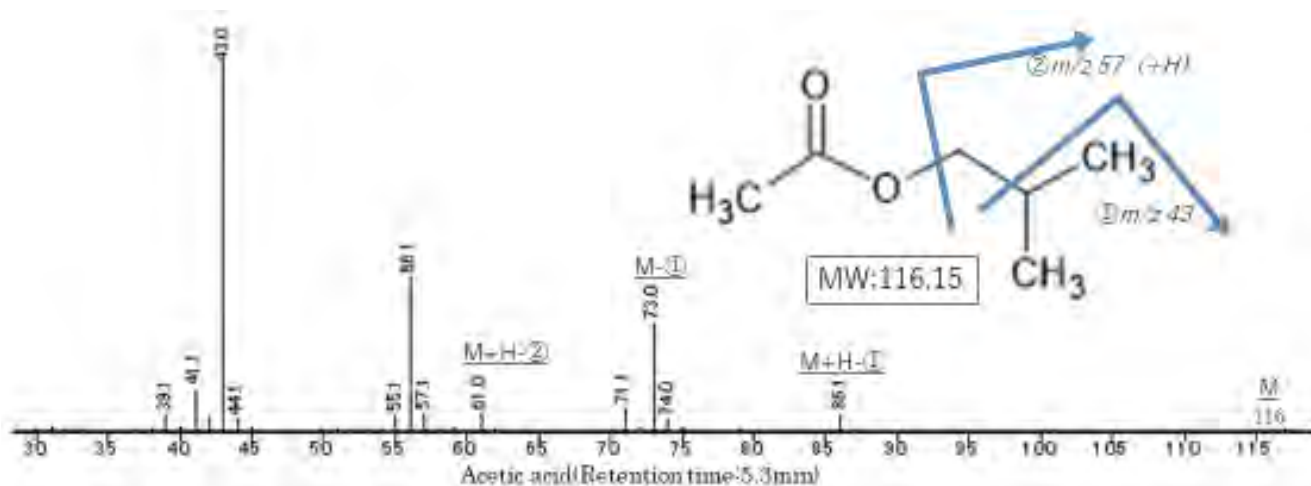


Fig.3-1 Mass spectrum of acetic acid as an isobutyl ester derivative

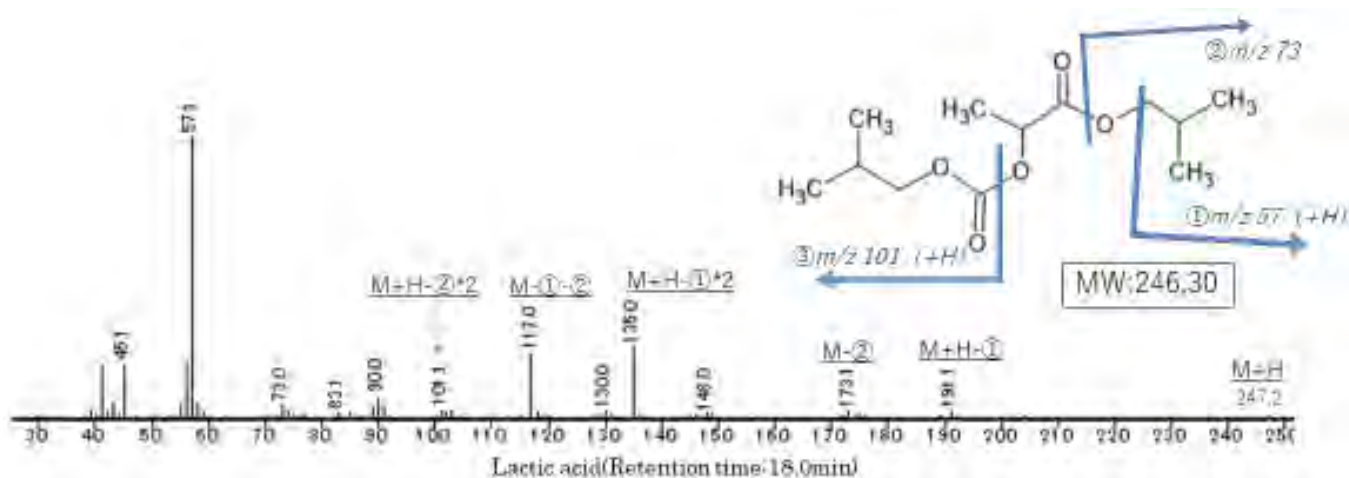


Fig.3-2 Mass spectrum of lactic acid as an isobutyl ester and isobutoxy carbonyl derivative

