7.2 1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）

7.2.a 高速液体クロマトグラフ法

（1） 概要

この試験法は 1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 7.2.a-2017 又は ASU.a-1 とする。

水を分析試料に加えて 1-アミジノ-2-チオ尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 262 nm で測定し、分析試料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）を求める。なお、この試験法の性能は**備考 4** に示す。

（2） 試薬等 試薬及び水は、次による。

a） 水： JIS K 0557 に規定する A3 の水。

b） メタノール： 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。

c） 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム： イオンペアークロマトグラフィー用又は同等の品質の試薬。

d） 酢酸： 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。

e） 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（1000 μg/mL）(1)： 1-アミジノ-2-チオ尿素 ［$C_2H_6N_4S$］(2) 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。

f） 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（100 μg/mL）： 使用時に 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（1000 μg/mL）10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。

g） 検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（10 μg/mL～50 μg/mL）： 使用時に 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（100 μg/mL）の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

h） 検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（1 μg/mL～10 μg/mL）： 使用時に検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（20 μg/mL）の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注（1） 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

（2） 1-アミジノ-2-チオ尿素として 98 %（質量分率）以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 1-アミジノ-2-チオ尿素はグアニルチオ尿素として東京化成工業より、アミジノチオ尿素として関東化学より市販されている。

（3） 装置 装置は、次のとおりとする。

a） 高速液体クロマトグラフ： JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。

1） カラム： 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。

2） カラム槽： カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。

3） 検出部： 吸光光度検出器で波長 262 nm 付近で測定できるもの。

b） マグネチックスターラー

c） 高速遠心分離機： 8000×*g*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C_{18}、COSMOSIL 5C18-MS-II等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。

b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。

c) 静置後、上澄み液(3)を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とる。

d) 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し(5)、上澄み液を試料溶液とする。

注(3) 試料溶液中の 1-アミジノ-2-チオ尿素濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*g* 程度となる。

備考 3. (**4.1**)**c**～**d**)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) 高速液体クロマトグラフの測定条件: 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1) カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)

2) カラム槽温度: 30 °C～45 °C

3) 溶離液: メタノール－水(2+8)1000 mL に 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム 0.94 g を溶かし、酢酸で pH 3.15 に調整し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過する(1)。

4) 流量: 1 mL/min

5) 検出器: 吸光光度検出器、測定波長 262 nm

b) 検量線の作成

1) 各検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 262 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。

2) 各検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液の濃度と波長 262 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

1) 試料溶液 10 μL を **b**)**1**)と同様に操作する。

2) 検量線から 1-アミジノ-2-チオ尿素量を求め、分析試料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素(ASU)を算出する。

備考 4. 化成肥料(2 点)を用いて 3 点併行で回収試験を実施した結果、1-アミジノ-2-チオ尿素として 1.0 %

（質量分率）、0.5 %（質量分率）及び 0.25 %（質量分率）の濃度レベルでの平均回収率は 99.0 %～104.3 %、97.7 %～100.7 %及び 99.7 %～101.3 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.005 %（質量分率）程度と推定された。

表1　1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数[1)]	平均値[2)] (%)[3)]	s_r[4)] (%)[3)]	RSD_r[5)] (%)	s_R[6)] (%)[3)]	RSD_R[7)] (%)
化成肥料1	10(0)	0.093	0.009	9.1	0.010	11.2
化成肥料2	10(0)	0.246	0.021	8.6	0.021	8.6
化成肥料3	10(0)	0.511	0.018	3.6	0.025	4.9
化成肥料4	10(0)	0.759	0.039	5.1	0.040	5.3
化成肥料5	10(0)	1.020	0.039	3.8	0.044	4.3

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2） 平均値（n=有効試験室数×試料数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 室間再現標準偏差
7） 室間再現相対標準偏差

参考文献

1） 千葉一則: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミジノ-2-チオウレア（ASU）の分析法について, 肥検回報, **43 (4)**, 15~22 (1990)

2） 甲斐茂浩, 渡部絵里菜: 化成肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミジノ-2-チオ尿素の測定－共同試験成績－, 肥料研究報告, **6**, 36~32 (2013)

（5） 1-アミジノ-2-チオ尿素試験法フローシート　肥料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）試験法のフローシートを次に示す。

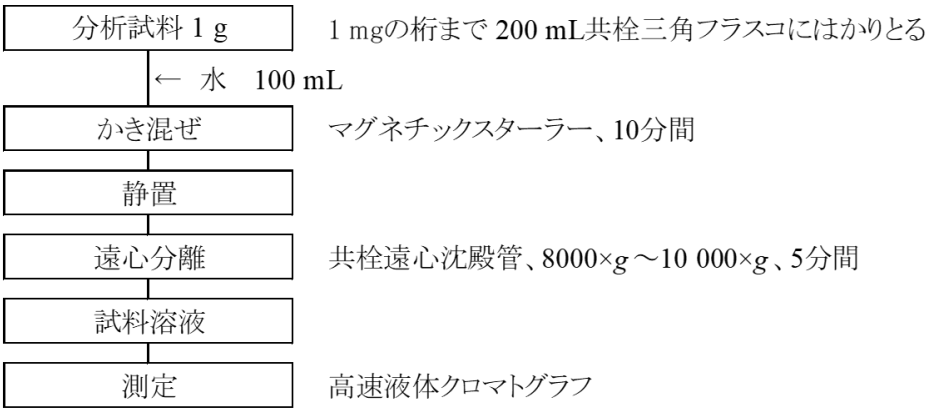
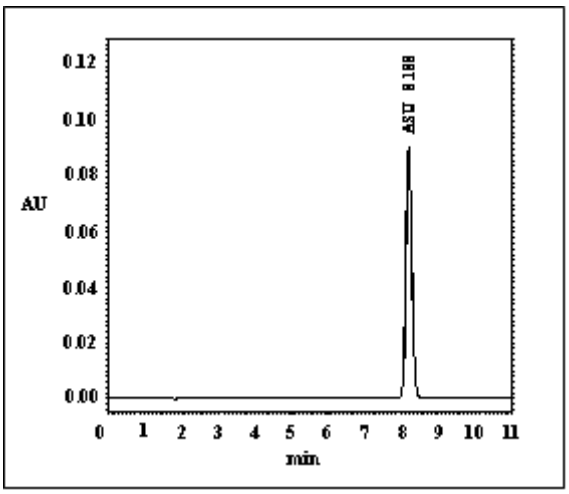


図　肥料中の1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）試験法フローシート

参考 検量線用 1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図　1-アミジノ-2-チオ尿素（ASU）標準液の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム:　Mightysil RP-18 GP（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）

1-アミジノ-2-チオ尿素標準液（200 ng 相当量）

その他の条件は（**4.2**）**a**）HPLC の測定条件の例示のとおり