

团 体 标 准

T/JSSES XXXX—XXXX

土壤环境质量 土壤中全氟辛酸和全氟辛烷 磺酸生物有效性测定 胃肠模拟法

Soil environmental quality —Method for Measuring Bioavailability of PFOA and
PFOS in Soil Gastrointestinal simulation method

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

江苏省环境科学学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 干扰消除 1

6 试剂和材料 1

 6.1 试剂 2

 6.2 试剂配制 2

 6.3 目标分析物标准溶液 2

 6.4 模拟胃液和肠液的配制 2

7 仪器和设备 2

 7.1 仪器 2

 7.2 耗材 3

8 样品制备 3

 8.1 样品采集和保存 3

 8.2 样品的制备 3

9 生物有效性测定步骤 3

 9.1 土壤样品中全氟化合物提取 3

 9.2 胃肠液中全氟化合物提取 3

 9.3 仪器分析 4

 9.4 生物有效性计算 4

10 精密度 4

11 质量保证和质量控制 4

 11.1 校准 4

 11.2 空白试验 4

 11.3 平行试验 5

12 废物处理 5

附录 A（资料性） 仿生提取方法-小鼠活体实验结果相关性 6

附录 B（资料性） 胃液和肠液主要成分和培养条件 8

附录 C（资料性） 精密度验证 9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省环境科学学会提出并归口。

本文件起草单位：南京大学、江苏省环境工程技术有限公司、江阴秋毫检测有限公司。

本文件主要起草人：崔昕毅、曲常胜、周鹏飞、丁亮、聂漂、丁明皓、潘晓凤、周海峰、方骏骅、谷成、历红波、孔艺。

土壤环境质量 土壤中全氟辛酸和全氟辛烷磺酸生物有效性测定 胃肠模拟法

1 范围

本文件规定了胃肠模拟提取测定土壤中全氟化合物生物有效性的标准方法。

本文件适用于土壤中最常见的两种全氟化合物生物有效性的测定，目标分析物包括：全氟辛酸(CAS NO. 335-67-1)；全氟辛烷磺酸(CAS NO. 1763-23-1)。

土壤中其他全氟化合物的生物有效性的测定经过验证后可参考使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

DB 32/T 4004-2021 水质 17 种全氟化合物的测定 高效液相色谱串联质谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

目标分析物

全氟辛酸（PFOA，CAS：335-67-1）和全氟辛烷磺酸（PFOS，CAS：1763-23-1）两种物质。

3.2

胃肠模拟提取

根据人体胃液和肠液成分，人工配制胃液和肠液，在接近人体胃肠道消化系统的条件下，模拟人体胃肠道消化吸收污染物过程。

3.3

生物有效性 bioavailability (BA)

土壤被摄入后，可被人体吸收的污染物的量占土壤中污染物总量的百分比。

4 原理

仿生提取方法提取土壤中的全氟化合物，模拟了全氟化合物从土壤解吸至消化液的过程。模拟结束后测定肠液中的全氟化合物质量占土壤中总全氟化合物质量的比例，即为土壤中全氟化合物的生物有效性。

5 干扰消除

聚四氟乙烯等含氟塑料可能含有目标化合物，造成干扰。在样品保存和制备过程中，样品瓶、瓶盖、量杯、离心管、滴管等器具应使用聚丙烯塑料材质，不应使用含氟塑料或玻璃材质。液相色谱溶剂管路可能引入目标化合物，可使用聚丙烯材质或者不锈钢材质管路以消除干扰，也可在仪器中使用捕集柱以避免干扰。

6 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为GB/T 6682规定的一级水。

6.1 试剂

- a) 盐酸 (HCl)：分析纯或更高纯度。
- b) 乙腈 (CH₃CN)：分析纯或更高纯度。
- c) 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。
- d) 乙酸铵 (CH₃COONH₄)：色谱纯。
- e) 氮气 (N₂)：纯度≥99.99%。
- f) 氯化钠 (NaCl)：分析纯或更高纯度。
- g) 乳酸。
- h) 冰醋酸。
- i) 胃蛋白酶。
- j) 牛胆盐。
- k) 胰液素。
- l) 苹果酸钠。
- m) 柠檬酸钠。