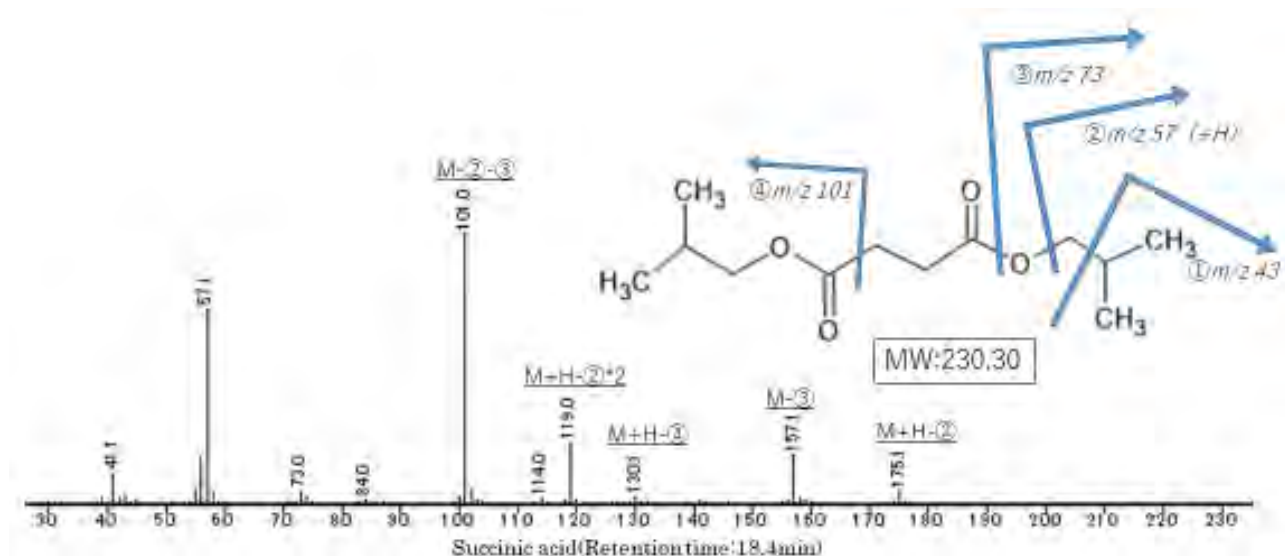


Fig.3-3 Mass spectrum of succinic acid as an isobutyl ester derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

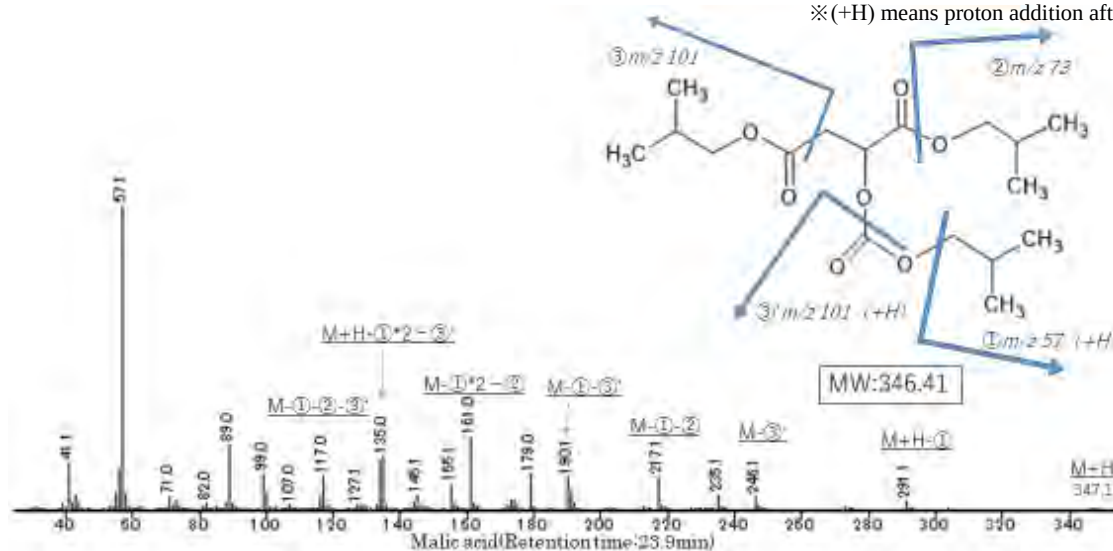


Fig.3-4 Mass spectrum of malic acid as an isobutyl ester and isobutoxy carbonyl derivative

