—技術報告—

自動還元特性を利用した簡便なジクワットとパラコートの吸光測定法

西田憲市, 成原政治, 堤 一博, 伊東晋治

大分県警察本部科学捜査研究所
〒870-8502 大分県大分市大手町3-1-1**A Simple Colorimetric Determination of Diquat and Paraquat Utilizing Automatic Reduction Property**

Kenichi Nishida, Masaharu Narihara, Kazuhiro Thuthumi and Sinji Ito

*Forensic Science Laboratory, Oita Prefectural Police H. Q.
3-1-1 Otemachi, Oita-shi, Oita, 870-8502, Japan**(Received 25 November 2003; accepted 17 March 2004)*

We developed a simple colorimetric method which can separately determine paraquat and diquat utilizing automatic reduction property of diquat under existence of tetramethylammonium hydroxide. In the first step, diquat in the sample was automatically reduced by adding tetramethylammonium hydroxide, and UV/VIS spectrum ($\lambda_{\max}=430$ nm) and absorbance at 430 nm were measured for confirmation and determination of diquat. In the second step, paraquat in the sample was also reduced by adding sodium hydrosulfite, and UV/VIS spectrum ($\lambda_{\max}=396$ nm, 600 nm.) and absorbance at 600 nm were measured for confirmation and determination of paraquat. The calibration curves were linear in the concentration range from 1–100 ppm for both compounds. The herbicide containing both paraquat and diquat, Preeglox-L[®], showed typical UV/VIS spectra of each compound, and there was a good correlation between herbicide concentration and paraquat and diquat concentrations. The established method was successfully applied to forensic samples, gastric content and heeltap solution.

Key words: Paraquat, Diquat, Automatic reduction, Colorimetric method

緒 言

アルキルジピリジニウム系農薬であるジクワットとパラコートは、除草剤としてそれぞれ単独製剤で市販されていた。しかし、パラコートによる死亡者が1986年に約2000人にまで増加したため、1986年7月以降は、ジクワットとパラコートをそれぞれ7%と5%含有する混合製剤に切り替えられた。以後、

徐々に死亡者は減少していったが、現在でも依然高い水準で推移している¹⁾。また、旧製品であるパラコート単独製剤による死亡事例は、製剤変更から17年経過した今でも全くなくなってはいない。これら農薬の簡便な確認法は、1%ハイドロサルファイトナトリウム-1N水酸化ナトリウムによる呈色法($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -NaOH法)がある。この呈色法は、アル

カリ性下1電子還元したパラコートが $\lambda_{\max}$ に396 nmと600 nmを持つ青色を、ジクワットが $\lambda_{\max}$ に379 nmと430 nmを持つ黄緑色を呈することによるが、この呈色法では、ジクワットの $\lambda_{\max}=430$ nmでのモル吸光係数 ε が5000に対してパラコートの $\lambda_{\max}=396$ nmでの ε が45000とあまりにも強いため、ジクワットの吸収を確認できない欠点を持っており、自殺などで使用された農薬製剤が、混合製剤なのかパラコート単独製剤なのかの識別ができなかった。そのため、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4\text{-NaOH}$ 法を改良した二次微分²⁾や二波長分光分析³⁾やジクワットをアルカリ性下加熱して分解させる方法⁴⁾などの報告があるが、混合製剤を証明するためには、高速液体クロマトグラフィ⁵⁾やキャピラリー電気泳動⁶⁾などの分離分析に頼らざるを得なかった。

ジクワットまたはパラコートは、その含量が多いと自動還元によって青色または黄緑色を呈することは知られていた⁷⁾。これらの自動還元は、4級アンモニウムイオンが関与していると推定して、我々は同じ4級アンモニウムイオンを持つ水酸化テトラメチルアンモニウムをジクワットとパラコートの混合溶液中に添加してみたところ、ジクワットのみが自動還元され、溶液が黄緑色を呈する($\lambda_{\max}=430$ nm)ことを発見した。そこで、この特性とハイドロサルファイトナトリウムによる還元を組み合わせることにより、混合溶液中でもジクワットとパラコートをそれぞれ独立して測定できる方法を開発し、これを混合製剤であるプリグロックス L[®]の分析に応用した。

