

チモール分析法（はちみつ、ロイヤルゼリー）

1. 分析対象化合物

・チモール

2. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）

3. 試薬、試液

チモール標準品	:	分析用標準品（純度 99.83%）
アセトン、 <i>n</i> -ヘキサン、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、メタノール	:	試薬特級
水	:	脱イオン水を Milli-Q System（Millipore 製）で精製したもの
ジビニルベンゼン- <i>N</i> -ビニルピロリドン共重合体ミニカラム	:	Oasis® HLB 500 mg、6 cc（Waters 製）
シリカゲルミニカラム	:	Sep-Pak® Plus Silica 690 mg（Waters 製）

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

①はちみつの場合

均一化した試料 5 g に 20%メタノール 15 mL を加え、5 分間振とうして抽出液とする。

②ロイヤルゼリーの場合

均一化した試料 1 g にアセトン 1 mL を加えて混和したものにジクロロメタン及び *n*-ヘキサン（3 : 7, v/v）混液 20 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間、冷却（4°C）下で遠心分離し、上澄液を採取する。これにアセトン 20 mL を加えた後、減圧下、40°C 以下で 1 mL 程度まで濃縮・乾固し、窒素気流下で溶媒を留去する。得られた残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1 : 1, v/v）混液 10 mL を加えて溶解し、これを抽出液とする。

2) 精製

①はちみつの場合

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体（以下、HLB とする。）ミニカラムによる精製

HLB ミニカラムにメタノール及び水を順次 6 mL ずつ注入し、流出液は捨てる。このミニカラムに 1) で得られた抽出液を注入し、50%メタノール 6 mL でミニカラムを洗浄した後、10 分間空気を吸引してミニカラムを乾燥する。続いてミニカラムにアセトン 5 mL を注入して溶出液を採取し、これを

減圧下、40°C以下で1 mL程度まで濃縮・乾固した後、窒素気流下で溶媒を留去する。得られた残留物を *n*-ヘキサンに溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

②ロイヤルゼリーの場合

シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムに *n*-ヘキサンを10 mL注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた抽出液を注入し、*n*-ヘキサンを10 mL注入してミニカラムを洗浄する。続いてミニカラムにジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (1:4, v/v) 混液7 mLを注入して溶出液を採取し、これを減圧下、40°C以下で1 mL程度まで濃縮・乾固した後、窒素気流下で溶媒を留去する。得られた残留物を *n*-ヘキサンに溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

チモール標準品を少量の酢酸エチルに溶解した後、*n*-ヘキサンで希釈・定容して500 µg/mLの標準原液を調製する。標準原液を更に *n*-ヘキサンで希釈して標準溶液系列とした後、これをブランク試験溶液で希釈して検量線用のマトリクス標準液を数点調製し、それぞれGC-MSに注入して、ピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液をGC-MSに注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

(例)

装置	: GC ; 6890N, Model No. G1530N (Agilent Technologies製) MS ; 5973 inert system, Model No. G2579A (Agilent Technologies製)
カラム	: DB-WAX, 0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 ; 0.25 µm (Agilent Technologies 製)
カラム温度	: 40°C (5分) - 15°C/分 - 180°C (20分)
注入口温度	: 200°C
キャリアーガス	: ヘリウム
ガス流量	: 1 mL/min (コンスタントフロー)
注入量	: 1 µL
保持時間の目安	: 19分
イオン化モード	: EI (イオン化エネルギー : 70 eV)
イオン検出法	: SIM法

モニタリング
イオン

	定量イオン (<i>m/z</i>)	定性イオン (<i>m/z</i>)
チモール	135	150

8. 定量限界
0.02 ppm

9. 添加回収試験を実施した食品
はちみつ、ロイヤルゼリー

10. 留意事項

- ・チモールは天然に存在する化合物であり、一部の蜂蜜には蜜源に由来するチモールが含まれる場合がある。
- ・標準液は冷暗所で保管する。
- ・抽出操作に用いたホモナイザーのシャフトは、試料毎に *n*-ヘキサン（有機溶媒）を用いて洗浄する。

※ 本分析法は、農産物における作物残留試験等において用いられた残留農薬分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。