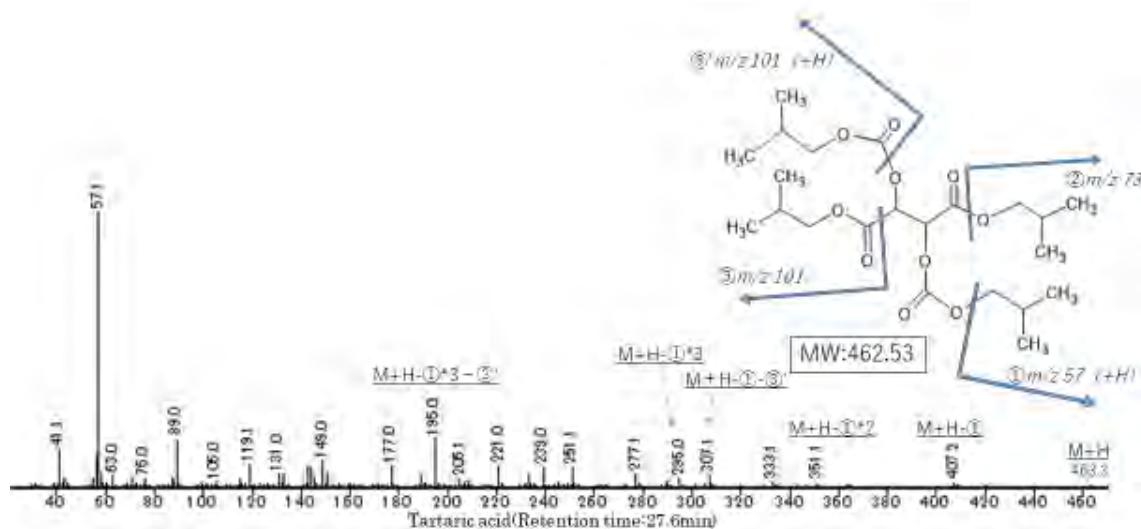


Fig.3-5 Mass spectrum of tartaric acid as an isobutyl ester and isobutoxy carbonyl derivative

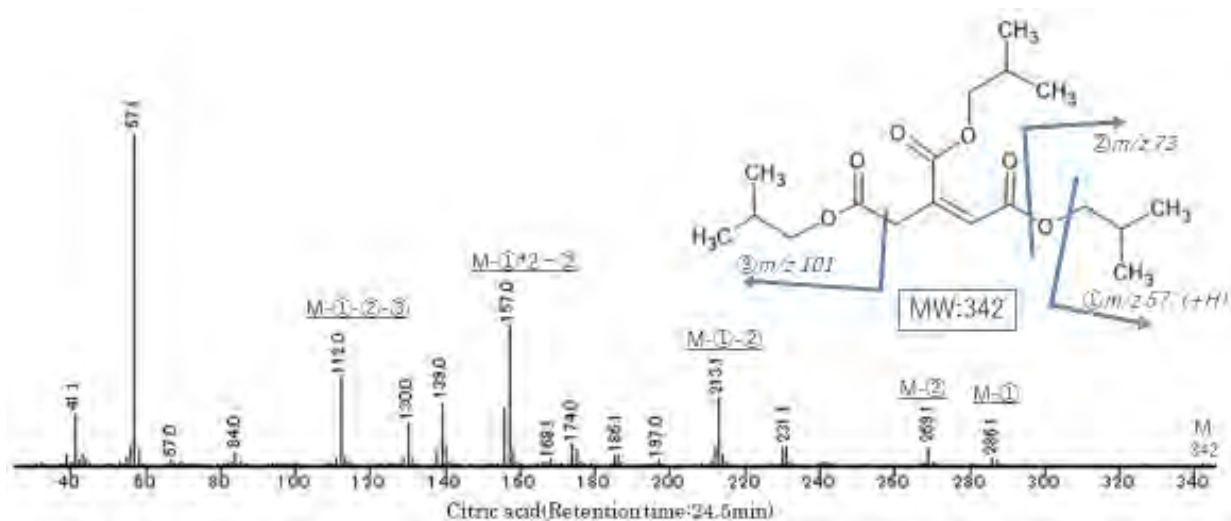


Fig.3-6 Mass spectrum of citric acid as an isobutyl ester derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

