

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20200205003

田天琪, 万祎, 魏源送, 等. 斯里兰卡土壤和沉积物中草甘膦及降解产物的分析及污染特征[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(4): 158-166

Tian T Q, Wan Y, Wei Y S, et al. Analysis and occurrences of glyphosate and its degradation product in soil and sediment samples from Sri Lanka [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(4): 158-166 (in Chinese)

斯里兰卡土壤和沉积物中草甘膦及降解产物的分析及污染特征

田天琪¹, 万祎^{1,*}, 魏源送², 胡建英¹

1. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

收稿日期: 2020-02-05 录用日期: 2020-04-27

摘要: 不明原因慢性肾病(CKDu)是斯里兰卡北部稻农高发的肾脏疾病, 其中, 除草剂草甘膦的接触暴露被认为是重要诱因之一。制备了草甘膦-钙络合物, 分析了不同 pH 下络合物的性质和形态, 发现酸性条件能够有效消除草甘膦-钙络合物对于草甘膦的提取和化学衍生的影响, 在此基础上优化并建立了草甘膦及其降解产物在斯里兰卡土壤中的萃取和衍生前处理-GC-MS 分析方法。利用该方法对斯里兰卡土壤及沉积物中草甘膦及其降解产物进行了测定。土壤中草甘膦及其降解产物的浓度分别为 26 ~ 340 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 0 ~ 427 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 沉积物中 2 种物质的浓度分别为 45 ~ 152 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 ND。北部 CKDu 高发区的稻田未处于耕种季, 但其土壤中草甘膦浓度却高于南部耕种季的土壤, 这可能是由于北部井水的硬度高, 草甘膦与水中钙离子的络合导致其部分失效, 从而使北部稻田草甘膦的施用量增加, 增大了当地农民的草甘膦暴露, 这是当地稻农 CKDu 疾病高发的潜在环境因素之一。

关键词: 草甘膦; 不明原因慢性肾病; 络合物; 硬水

文章编号: 1673-5897(2020)4-158-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Analysis and Occurrences of Glyphosate and Its Degradation Product in Soil and Sediment Samples from Sri Lanka

Tian Tianqi¹, Wan Yi^{1,*}, Wei Yuansong², Hu Jianying¹

1. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 5 February 2020 accepted 27 April 2020

Abstract: Chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) is a kidney disease with high incidence in rice farmers in northern Sri Lanka. Exposure to the herbicide glyphosate is considered to be one of the important factors associated with the disease. In this study, we prepared the glyphosate-calcium complex, and assessed its properties in solutions with different pH. It is found that acidic conditions can effectively remove the complex, which could interfere the analysis of glyphosate during the extraction and chemical derivatization processes. Based on the results, an analytical method was established for glyphosate and its degradation product by derivatization-GC-MS and

基金项目: 中国-斯里兰卡水技术研究与示范联合中心资助项目; 中国科学院中国-斯里兰卡联合科教中心资助项目

第一作者: 田天琪(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境污染化学, E-mail: ttq0324@urban.pku.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wany@urban.pku.edu.cn

applied to soil and sediment samples from Sri Lanka. Concentrations of glyphosate and its degradation product in the soil were in the range of 26 ~ 340 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 0 ~ 427 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectively, and concentrations of the two substances in sediments were 45 ~ 152 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and ND respectively. In the northern area with high CKDu incidence, the paddy fields are not in the cultivation period when sampling, but the levels of glyphosate in the soil samples in this area are still higher than those in samples from south area. This is possibly due to the high hardness of the well water in the northern area. The complexation of glyphosate with calcium ions in the water increased the amounts of glyphosate used and the exposure risk of local farmers to glyphosate, which is one of the potential environmental factors for the high incidence of CKDu in local rice farmers.

Keywords: glyphosate; chronic kidney disease of unknown etiology; complex; hard water

20世纪90年代中期,不明原因慢性肾病(CKDu)在斯里兰卡北部省份首次被发现,至今CKDu已成为该国干旱地区最重要的公共卫生问题。据估计,斯里兰卡的CKDu患病人数高达15万^[1],其病理学特点为肾小管间质性肾炎伴单核细胞浸润、肾小球硬化和肾小管性萎缩^[2]。全球范围内对CKDu病因的研究表明,该病可能是由多种因素的协同作用导致,这些因素包括化肥农药接触、有毒重金属、氟化物及高硬度水质等^[3]。