材料および方法

1 試薬類

ジクワットジプロミドとパラコートジクロリドは、ICI ジャパン LTD (東京) から供与を受けたものを使用した。ハイドロサルファイトナトリウムは、和光純薬工業株式会社 (大阪) の化学用を用いた。水酸化テトラメチルアンモニウムは、ナカライテスク株式会社 (京都) の五水和物を使って50%水溶液を調製し、これを5°Cで保存したものを使用した。分光光度計は、島津製作所 UV-8600を使用した。

混合製剤は、プリグロックス L[®] (ゼネカ株式会社, 東京, パラコートジクロリド5.0%, ジクワットジプロミド7.0%含有) を用いた。

胃液及び吐物は、上記混合製剤を服用して中毒死した70歳代男性のものを使用した。

2 操作法

セミマイクロセルに試料0.3 ml を入れ、50%水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液0.2 ml 加えて分光光度計内で20分間放置した後、ジクワットの確認のためスペクトル測定あるいは430 nm での吸光度を測定した。その後、ハイドロサルファイトナトリウムを約2 mg 添加して混和後、直ちにパラコート確認のためスペクトル測定あるいは600 nm での吸光度を測定した。

結果および考察

水酸化テトラメチルアンモニウムのジクワットおよびパラコートへの影響を調べるために、まず、50 ppm のジクワットとパラコートの混合標準液に対して各種濃度の水酸化テトラメチルアンモニウムを添加して、操作法に従って吸光度を測定した。Fig. 1. に示すとおり、ジクワットに対しては水酸化テトラメチルアンモニウム濃度が10%まで吸光度が定量的に上がっていき、それ以後徐々に平衡化していった。パラコートに対しては、水酸化テトラメチルアンモニウム濃度の増加により吸光度が低下する傾向が見られた。つぎに同じ試料を使い、10%~25%

Fig. 1 Effect of tetramethylammonium hydroxide concentration on the reduction of diquat (—○—) and paraquat (—△—).

の水酸化テトラメチルアンモニウムを添加して、ジクワットに関しては430 nm、パラコートに関しては600 nmでの吸光度の経時変化を観測した。その結果はFig. 2にまとめたが、ジクワットにおいて15%以下の水酸化テトラメチルアンモニウムでは吸光度が安定化するのに1時間以上の時間を要したが、20%以上の濃度であれば20分以降安定した吸光度が得られた。この安定性は少なくとも2時間は変わらず、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4\text{-NaOH}$ 法で還元したときに生じる吸光度の減少は観察されず、ジクワットに対して良好な測定が可能であった。パラコートにおいては、代表して10%と20%濃度のデータを示したが、水酸化テトラメチルアンモニウムの濃度が上がると吸光度の低下のみならず呈色の安定時間が若干減少した。このことは、水酸化テトラメチルアンモニウ

Fig. 2 Time courses of absorbance at 430 nm (A) after adding tetramethylammonium hydroxide and absorbance at 600 nm (B) after adding both tetramethylammonium hydroxide and sodium hydrosulfite to the mixed solution of diquat and paraquat. Concentrations of tetramethylammonium hydroxide in the sample were 10% ($\triangle$), 15% ($\square$), 20% ($\circ$) and 25% ($\times$).

ムの過飽和が影響していると推測されたが、本法の分析対象である混合製剤中のジクワットとパラコートの含有率はほぼ同じであり、パラコートのみ検出感度を上げる必要がないこと、また、ジクワットの安定化時間をできるだけ短縮する目的から、本法での水酸化テトラメチルアンモニウムの濃度は20%とした。

40 ppm のジクワットとパラコートの混合標準液で測定した吸収スペクトルをFig. 3に示した。ジクワットは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4\text{-NaOH}$ 法で測定すると379 nmと430 nmの2つの $\lambda_{\max}$ を持つスペクトルになるが、本法で測定すると430 nmに $\lambda_{\max}$ を持つ単一のスペクトルとなり、 $\lambda_{\max}$ での ϵ は5600であり $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4\text{-NaOH}$ 法より吸収は強かった。パラコートは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4\text{-NaOH}$ 法と同じスペクトル($\lambda_{\max} = 396$ nm, 600 nm)が得られ、600 nmでの ϵ は5200であった。また、プリグロックスL[®]を水で希釈した液についても同じスペクトルが得られており、製品中の他成分の影響を受けないことがわかった。

ジクワットとパラコートの混合標準液を用いて、

Fig. 3 Spectra of diquat (A) and paraquat (B) after reduction.