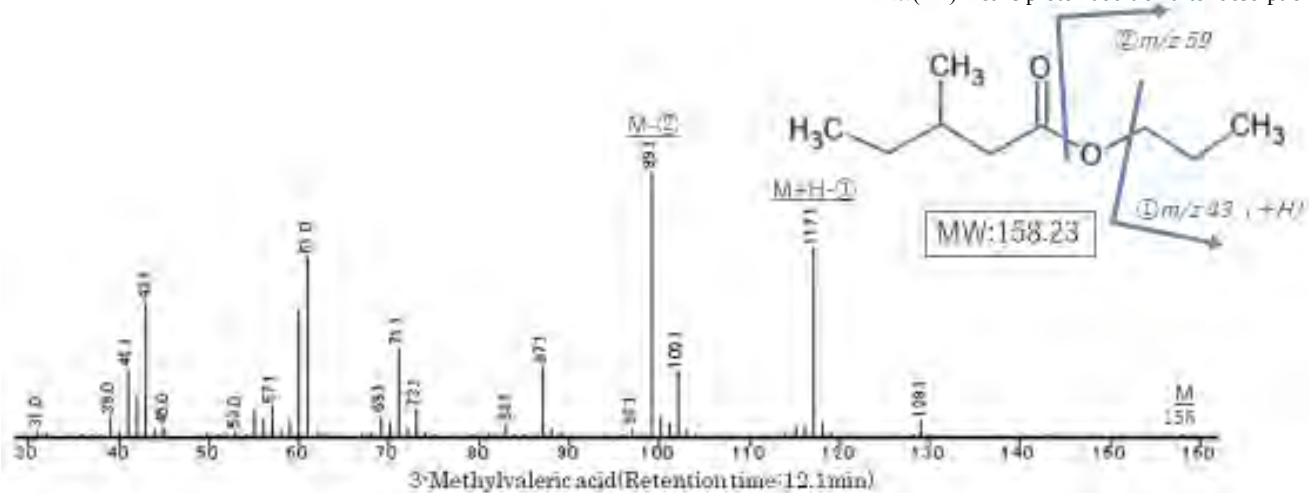


Fig.4-1 Mass spectrum of 3-methylvaleric acid as a propyl ester derivative

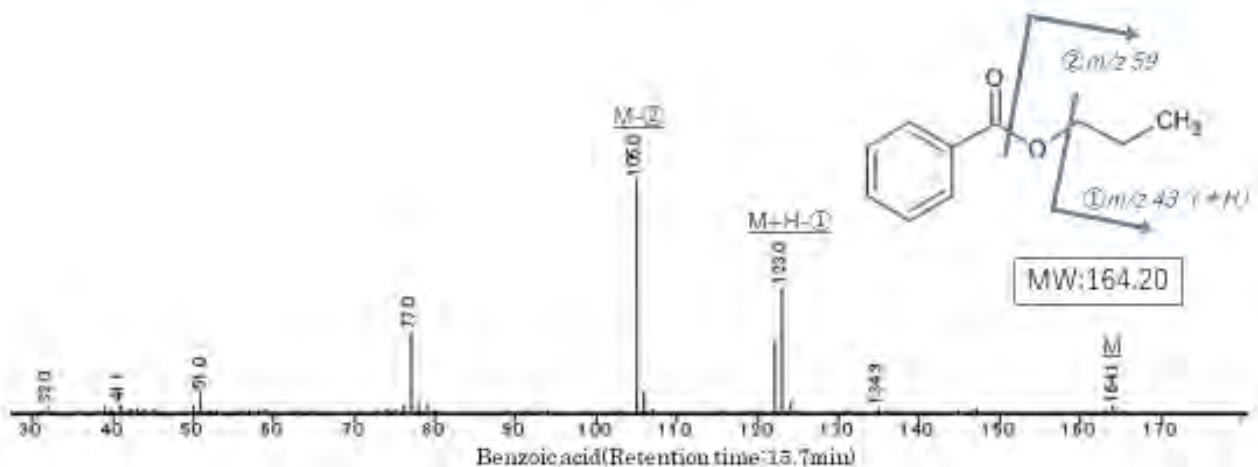


Fig.4-2 Mass spectrum of benzoic acid as a propyl ester derivative

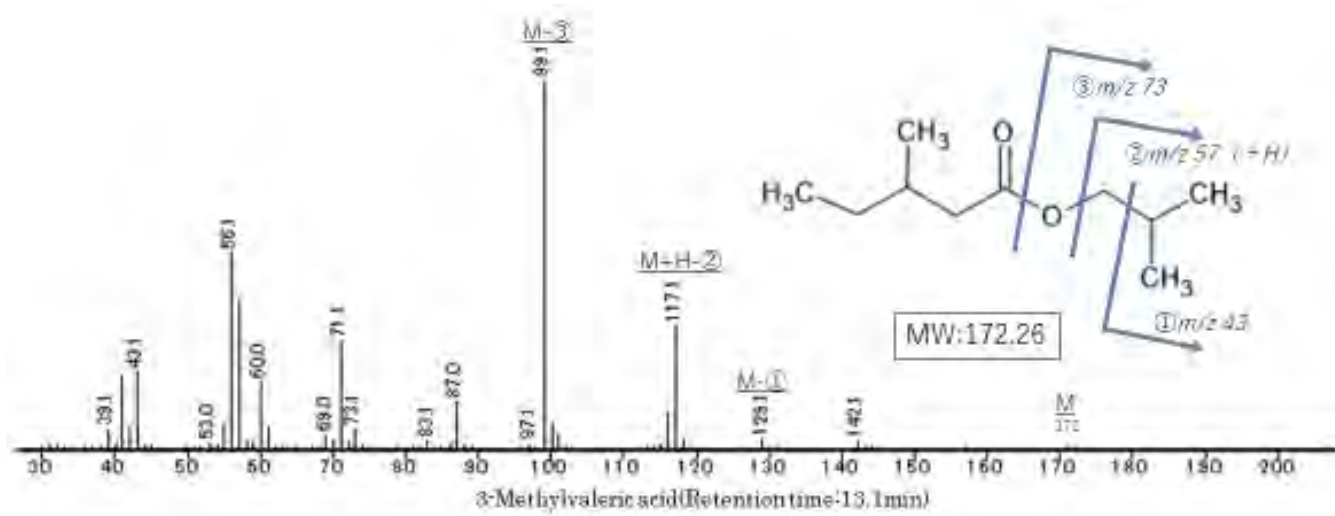