由于CKDu在当地稻农中高发,所以农药(特别是草甘膦)接触被认为是潜在的病因之一。世界卫生组织的研究表明,31.6%的CKDu患者体内的农药残留高于参考水平($2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。其中,草甘膦(PMG)和氨基甲基膦酸(AMPA)在人群($n=57$)血清及尿液中的检出率分别为65%和28%^[4]。草甘膦是世界上使用最广泛的除草剂,在环境中主要通过微生物降解为氨基甲基膦酸,AMPA与PMG化学结构类似,在环境行为和毒性上也显示出相似的特性^[5]。PMG及AMPA结构式如图1所示。虽然,美国环境保护局等认为接触草甘膦对哺乳动物的危害极低^[6],但近期研究表明,PMG在低剂量下可导致肝肾损伤^[5,7-8]。Mesnage等^[9]在对大鼠进行的长达2年的低剂量PMG暴露实验中发现,大鼠出现DNA损伤及肾脏纤维化现象。Gao等^[10]使用PMG染毒小鼠后发现,其近端肾小管上皮细胞凋亡,并产生氧化应激反应。同时,也有报道表明,服用PMG制剂的病人出现急性肾损伤症状^[11]。虽然,PMG本身在环境中半衰期较短(土壤中其半衰期为2~197 d,水中半衰期为2~91 d^[12]),但因PMG结构中含有磷酸、羧基和氨基基团,属于两性物质($\text{p}K_{\text{a}1}=2.6$, $\text{p}K_{\text{a}2}=5.6$, $\text{p}K_{\text{a}3}=10.6$),在中性和碱性条件下磷酸基团可与金属离子配位,形成稳定且不溶于水的络合物^[8],络合物的半衰期可达数年之久^[13]。特别在斯里兰卡

中北部发病区,地表及地下水硬度较高,部分地区水中 Ca^{2+} 浓度高达 $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12]。钙镁等离子可与PMG形成稳定的络合物,直接导致PMG在施用过程中部分失效,这会增加PMG使用量,并可能影响其在人体中的存在形态及其健康效应。为更好地评估PMG的环境风险及其与CKDu的相关性,有必要深入解析其络合形态并优化分析方法,同时调查其在斯里兰卡地区的污染特征。

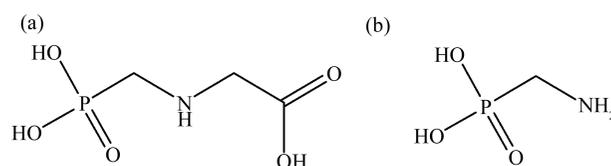


图1 草甘膦(PMG) (a)及其降解产物氨基甲基膦酸(AMPA) (b)的结构式

Fig. 1 Structures of glyphosate (PMG) (a) and its degradation product aminomethyl phosphonic acid (AMPA) (b)

目前,关于水生环境中的PMG和AMPA,国内外已有较多研究,但对于田间土壤中这2种物质的研究却很少^[14],土壤/沉积物样品中PMG和AMPA的分析通常使用碱性溶液(如 KOH 、 NaOH 、 NH_4OH 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NH}_4\text{OH}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 等)进行提取^[15-16],也有一些研究使用酸性提取液(如 H_3PO_4 ^[17-18]和 KH_2PO_4 ^[19]等)。尚没有研究解析不同pH提取液在PMG提取分析上的差异。考虑到斯里兰卡CKDu病区水质较硬、土壤中金属离子含量较高,不同pH提取条件下PMG的络合形态不同,会影响该物质的提取分析,故对比分析不同方法的优劣十分必要。另外,由于PMG与AMPA具有弱酸性、高极性和水溶性等特性且缺乏显色和荧光基团,利用色谱质谱联用仪进行分析时需要衍生化处理。液相色谱质谱分析通常采用氯甲酸-9-苄基

甲酯(FOMC-Cl)作为衍生试剂^[20-21],而气相色谱质谱分析的常用衍生试剂为三氟乙酸酐(TFAA)与四苯基乙烯(TFE)或七氟丁醇(HFB)的混合试剂^[22-24]。Freuze等^[25]利用Fmoc-Cl衍生结合液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定高盐地下水样品时,发现测定结果假阴性严重,原因为PMG在水样中形成了草甘膦-金属络合物,在衍生过程中稳定存在不发生反应,极大影响了PMG的检测准确率。

本研究将系统探究提取液pH、金属离子和衍生试剂对土壤/沉积物中PMG检测的影响,以草甘膦-钙络合物为例解析PMG的络合效应及在分析过程中的影响,并测定了斯里兰卡当地井水中的钙离子浓度。进一步优化了土壤/沉积物中PMG及AMPA的气相色谱-质谱(GC-MS)检测方法,并应用于斯里兰卡CKDu高发区的土壤和沉积物样品检测,为当地肾病的环境因子解析提供调查数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与仪器 (Reagents and instruments)

草甘膦(glyphosate)(纯度>98.0%)、氨基甲基磷酸(aminomethyl phosphonic acid)(纯度>98.0%)购自Dr. Ehrenstorfer公司(Augsburg,德国);[1,2-¹³C₂¹⁵N]草甘膦标准品([1,2-¹³C₂¹⁵N]-glyphosate)(纯度>99.0%)、三氟乙酸酐(trifluoroacetic anhydride)(纯度>99.0%)、2,2,3,3,4,4,4-七氟-1-丁醇(2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol)(纯度>98.0%)和柠檬醛(citral)(纯度>96.0%)均购自Sigma-Aldrich公司(Merck KGaA, Darmstadt,德国);乙酸乙酯(HPLC级)、甲醇(HPLC级)均购自Fisher公司(New Jersey,美国);磷酸(优级纯)、盐酸(优级纯)购自北京市通广精细化工公司;磷酸二氢钾(优级纯)、磷酸氢二钾(优级纯)和氢氧化钠(优级纯)均购自西陇化工股份有限公司;实验中溶剂用水均为超纯水(电导率18.2 MΩ·cm),Poly-Pre CAX小柱(AG 50W-X8树脂)购自上海安谱实验科技股份有限公司。