ジクワットは430 nm, パラコートは600 nm での吸光度による検量線を作成したところ, いずれも 1~100 ppm の間で, ジクワット $y = 0.018x + 0.111$, $r^2 = 0.991$, パラコート $y = 0.017x + 0.103$, $r^2 = 0.994$ の良好な直線関係が得られた. 作成した検量線を用いて各種濃度に調製したプリグロックス L[®] 中のジクワットとパラコートの定量を行ったところ, Fig. 4. に示すとおり混合製剤濃度 0.002~0.15 % の間で定量値と良好な相関関係にあり, この濃度間での定量が可能であった.

目視で確認できる呈色の下限濃度はジクワットおよびパラコートいずれも, 標準液で 3 ppm であり, プリグロックス L[®] で 0.005% であった. また, ジクワットに関しては, 標準液で 5 ppm 以上, プリグロックス L[®] で 0.01% 以上あれば直ちに目視で確認可能な呈色が得られ, 20分間放置することなくスペクトル測定が可能であった.

相対標準偏差は, 胃液に 0.05% 濃度になるようにプリグロックス L[®] を加えたものを用い, 5 回の繰り返し実験により求めたところ, ジクワットは 1.53 %, パラコートは 1.84% であった.

プリグロックス L[®] を服用して死亡した 70 歳代男性の胃液と吐物を水で 1000 倍に希釈したものを本法で分析したところ, 各スペクトルは Fig. 3 で示したものと同一特徴的なものが得られた. 検量線により求めた定量値は, 胃液でジクワットが 25.47 ± 0.23 ppm, パラコートが 20.34 ± 0.63 ppm であり, 吐物でジクワットが 14.13 ± 0.09 ppm, パラコート

Fig. 4 Correlation of concentration between Preeglox-L[®] and diquat (—○—) or paraquat (—△—).

が 9.47 ± 0.04 ppm であった. これらの値から, 各資料中のプリグロックス L[®] 濃度は, 胃液で約 40 %, 吐物で約 20% であることがわかった. また, 各定量値をジクワット対パラコートの含有比に換算すると, 製品表示値の 7 対 5 に近い値が得られ, このことから混合製剤の服用が証明された.

結 語

本法は, 分光光度計用のセル中でジクワットとパラコートが確認できる簡便な方法である. 我々が取り扱う変死や毒物混入事件において, プリグロックス L[®] などの混合製剤が使用される時は, 服用した人の胃液, 飲み残し液などの中には比較的高濃度に存在している. そのため, 中毒原因物質の判明やその服用の証明には, 本法が非常に有効な方法と言える.

文 献

- 1) 内藤裕史: 中毒百科. pp293-305, 南江堂, 東京 (2001) .
- 2) Fuke C., Ameno K., Ameno S., Kiri T., Shinohara T., Sogo K. and Ijiri I.: A rapid, simultaneous determination of paraquat and diquat in serum and urine using second-derivative spectroscopy. J. Anal. Toxicol., **16**, 214-216 (1992).
- 3) 田山順一, 小松正孝, 土井幹雄, 大橋教良, 石沢淳子, 水谷太郎: 2 波長測光によるパラコート, ジクワット同時分析. 中毒研究, **4**, 157-162 (1991).
- 4) Minakata K., Suzuki O., Saito S. and Harada N.: A new diquat derivative appropriate for colourimetric measurements of biological materials in the presence of paraquat. Int. J. Legal Med., **114**, 1-5 (2000).
- 5) Ito S., Nagata T., Kudo K., Kimura K. and Imamura T.: Simultaneous determination of paraquat and diquat in human tissues by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **23**, 119-123 (1993).
- 6) Vinner E., Stievenart M., Humbert L., Mathieu D. and Lhermitte M. : Separation and quantifica-

tion of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis. Biomed. Chromatogr., **15**, 342-347 (2001).

7) 日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解 第4版. pp361-371, 南江堂, 東京 (1992).