Fig.5-1 Mass spectrum of 3-Methylvaleric acid as an isobutyl ester derivative

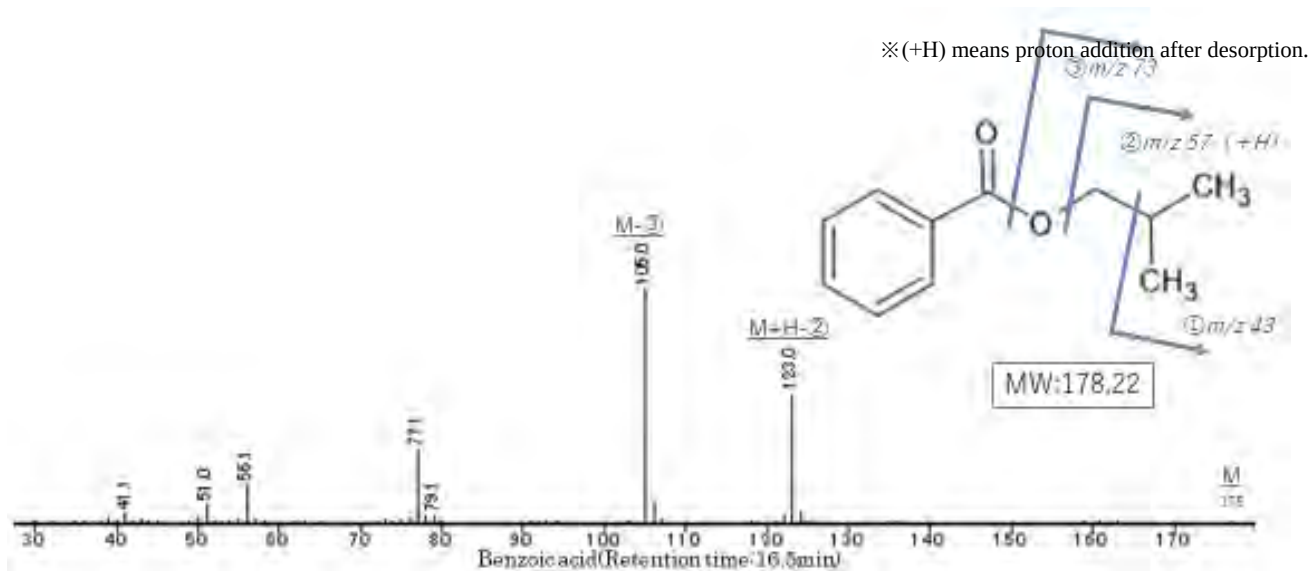


Fig.5-2 Mass spectrum of benzoic acid as an isobutyl ester derivative

※(+H) means proton addition after desorption.

※(+H) means proton addition after desorption.