分别称取5 mg PMG和AMPA于聚乙烯塑料瓶中,加水定容至50 mL,后加入一滴盐酸酸化,配制成100 μg·mL⁻¹的储备液。等分合并后,配制成含2种物质的1 μg·mL⁻¹储备液。于0~4 °C保存,使用前加水稀释为25、50、250和500 μg·L⁻¹的系列标准溶液,于4 h内衍生化。

GCMS-QP 2010 ultra气相色谱质谱联用仪(Shimadzu, Kyoto, 日本);电感耦合等离子体质谱仪

(ICP-MS, Thermo ICP-Q, 美国);微波消解仪(CEM Mars-6, 美国);Milli-Q超纯水机(Millipore, Bedford, 美国);高速冷冻离心机(SIGMA 3-18K, SIGMA, 德国);真空冷冻干燥机(DRC-1000 程序冻干仓, EYELA, 日本);数控超声波清洗器(KQ-500DE, 昆山市超声仪器有限公司, 中国)。

1.2 土壤、沉积物及水样采集

土壤及沉积物样品于2018年8月—10月采集于斯里兰卡当地农田和水库。土壤样品采集于当地稻田,每块稻田中采样面积为30 cm×30 cm,使用五点采样法从深度约10 cm处采集5个表层土样品,并充分混合。从地表水底采集沉积物样品,土壤及沉积物样品用铝箔及自封袋密封,储存于-20 °C冰箱中。水样采集于稻田附近的水井,从井中取约50 mL水样保存于聚乙烯瓶中,于4 °C冰箱中保存。样品采集点如图2所示。

1.3 草甘膦前处理方法比较

4种方法对应的提取液分别为A^[26](0.25 mol·L⁻¹ NH₄OH+0.1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH≈10), B^[16](0.6 mol·L⁻¹ KOH, pH≈14), C^[12](0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲溶液, pH≈7); D^[14](10% H₃PO₄, pH≈1)。所有土壤及沉积物样品约取50 g冻干,随后进行研磨并过100目筛,储存于广口瓶中。处理时取0.5 g样品于10 mL离心管中加入0.5 mg·L⁻¹同位素标记的内标溶液100 μL([1,2-¹³C₂¹⁵N]-glyphosate)。然后,分别加入4种提取液A(2 mL)、B(2 mL)、C(5 mL)和D(1 mL)。A/B/D组震荡90 min, C组水浴超声3次,每次10 min。随后4组均离心10 min(3 500 r·min⁻¹),收集上清液。D组再次加入1 mL提取液重复上述操作并合并上清液。取各组提取液1 mL直接进行后续净化与衍生分析。为了比较酸化对于不同提取方法的影响,再各取1 mL提取液加入酸性调节液(16 g磷酸二氢钾+160 mL水+13.4 mL盐酸+40 mL甲醇)调节至pH=1后再进行净化与衍生检测。

Poly-Pre CAX交换柱经10 mL水活化后,加入上述提取液,随后用1 mL CAX洗脱液(160 mL水+2.7 mL盐酸+40 mL甲醇)淋洗2次,再用13 mL CAX洗脱液进行洗脱并收集洗脱溶液。所得溶液于真空冻干机冻干后加入CAX洗脱液定容至1 mL待衍生,样品于-20 °C保存。