6.2 试剂配制

6.2.1 盐酸-乙腈溶液

吸取盐酸0.54 mL (6.1.1)，用乙腈 (6.1.2) 定容至100 mL。

6.2.2 乙酸铵水溶液

称取乙酸铵0.1925 g (6.1.4)，用一级水 (GB/T 6682) 定容至500 mL。

6.2.3 甲醇水溶液

量取20 mL甲醇 (6.1.3)，用一级水 (GB/T 6682) 定容至40 mL。

6.3 目标分析物标准溶液

6.3.1 标准储备液：ρ=10000 mg/L

用甲醇 (6.1.3) 稀释单物质 (即PFOA和PFOS) 标准储备液配制成两种物质的混合标准储备液，PFOA和PFOS的浓度分别为10 g/L。使用棕色钳口瓶密封保存，-20℃存放或参照制造商产品说明。使用时应恢复至室温，并摇匀。

6.3.2 标准使用液

用甲醇 (6.1.3) 稀释标准储备液 (6.3.1) 配制成标准使用液。按实际需要浓度进行混合配制。使用液使用棕色钳口瓶密封保存，-20℃存放或参照制造商产品说明。使用时应恢复至室温，并摇匀。存放期限30天。

6.4 模拟胃液和肠液的配制

6.4.1 胃液配制

按附录B准确称取胃液所需成分，加入超纯水定容，再用1 mol/L的盐酸或者NaOH调节pH至2.5±0.05。

6.4.2 胃液转化为肠液

在提取步骤中，将胃液pH调节至7.0±0.05，按附录B准确称取肠液所需成分，加入胃液体系中将胃液转化为肠液。

7 仪器和设备

7.1 仪器

- a) 氮吹仪,或能达到浓缩样品至近干的旋转蒸发仪。
- b) 高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI),具备梯度洗脱和多反应监测功能。
- c) 超声波清洗机,工作条件为 25 kHz 40%功率。
- d) 高速多管涡旋混合仪。
- e) 低速离心机(转速 ≤ 4000 rpm)。
- f) 分析天平,精度为 ± 0.0001 g。

7.2 耗材

7.2.1 色谱柱:填料粒径为 1.8 μm 、柱长 100 mm、内径 3.0 mm 的 C18 反相色谱柱或其它性能相近的色谱柱。

7.2.2 针式过滤器:0.22 μm 孔径聚四氟乙烯滤膜。

7.2.3 聚丙烯离心管:4 mL、15 mL。

8 样品制备

8.1 样品采集和保存

土壤样品按照HJ/T 166的相关要求进行采集和保存。样品采集、运输和保存过程应避免沾污和待测物质损失。

8.2 样品的制备

除去样品中的异物(枝棒、叶片、石子等),按照HJ/T 166的要求,将采集的样品在实验室中风干、破碎、过60目筛,保存备用。样品的制备过程应避免沾污和待测物质损失,避免日光直接照射及样品间的交叉污染。