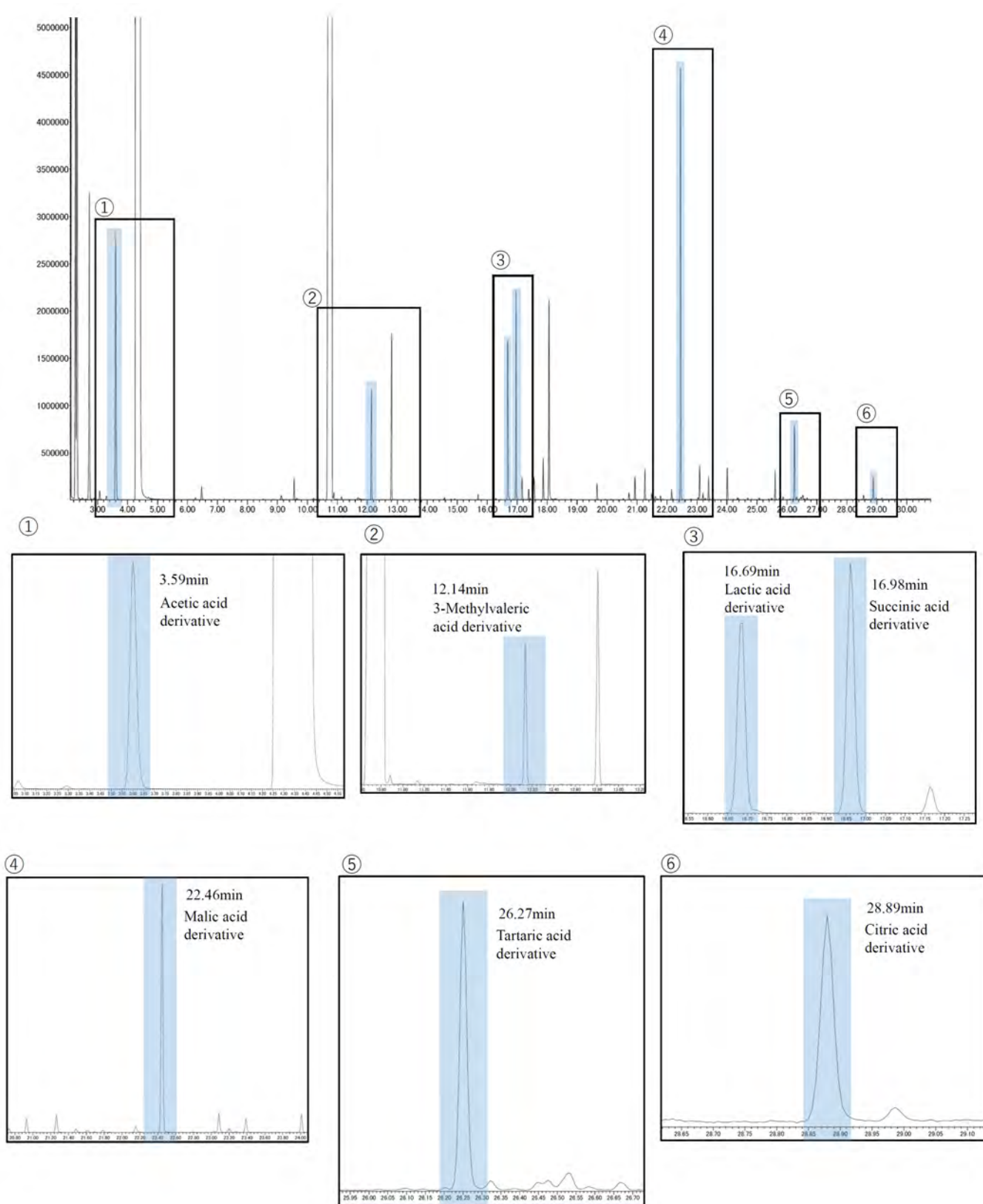


Fig.6-1 Total ion chromatogram of organic acid derivatives by propyl chloroformate.

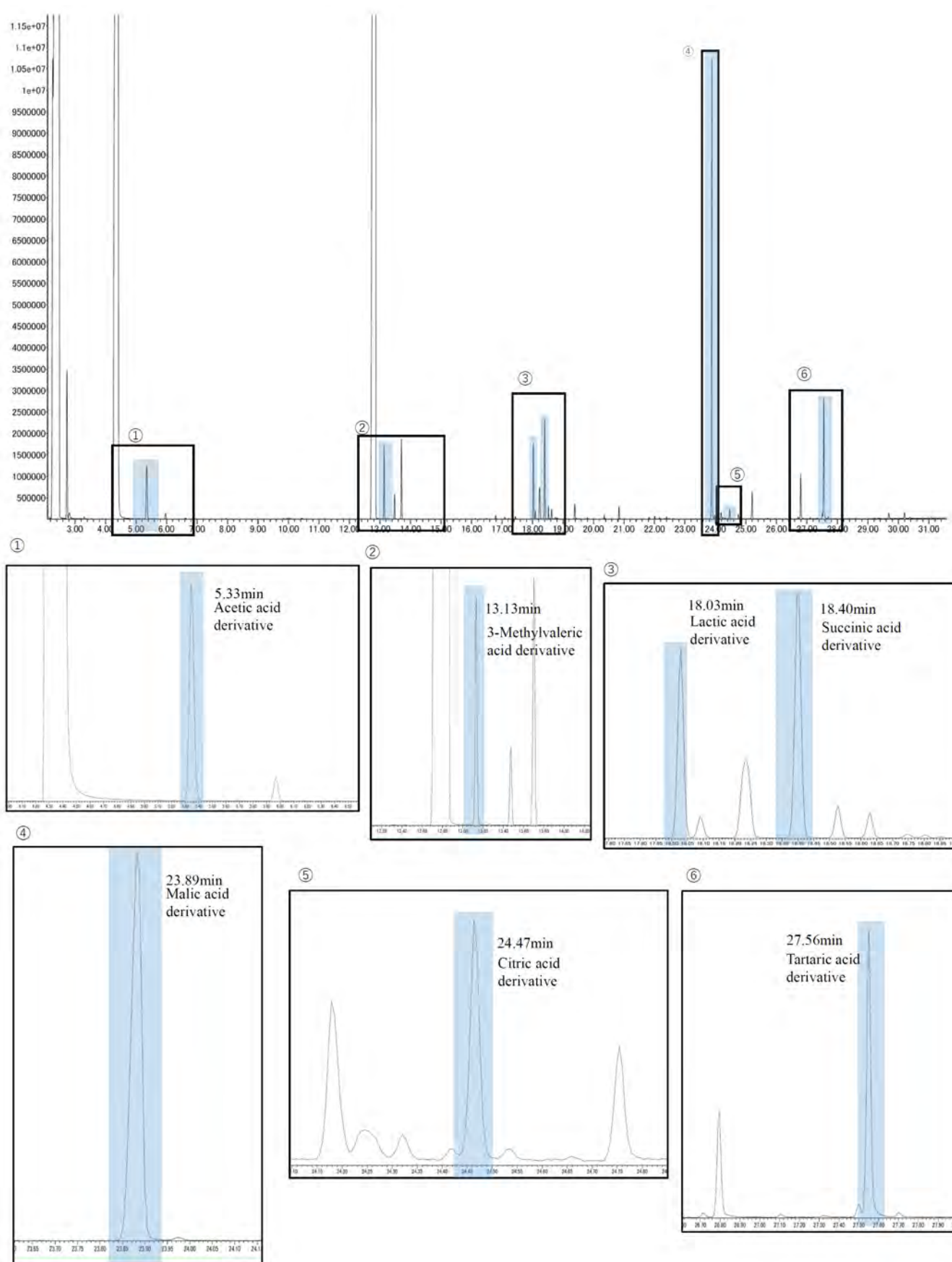


Fig.6-2 Total ion chromatogram of organic acid derivatives by isobutyl chloroformate.