1.4 衍生前处理和GC-MS分析

采用《植物性产品中草甘膦残留量的测定 气相色谱-质谱法》(GB/T 23750—2009)^[27]中的衍生及检

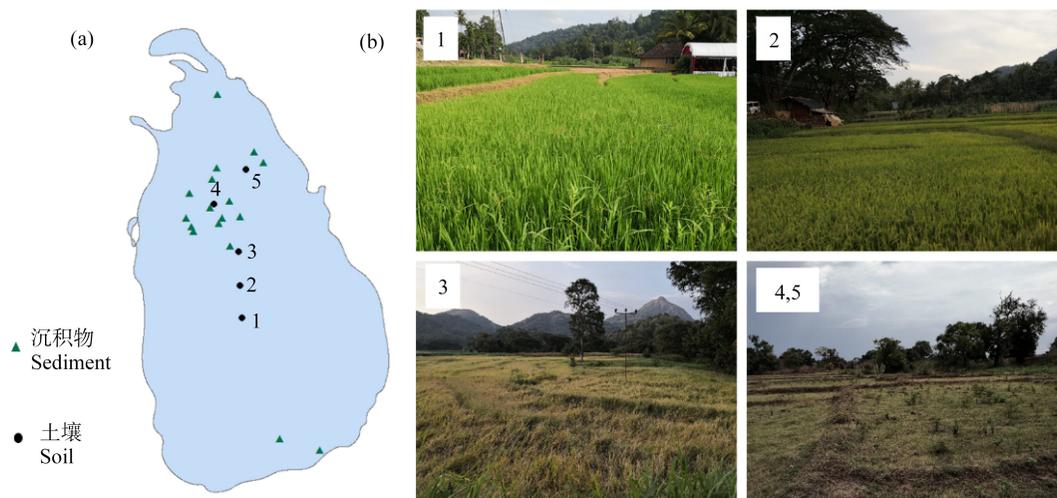


图2 沉积物和土壤样品采集点 (a) 及不同不明原因肾病 (CKDu) 发病区稻田照片 (b)

注:1、2、4和5处同时采集了井水样品。

Fig. 2 Sampling sites of sediment and soil samples (a), and pictures of paddy field in areas with different chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) incidences (b)

Note: Well water samples were also collected at sites 1, 2, 4 and 5.

测方法。衍生试剂为三氟乙酸酐(TFAA)/七氟丁醇(HFB)溶剂($V_{\text{TFAA}}/V_{\text{HFB}}=2:1$),临用前配制,并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取 1.6 mL 衍生试剂于 4 mL 样品瓶中,加盖后放入 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温冰箱中冰冻 0.5 h 后取出。用移液枪在衍生剂液面下缓慢加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 提取液(同时进行混合标准工作溶液及质量控制样品衍生)。加盖后混匀,于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中衍生 1 h (每 15 min 振摇一次)。取出后冷却至室温,氮吹至干,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 0.2% 柠檬醛-乙酸乙酯溶液(100 mL 乙酸乙酯+ $200\text{ }\mu\text{L}$ 柠檬醛,避光保存,有效期1个月),涡旋混匀,待进样。

色谱柱为HP-5MS($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$)毛细管色谱柱,进样口温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$;升温程序为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 1.5 min ,以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 1 min ,再以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$;不分流进样,进样体积 $1\text{ }\mu\text{L}$;载气为氦气(纯度 $\geq 99.999\%$),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;EI离子源(70 eV),离子源温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;接口温度 $270\text{ }^{\circ}\text{C}$;选择离子监测方式(SIM),PMG衍生物的定性离子为 $612, 584, 460$,定量离子为 611 ;AMPA衍生物的定性离子为 $372, 502$,定量离子为 446 。PMG同位素标记内标定性离子为 $615, 586$,定量离子为 614 。

1.5 草甘膦-钙络合物制备

采用Subramaniam和Hoggard^[28]的方法制备草甘膦-钙络合物。称取草甘膦 8.45 mg 溶于 $125\text{ }\mu\text{L}$ 含有 4 mg NaOH的溶液中,涡旋使其全部溶解后与

$125\text{ }\mu\text{L}$ 含有 5.5 mg CaCl_2 的溶液混合,室温下静置 24 h 。将得到的白色晶体滤出,使用超纯水清洗,干燥。分别称取 5 mg 络合物,依次加入到 0.5 mL pH为 $1, 3, 5, 7, 9, 11$ 和 13 的水溶液中(使用HCl与NaOH配制)并充分震荡混合均匀,观察记录络合物溶解情况。各取上清液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 进行上述衍生检测。随后滤出沉淀并用超纯水冲洗,干燥后称重。并重新溶于 0.5 mL pH=1的水溶液中,充分震荡混合均匀,取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 上清液进行衍生检测。

1.6 水样钙离子和草甘膦分析

取 10 mL 水样,加入 1% 硝酸酸化。使用 1% 硝酸溶液配制浓度为 $0.05\sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钙离子标准溶液,待ICP-MS检测。水样经过酸化后,直接经过Poly-Pre CAX交换柱,并最终采用衍生处理-GC-MS方法分析,具体净化、衍生和仪器分析步骤与土样分析相同。

1.7 质量保证与质量控制(QA/QC)

所有玻璃仪器均使用甲醇清洗,避免样品污染。加标实验中,土壤及沉积物样品加入PMG、AMPA的浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,为优化不同的前处理方法,每种方法进行3组平行实验。每3个样品后加入一个过程空白样品。仪器分析表明,PMG与AMPA在 $2\sim 100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好($r^2>0.999$),检出限为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。水样中钙离子在 $0.05\sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好($r^2>0.999$)。

2 结果与分析 (Results and discussion)

2.1 草甘膦与钙离子的络合特征

PMG 可与多种金属形成不溶于水的络合物,干扰其提取与分析。特别在斯里兰卡 CKDu 高发区,水质硬度较高^[13],故本实验研究了 PMG 与钙离子的络合效应。PMG 可与钙以 1:1 比例形成不溶于水的络合物,其结构式为 $\text{Ca}(\text{Hgly}) \cdot 2.25\text{H}_2\text{O}$ ^[29]。采用上文方法制得络合物后,取 5 mg 络合物溶于不同 pH 溶液中(其中含 PMG 约 3.36 mg)。一方面测定上清液中 PMG 含量,另一方面将不溶的络合物滤出,并测定其中 PMG 含量。上清液与不溶络合物中 PMG 的质量随 pH 的变化规律如图 3 所示。由图 3 可知,草甘膦-钙络合物在中性条件下溶解度最低,随酸性或碱性的增强,溶解度逐渐升高,在 $\text{pH}=1$ 或 $\text{pH}=13$ 时完全溶解。