9 生物有效性测定步骤

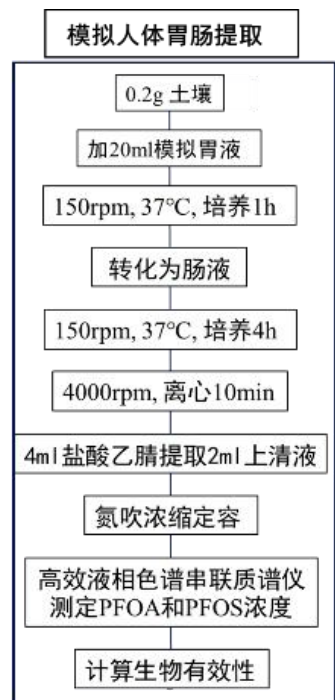
9.1 土壤样品中全氟化合物提取

准确称取0.5 g(精确至0.1 mg)的待测样品于聚丙烯离心管中,依次加入1 mL一级水(GB/T 6682)、4 mL盐酸乙腈(6.2.1),在高速多管涡旋混合仪上涡旋10 min,超声处理5 min,添加1 g氯化钠(6.1.6)后再次涡旋10 min,在4000 r/min条件下离心10 min,吸取2 mL上清液于4 mL离心管中在氮气浓缩仪上吹至尽干。加入0.1 mL甲醇水溶液(6.2.3),超声复溶样品后,过0.22 μm 孔径聚丙烯滤膜,上机测定,结果见附录A。

注:视样品实际情况,试样定容体积可适当调整。

9.2 胃肠液中全氟化合物提取

准确称取0.2 g土壤样品(8.2)置于聚丙烯离心管中,加入20 mL事先预热至37℃的模拟胃液($\text{pH} = 2.0 \pm 0.05$)(6.4.1),置于37℃恒温振荡培养箱中以150 r/min的转速避光振荡培养1 h。模拟胃相培养结束后,按照6.4.2将模拟胃液转化成模拟肠液在恒温振荡培养箱中继续避光培养4 h。肠液阶段结束后,将上层悬浊液在4000 r/min条件下离心10 min,吸取2 mL上清液于15 mL离心管中后加入4 mL盐酸乙腈(6.2.1),在高速多管涡旋混合仪上涡旋10 min,超声处理10 min,添加1 g氯化钠(6.1.6)后再次涡旋10 min,在4000 r/min条件下离心10 min,吸取2 mL上清液于4 mL离心管中在氮气浓缩仪上吹至尽干。加入0.1 mL甲醇水溶液(6.2.3),超声复溶样品后,过0.22 μm 孔径聚丙烯滤膜,上机测定。



9.3 仪器分析

仪器分析条件参考DB 32/T 4004-2021，使用高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪测定10.1和10.2定容后的样品中全氟化合物的含量。PFOA，PFOS的检出下限分别为538 ng/kg，123 ng/kg。在土壤中添加浓度20~100 μg/kg范围内，回收率为89%~122%，相对标准偏差为1%~13%。在肠液中添加浓度2~10 μg/kg范围内，回收率为93%~111%，相对标准偏差为1%~10%。

9.4 生物有效性计算

土壤中全氟化合物的生物有效性（BA）以（%）表示，按照公式1计算：

$$BA = (M/T) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

BA：生物有效性（%）；

M：模拟肠液中溶出全氟化合物的质量（μg），等于全氟化合物在肠液中的浓度乘以肠液体积20 mL；

T：土壤试样中全氟化合物的质量（μg），等于土壤中全氟化合物浓度乘以土壤样品量0.2 g。

10 精密度

在95%置信区间下，同一实验室、同一操作者使用相同设备，按本文件的测试方法，在短时间内对同一样品相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的10%，结果见附录C。

11 质量保证和质量控制

11.1 校准

每批样品应建立标准曲线，样点数≥ 5，相关系数应≥ 0.99，否则需重新绘制标准曲线。

每10个样品或每批次（≤10个样品/批）应测定一个工作曲线中间浓度点标准溶液，其测定结果与该点浓度的相对误差应在±20%之内。

11.2 空白试验

每10个样品或每批次（≤10个样品/批）至少测定一个实验室空白样，其测定结果应低于方法检出限。

11.3 平行试验

生物有效性测定中应使用至少2个平行样品，平行样测定结果相对偏差应小于20%。

每10个样品或每批次（≤10个样品/批）至少测定一个平行样。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的20%。

12 废物处理

实验中产生的废物应集中收集，分类保存，并做好相应标识，委托有资质的单位进行处理。

附录 A

(资料性)