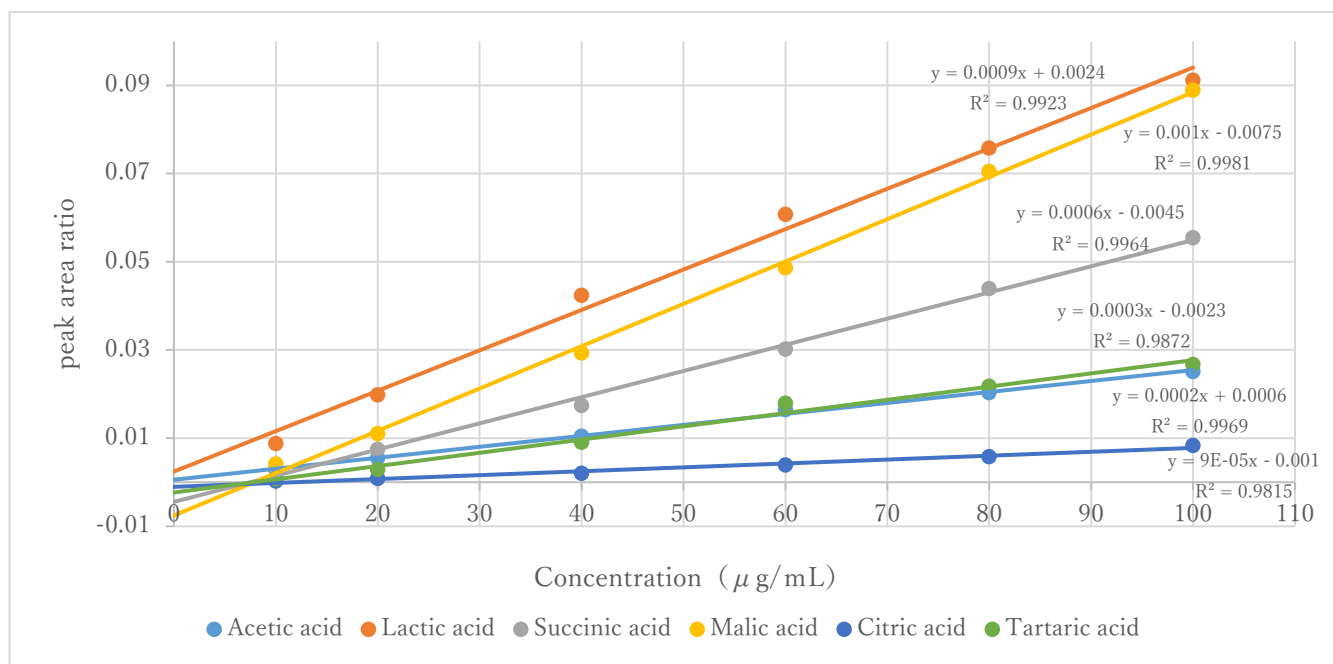


Fig.7 Calibration curve of each organic acid derivative by isobutyl chloroformate.