值得注意的是,在酸性及中性条件下,PMG 在不溶络合物和上清液中的总检出量与总投入量(3.36 mg)相符。草甘膦-钙络合物沉淀通过文献方法制备而成,目前还没有该络合物的直接分析方法,采用的 TFAA-HFB 衍生分析方法只能分析游离态 PMG。因此,基于溶液中 PMG 的质量平衡分析,可以判断酸性及中性条件下,PMG 以游离态形式溶于溶液中。但是,在碱性条件下,上清液和沉淀中的 PMG 总检出量明显低于总投入量。特别在 $\text{pH}=13$ 时,溶液中无沉淀物存在,但总检出量为 1.77 mg,加

入浓盐酸酸化后,所加入的 PMG 可被完全检出。这说明,在碱性条件下($\text{pH}=13$)草甘膦-钙络合物能够完全溶解,但是大约只有 53% 的 PMG 以游离形式存在,其他的 PMG 可能与钙以络合物形式存在,但是现有的分析方法无法直接证明这部分 PMG 的具体存在形式。

2.2 斯里兰卡土壤/沉积物样品草甘膦分析的前处理方法优化

为了验证不同前提取方法对斯里兰卡土样中草甘膦的提取效率,使用 4 种不同 pH 值的提取液对当地采集的土样进行加标回收实验。土样加标稳定后(PMG 和 AMPA 加标浓度均为 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),使用不同的提取液提取, A/B 提取液为碱性($\text{pH}=10 \sim 14$), C 提取液为中性($\text{pH} \approx 7$), D 提取液为酸性($\text{pH} \approx 1$),提取液经过净化和衍生处理-GC-MS 分析,对象物质的回收率能反映该方法的可靠性。提取后的溶液分为直接衍生与酸化后衍生 2 组,探究 pH 值对提取及衍生过程的影响,结果如表 1 所示。

若对 4 种提取液进行直接衍生, A、B 和 C 这 3 组的回收率均较低,为 60% 左右。D 组的回收率最高(84.5%)。相比之下,将提取液酸化后再进行衍生,4 种方法的回收率分别为 73.8%、83.7%、87.2% 和 90.1%。这表明,PMG 在不同 pH 提取液中的存在形式不同,随溶液碱性的增加,部分 PMG 以络合形式存在,酸化解离后才可被衍生及检测。而在衍

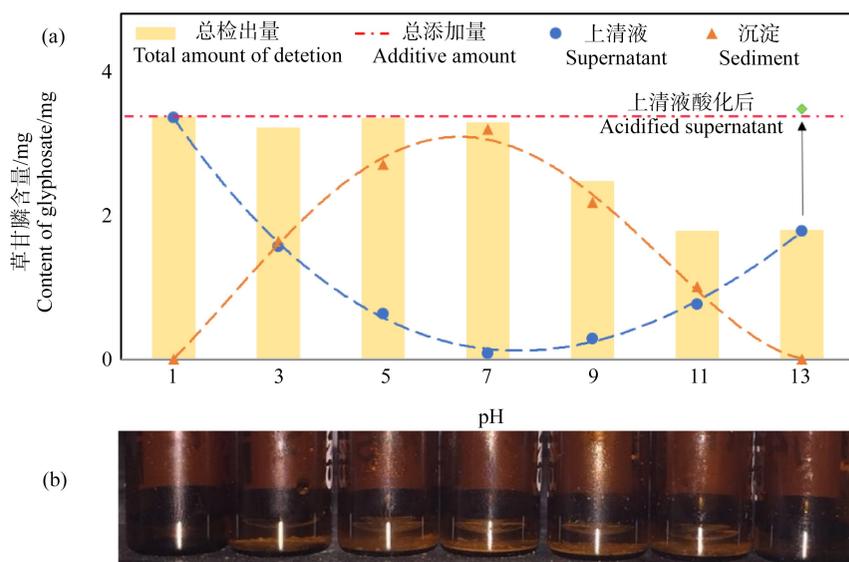


图3 不同 pH 值的水溶液中草甘膦与钙络合物的形态分布 (a) 与实际样品溶解情况 (b)

Fig. 3 Morphologies (a) and the dissolution of actual samples (b) of glyphosate-calcium complexes in water solution at different pH values

表1 4种提取方法及酸化前后加标回收率

Table 1 Recoveries of four extraction method with or without acidification before derivatization