仿生提取方法-小鼠活体实验结果相关性

当仿生提取方法-小鼠活体实验结果之间的线性相关性系数 $r^2 \geq 0.6$ ，斜率在0.8到1.2之间时，认为体外方法能够代替动物实验，用于测定污染物生物有效性。本研究选择8个全氟化合物污染土壤，分别利用仿生提取方法测定生物有效性，以及利用小鼠实验测定的相对生物有效性，并对体外生物有效性和活体相对生物有效性进行相关性分析。体外生物有效性结果与小鼠测试结果具有显著的相关性，其线性相关系数和斜率符合要求（即 $r^2 \geq 0.6$ ，斜率在0.8到1.2之间），说明了仿生提取方法测定污染土壤中全氟化合物生物有效性的准确性。

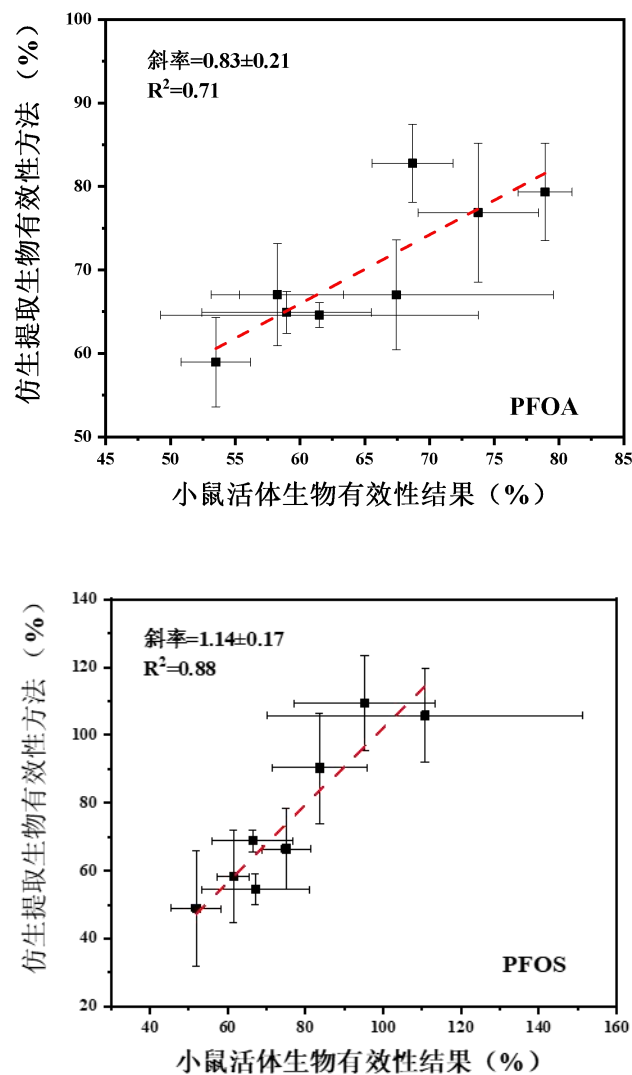


图 A.1 仿生提取方法测定生物有效性结果与小鼠活体生物有效性结果相关性分析

表 A.1 全氟化合物污染土壤的理化性质和浓度信息

土壤样品	Toc (%)	pH	全氟辛酸浓度 (ng/g)	全氟辛烷磺酸浓度 (ng/g)
Soil #1	0.41	4.88	142.89	122.15
Soil #2	0.48	4.74	156.14	120.225
Soil #3	0.43	9.11	159.43	120.99
Soil #4	0.64	8.43	142.35	124.35
Soil #5	0.69	8.85	719.59	678.95
Soil #6	0.69	8.88	142.20	124.66
Soil #7	0.70	9.07	145.08	121.70
Soil #8	2.04	8.62	829.45	725.79

附 录 B
(资料性)