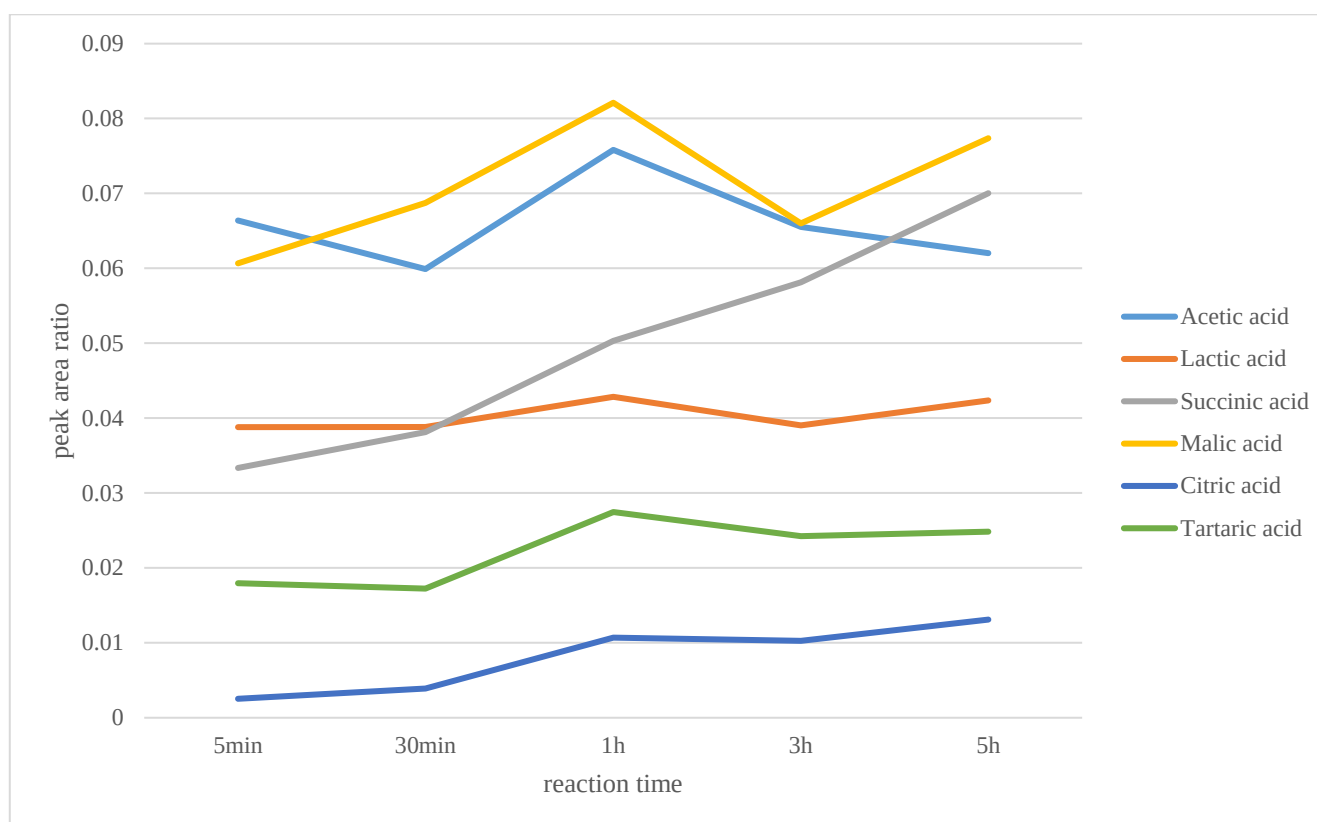


Fig.8 Correlation between peak area ratio and reaction time.

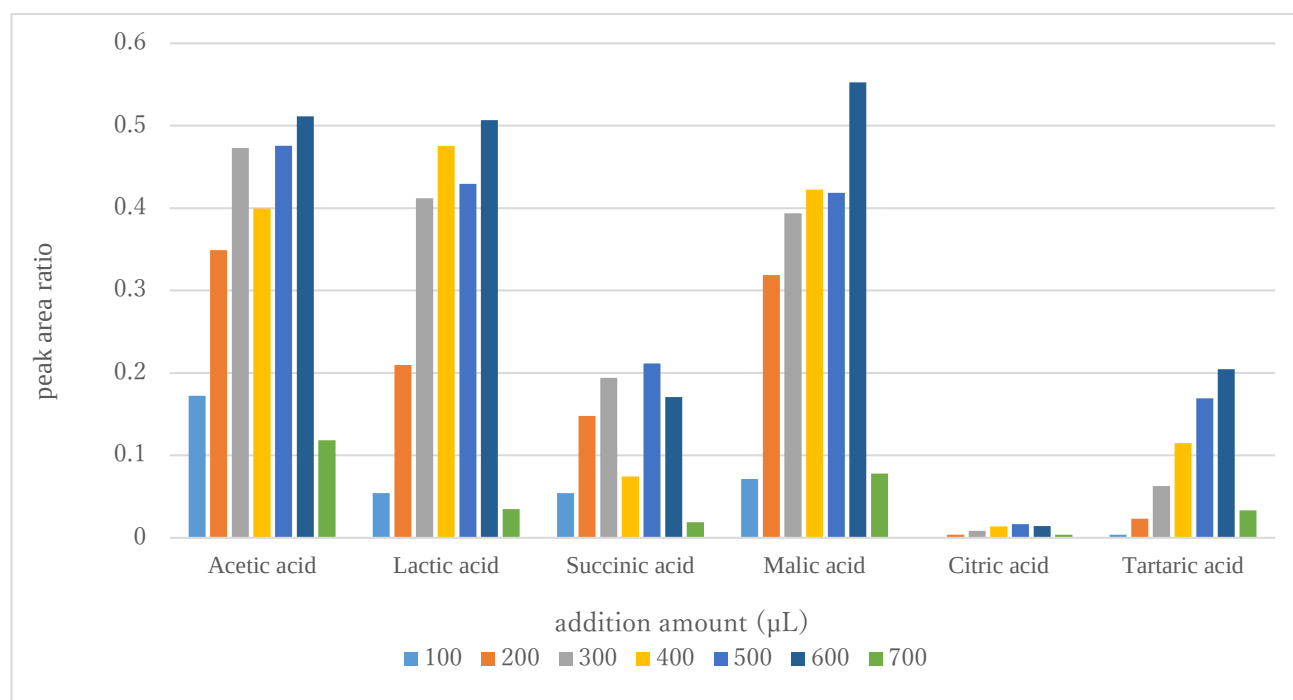


Fig.9 Correlation between peak area ratio and amount of derivatization reagent.