提取液 Extraction solutions	直接衍生 Direct derivatization		酸化后衍生 Derivatization after acidification	
	PMG	AMPA	PMG	AMPA
	A	49.6% ± 3.4%	73.0% ± 1.0%	73.8% ± 7.5%
B	62.8% ± 12.2%	83.6% ± 7.6%	83.7% ± 1.3%	78.7% ± 3.6%
C	67.1% ± 10.0%	91.9% ± 1.9%	87.2% ± 7.7%	91.0% ± 5.2%
D	84.5% ± 3.4%	94.7% ± 8.0%	90.1% ± 2.0%	96.4% ± 2.1%

注:A为 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{OH}+0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}\approx 10$; B为 $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KOH}$, $\text{pH}\approx 14$; C为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲溶液, $\text{pH}\approx 7$; D为 $10\% \text{ H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH}\approx 1$ 。

Note: A, $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{OH}+0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}\approx 10$; B, $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KOH}$, $\text{pH}\approx 14$; C, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium phosphate buffer solution, $\text{pH}\approx 7$; D, $10\% \text{ H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH}\approx 1$.

生前酸化的前提下,酸、中和碱性提取液均能较好地提取出土壤中的PMG和AMPA。结合上述络合形态分析实验可知,中性环境最不利于络合物的溶解,但 $\text{pH}=7$ 时所得到的草甘膦-钙络合物的饱和溶液中PMG的浓度为 $180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,远大于添加的PMG浓度($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此,提取液 pH 虽然会影响PMG的存在形式,但不影响对环境浓度下PMG和AMPA的提取。上述结果说明,酸化步骤对于PMG衍生反应的重要性。

根据上述土样的回收率实验结果,选择B、C和D提取液对更多的当地土壤及沉积物样品进行方法筛选的实验。笔者发现使用酸性溶液对斯里兰卡土壤提取后,所得的提取液杂质含量过多,后续净化困难,而C、D提取液能够更有效地测定出当地土壤和

沉积物中的PMG和AMPA。实验结果表明,PMG实际环境浓度约为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。因此,针对环境浓度,进一步开展了针对当地土壤的低浓度($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)加标回收实验,发现C提取液组PMG回收率为 $83.4\% \pm 3.7\%$,AMPA回收率为 $87.1\% \pm 4.8\%$,而D溶液组获得的回收率显著降低,PMG的回收率为 $65.8\% \pm 11.2\%$,AMPA的回收率为 $78.3\% \pm 9.3\%$ 。根据上述结果可知,C提取液经过固相萃取净化后直接衍生分析,能够高效回收土样中的对象物质,准确测定其物质浓度,因此,最终采用C提取液进行斯里兰卡环境样品的分析。该方法提取、净化和衍生处理-GC-MS分析获得色谱图如图4所示,内标PMG在实际土壤中被有效回收,并且PMG和AMPA具有明显检测峰,无杂质干扰。

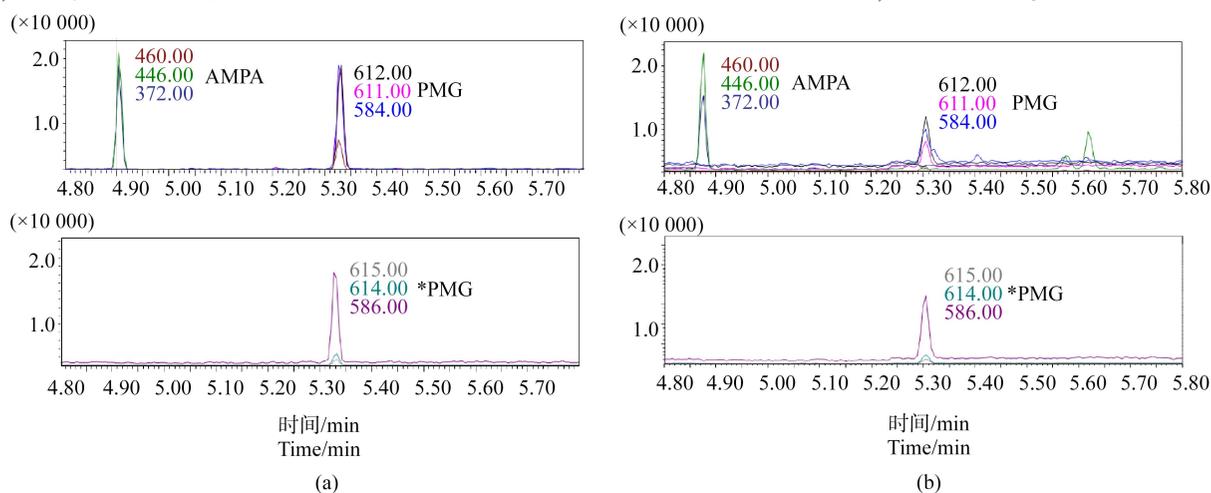


图4 草甘膦及其降解产物的标样(a)及样品检出(b)色谱图

注:*表示同位素内标。

Fig. 4 Gas chromatograms of PMG and its degradation product AMPA in standards (a) and samples (b)

Note: * represents the isotope internal standard.