胃液和肠液主要成分和培养条件

表 B.1 胃液和肠液主要成分和培养条件

	中文（英文）名	培养时间	pH	固液比
胃液	胃蛋白酶（Pepsin）（1.25 g/L）	1 h	2.5±0.05	1:100
	苹果酸钠（sodium malate）（0.50 g/L）			
	柠檬酸钠（tri-sodium citrate）（0.50 g/L）			
	乳酸（lactic acid）（420 μL/L）			
	冰醋酸（glacial acetic acid）（500 μL/L）			
肠液	牛胆盐（bile salts）（1.78 g/L）	4 h	7.0±0.05	1:100
	胰液素（Pancreatin）（0.50 g/L）			

注：培养温度为37℃

附 录 C
(资料性)
精密度验证

表 C.1 仿生提取测定土壤中全氟化合物生物有效性的标准方法精密度验证

土壤样品	PFOA小鼠活体生物有效性	相对标准偏差	PFOA仿生提取生物有效性	相对标准偏差
	(%)	(%)	(%)	(%)
Soil #1	73.75	4.65	76.86	8.34
Soil #2	67.43	12.13	67.02	6.58
Soil #3	58.97	6.54	64.92	2.51
Soil #4	78.92	2.09	79.34	5.83
Soil #5	53.50	2.68	58.96	5.35
Soil #6	68.69	3.12	82.77	4.68
Soil #7	61.49	12.26	64.59	1.50
Soil #8	58.25	5.11	67.04	6.11
土壤样品	PFOS 小鼠活体生物有效性	相对标准偏差	PFOS 仿生提取生物有效性	相对标准偏差
	(%)	(%)	(%)	(%)
Soil #1	83.64	12.28	90.29	16.26
Soil #2	95.24	18.21	109.39	14.15
Soil #3	67.13	13.94	54.53	4.59
Soil #4	110.78	40.57	105.76	13.68
Soil #5	61.51	4.10	58.36	13.79
Soil #6	75.00	6.20	66.47	12.04
Soil #7	66.43	10.35	68.90	3.20
Soil #8	51.88	6.33	48.96	17.12

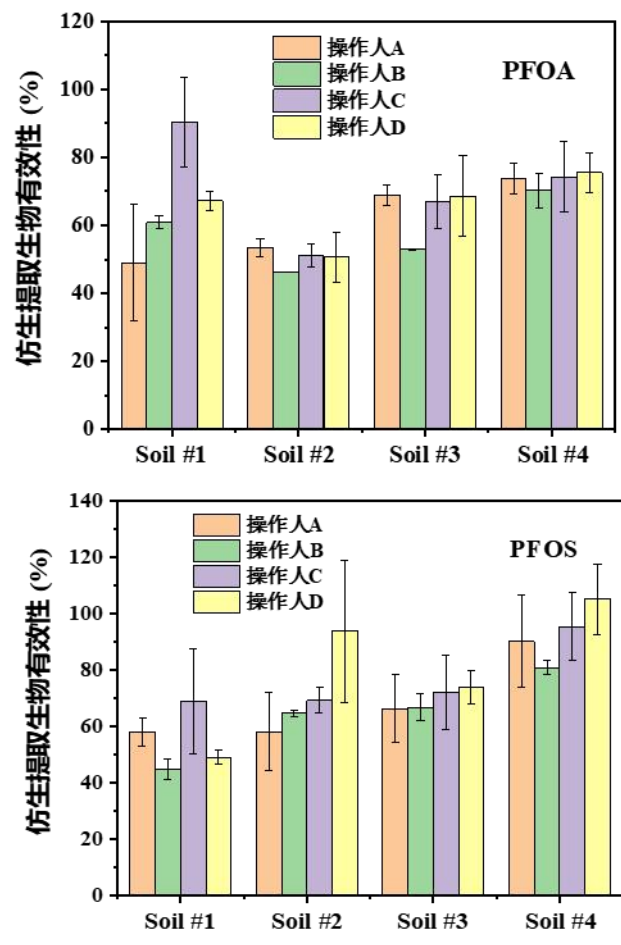


图 C. 1 不同测试者使用本标准方法提取 4 种土壤中全氟辛酸和全氟辛烷磺酸的生物有效性