2.3 草甘膦在斯里兰卡的环境浓度及分布特征

利用上述方法对斯里兰卡由南至北采集的土壤和沉积物样品进行广泛分析,检出的 PMG 和 AMPA 的浓度如表 2 所示。该国的土壤样品中广泛检出了 PMG 和 AMPA,而沉积物样品中 PMG 的含量相对较低,且无 AMPA 检出。这可能是由于金属与草甘膦形成络合物导致土壤对其的吸附能力较强,增加了 PMG 的持久性。而沉积物含水量较高且微生物较多,可更多地溶解 PMG 及 AMPA 并加速其降解。同时,对采集的当地水样也进行了分析,发现 PMG 及 AMPA 在水样中都未检出,这与该类农药在水中易于降解的机制相符,需要分析土壤和沉积物样品来调查该类物质的污染程度。

本研究中的土壤样品采自如图 2(b)所示 5 个稻田中。斯里兰卡由南至北不同地区的水稻种植情况不同。采样期间,中北部 CKDu 高发区稻田(4 和 5)

并不在耕种期内,而同时期非 CKDu 病区的南部稻田处于耕种期。在这种情况下,北部稻田土壤中 PMG 和 AMPA 含量(最高可达 $328 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)还要高于南部地区。对由南至北的水样中的钙离子进行了分析,其中,南部城市康提附近水样中钙离子浓度为 $11.4 \sim 31.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而北部阿努拉德普勒地区水样中钙离子浓度高达 $677 \sim 778 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可以看出,中北部地区井水硬度远高于南部地区,属于高硬水,因此,在施用过程中草甘膦易于与水中的钙离子络合,需要加大使用量才能获得同样的药效。也有其他研究检测了 CKDu 病区土壤中 PMG 的浓度($n=9$),范围为 $270 \sim 690 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, AMPA 浓度为 $2 \sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[2],这与本研究 PMG 的检出水平相当。对比其他国家的土壤调查,丹麦农田土壤中 PMG 和 AMPA 的平均水平分别为 $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $10.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[30],阿根廷农田土壤中 PMG 和 AMPA 的平均水

表 2 土壤样品(SO)与沉积物样品(SE)中的 PMG 和 AMPA 浓度

Table 2 Concentrations of PMG and AMPA in soil (SO) and sediment (SE) samples

样品编号 Sample number	样品量(<i>n</i>) Sample size (<i>n</i>)	东经(E)/(°) East longitude (E)/(°)	北纬(N)/(°) North latitude (N)/(°)	PMG/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	AMPA/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
SO1	3	80.6545	7.4010	159.7±120.5	257.1±119.1
SO2	3	80.6409	7.6761	83.4±112.7	109.9±119.2
SO3	2	80.6254	7.9631	101.1±37.1	239.4±70.7
SO4	3	80.4184	8.3617	253.5±62.2	427.1±102.2
SO5	2	80.6907	8.6559	13.2±58.3	130.7±126.1
SE1	1	80.3813	8.3338	ND	ND
SE2	1	80.2077	8.4592	104.5	ND
SE3	1	80.1821	8.2526	131.4	ND
SE4	1	80.2269	8.1746	88.3	ND
SE5	1	80.4847	8.2494	152.2	ND
SE6	1	80.4600	8.2080	103.3	ND
SE7	1	80.5548	8.0145	149.6	ND
SE8	1	80.2447	8.1363	ND	ND
SE9	1	80.5469	8.3896	79.6	ND
SE10	1	80.4411	8.6752	64.5	ND
SE11	1	81.3094	6.2796	66.0	ND
SE12	1	80.4018	8.5771	88.5	ND
SE13	1	80.8351	8.7219	ND	ND
SE14	1	80.7569	8.8125	70.5	ND
SE15	1	80.9717	6.3768	ND	ND
SE16	1	80.6413	8.2607	49.3	ND
SE17	1	80.4473	9.2998	ND	ND
SE18	1	80.7670	8.8247	56.1	ND

注:ND 表示未检出。

Note: ND means not detected.

平分别为 $35 \sim 1\,502 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $299 \sim 2\,256 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [11]。而这些结果与本研究的结果相似,降解产物 AMPA 的浓度要高于 PMG 本体。综上,斯里兰卡北部 CKDu 疾病高发区可能由于水质硬度高,导致当地稻田农民使用更大量的草甘膦,造成农民的高浓度 PMG 暴露,可能是 CKDu 疾病高发的因素之一。

本研究解析了草甘膦-钙络合物在不同 pH 条件下的溶解情况及存在形态,并在此基础上对土壤/沉积物样品中草甘膦类物质的分析方法进行了优化,建立了适合斯里兰卡地区土壤中 PMG 及 AMPA 的提取和衍生处理-GC-MS 分析方法。将此法应用于该地区土壤和沉积物中草甘膦类物质的调查,发现该国稻田土壤样品中能广泛检出 PMG 和 AMPA。其中,中北部 CKDu 高发区稻田虽然并未处于耕种季,但土壤中 PMG 和 AMPA 的浓度要高于南部土壤,这可能是因为北部稻田附近井水的硬度远高于南部井水,草甘膦与硬水中钙离子的络合作用导致北部稻田草甘膦的施用量显著增加,从而可能导致当地稻农的 PMG 高暴露,推测此为该地区 CKDu 疾病高发的潜在环境因素之一。

通讯作者简介:万祎(1981—),男,博士,研究员,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献(References):

- [1] Amarasiri de Silva M W. Drinking water and chronic kidney disease of unknown aetiology in Anuradhapura, Sri Lanka [J]. *Anthropology & Medicine*, 2019, 26(3): 311-327
- [2] Gunarathna S, Gunawardana B, Jayaweera M, et al. Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka [J]. *Journal of Environmental Science & Health. Part B Pesticides Food Contaminants & Agricultural Wastes*, 2018, 5(3): 1-9
- [3] Herath A S, Kawakami T, Nagasawa S, et al. Arsenic, cadmium, lead, and chromium in well water, rice, and human urine in Sri Lanka in relation to chronic kidney disease of unknown etiology [J]. *Water Health*, 2018, 16(2): 212-222
- [4] Jayatilake N, Mendis S, Maheepala P, et al. Chronic kidney disease of uncertain aetiology: Prevalence and causative factors in a developing country [J]. *BMC Nephrology*, 2013, 14: 180-184
- [5] Jönsson J, Camm R, Hall T. Removal and degradation of glyphosate in water treatment: A review [J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, 2013, 62: 395-408
- [6] Myers J P, Antoniou M N, Blumberg B, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement [J]. *Environmental Health*, 2016, 15(19): 11-23
- [7] Séralini G, Clair E, Mesnage R, et al. Republished study: Long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize [J]. *Environmental Sciences Europe*, 2014, 26(1): 14-33
- [8] Guyton K Z, Loomis D, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate [J]. *The Lancet Oncology*, 2015, 16(5): 490-491
- [9] Mesnage R, Arno M, Costanzo M, et al. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure [J]. *Environmental Health*, 2015, 14(1): 16-28
- [10] Gao H, Chen J, Ding F, et al. Activation of the N-methyl-D-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39(8): 1096-1107
- [11] Indirakshi J, Sunnesh A, Aruna M, et al. Toxic epidermal necrolysis and acute kidney injury due to glyphosate ingestion [J]. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 2017, 21(3): 167-169
- [12] Berman M C, Marino D J G, Quiroga M V, et al. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina [J]. *Chemosphere*, 2018, 200: 513-522
- [13] Jayasumana C, Gunatilake S, Senanayake P. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: Are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014, 11(2): 2125-2147
- [14] Silva V, Montanarella L, Jones A, et al. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 621: 1352-1359
- [15] Popp M, Hann S, Mentler A, et al. Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS) [J]. *Analytical and Bioan-*

- alytical Chemistry, 2008, 391(2): 695-699
- [16] Koskinen W C, Shankani L E J, Hall K E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil [J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(3): 423-432
- [17] Marek L E J, Koskinen W C. Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(7): 1158-1164
- [18] de Amarante Júnior O P, dos Santos T C R, Brito N M, et al. Methods of extraction and determination of the herbicide glyphosate: compact revision [J]. *Química Nova*, 2002, 25: 420-428
- [19] Botero-Coy A M, Ibáñez M, Sancho J V, et al. Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 13(13): 157-165
- [20] Scribner E A, Battaglin W A, Dietze J E, et al. Reconnaissance data for glyphosate, other selected herbicides, their degradation products, and antibiotics in 51 streams in nine Midwestern States [EB/OL]. (2003-01-01) [2020-02-05]. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/of03217.2003>
- [21] Hidalgo C, Rios C, Hidalgo M, et al. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1035(1): 153-157
- [22] Royer A, Beguin S, Tabet J C, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(16): 3826-3832
- [23] Hu J Y, Chen C L, Li J Z. A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus [J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 63(4): 371-375
- [24] Bergström L, Börjesson E, Stenström J. Laboratory and lysimeter studies of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a sand and a clay soil [J]. *Journal of Environment Quality*, 2011, 40(1): 98-108
- [25] Freuze I, Jadas-Hecart A, Royer A, et al. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1175(2): 197-206
- [26] Alferness P L, Iwata Y. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soil, plant and animal matrixes, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(12): 2751-2759
- [27] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23750—2009 植物性产品中草甘膦残留量的测定 气相色谱-质谱法[S]. 北京: 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2009
- [28] Subramaniam V, Hoggard P E. Metal complexes of glyphosate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36(6): 1326-1329
- [29] Coutinho C F B, Mazo L H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: Revisão [J]. *Química Nova*, 2005, 28(6): 1038-1040
- [30] Simonsen L, Fomsgaard I S, Svensmark B, et al. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil [J]. *Journal of Environmental Science and Health-Part B: Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2008, 43(5): 365-375
- [31] Aparicio V C, De Gerónimo E, Marino D, et al. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins [J]. *Chemosphere*, 2013, 93(9): 1866-1873 ◆