

团 体 标 准

T/JSSES XXXX—XXXX

土壤环境质量 建设用地污染土壤铅生物有 效性的测定 模拟胃液提取法

Soil environmental quality—Determination of bioavailability of lead in contaminated
site soil Extracted with Simulated Human Gastric Fluid

（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 I

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 2

6 试剂和材料 2

 6.1 土壤样品 2

 6.2 试剂 2

 6.3 试剂配制 3

 6.4 标准溶液 3

7 仪器和设备 3

8 生物有效性测定 3

9 仪器分析 4

10 结果计算与表示 4

11 质量保证和质量控制 4

 11.1 校准 4

 11.2 空白试验 5

 11.3 平行试验 5

 11.4 基质加标 5

 11.5 动物实验验证 5

 11.6 标准物质 5

12 废物处理 5

附录 A（资料性） 模拟唾液和胃液成分和溶液 PH 值 6

附录 B（资料性） 利用模拟人体胃液测定土壤铅生物有效性与小鼠实验测试结果的相关性 7

附录 C（资料性） 污染土壤铅生物有效性 9

附录 D（资料性） 标准土壤物质铅生物有效性（实验室内部可重复性） 11

附录 E（资料性） 标准土壤物质铅生物有效性（实验室间可重复性） 12

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。

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：历红波、曲常胜、林欣颖、薛荣跃、罗浩、张强、刘海、韩娇娇、缪翔、韦巍、孔艺、崔欣毅、谷成。

土壤环境质量 建设用地污染土壤铅生物有效性的测定 模拟胃液提取法

1 范围

本文件规定了利用人体模拟胃液提取法测定污染土壤中铅生物有效性的方法。

本文件适用于建设用地污染土壤中铅生物有效性的测定,描述的测定方法也可用于其他类型污染土壤铅人体生物有效性的测定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 32722 土壤质量 土壤样品长期和短期保存指南

GB/T 36200 土壤质量 城市及工业场地土壤污染调查方法指南

GB 36600 土壤环境质量 建设用地土壤污染风险管控标准(试行)

HJ 25.1 建设用地土壤污染状况调查技术导则

HJ 25.2 建设用地土壤污染风险管控和修复监测技术导则

HJ 25.3 建设用地土壤污染风险评估技术导则

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

HJ 787 固体废物 铅和镉的测定 石墨炉原子吸收分光光度法

HJ 803 土壤和沉积物 12种金属元素的测定 王水提取-电感耦合等离子体质谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

建设用地

指建造建筑物、构筑物的土地,包括城乡住宅和公共设施用地、工矿用地、交通水利设施用地、旅游用地、军事设施用地等。

[来源: GB 36600]

3.2

污染土壤 contaminated soil

对潜在建设用地土壤进行调查和风险评估后,确认污染危害超过人体健康可接受风险水平的土壤。

[来源: GB/T 36200、GB 36600、HJ 25.1、HJ 25.2、HJ 25.3]

3.3

生物有效性 bioavailability

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。

3.4

模拟胃液提取法 simulated gastric fluid extraction method

利用模拟人体胃液对土壤污染物进行提取,测定从土壤中溶解至模拟胃液中的污染物的量占土壤中污染物总量的百分比的方法。

4 原理

根据人体唾液和胃液的成份以及pH环境，利用HCl、无机盐、消化酶等配制模拟唾液和胃液，连续使用模拟唾液和胃液对土壤中铅进行提取，分析提取液中铅的含量，计算土壤中可提取部分铅含量占总含量的百分比，进而得到土壤通过口腔摄入这一暴露途径后铅的人体生物有效性。

5 干扰消除

金属制品可能含有目标化合物，造成干扰。在土壤样品采集、保存和制备过程中，应避免使用和接触金属材质器材。在样品提取、保存和测试过程中，样品瓶、量杯、离心管、滴管等器具应使用塑料或玻璃材质。所有塑料和玻璃器皿在使用前应清洗干净。

6 试剂和材料

6.1 土壤样品

6.1.1 土壤采集和保存

根据HJ/T 166、HJ 25.2、GB/T 32722的相关要求进行土壤样品采集和保存。采样所使用工具为非金属制品，使用前应清洗干净，应避开暴雨等特殊天气时间取样，采集的样品应具有代表性并做好记录。采集人员应接受过专业培训和熟悉采样流程，样品保存在洁净的塑料袋或其他洁净的存储容器中封存，土壤采集和保存过程中应保证土壤不被二次污染，运输过程中应注意密封和避光，应尽快运回实验室预处理。

6.1.2 土壤样品预处理

将土壤样品均匀铺展于干净牛皮纸上，剔除石块、植物等异物，在室外阴凉处自然风干。风干土壤利用木棒压碎后过60目尼龙网筛（粒径小于250 μm），装入塑料袋保存，待用。建议使用尼龙网筛。样品应在使用前彻底混合，以确保均质化。

注：也可以采用冷冻干燥方式除去土壤水分，冻干后的土壤压碎、过筛（60目）保存。

6.2 试剂

除非另有说明，本方法所用化学试剂均为分析纯或更高纯度，生物试剂为生物试剂纯度，实验用水为GB/T 6682规定的一级水。下列为本方法所用试剂：

- a) 硝酸（HNO₃）。
- b) 30%过氧化氢（H₂O₂）。
- c) 氯化钾（KCl）。
- d) 磷酸二氢钠（NaH₂PO₄）。
- e) 硫酸钠（Na₂SO₄）。
- f) 氯化钠（NaCl）。
- g) 氯化钙（CaCl₂）。
- h) 氯化铵（NH₄Cl）。
- i) 硫氰化钾（KSCN）。
- j) 葡萄糖（C₆H₁₂O₆）。
- k) 氢氧化钠（NaOH）。
- l) 盐酸（HCl）。
- m) 胃蛋白酶（pepsine）。
- n) α-淀粉酶（α-Amylase）。
- o) 尿素（CO(NH₂)₂）。
- p) 尿酸（C₅H₄N₄O₃）。
- q) 葡萄糖醛酸（C₆H₁₀O₇）。
- r) 牛血清蛋白（bovine albumin）。
- s) 盐酸葡萄糖胺（C₆H₁₄NO₅Cl）。
- t) 粘蛋白（mucin）。

6.3 试剂配制

模拟唾液的配制：按附录表 A.1 准确称取模拟唾液所需药品，溶于一级水，使用容量瓶定容。使用分析纯或更高纯度的浓盐酸或浓氢氧化钠溶液在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下调节至 pH 至 6.50 ± 0.50 。

模拟胃液的配制：按附录表 A.1 准确称取模拟胃液所需药品，溶于一级水，使用容量瓶定容。使用分析纯或更高纯度的浓盐酸或浓氢氧化钠溶液在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下调节至 pH 至 1.10 ± 0.10 。

注：模拟唾液和胃液现用现配。

6.4 标准溶液

可直接购买经国家认证并授予标准物质证书的铅单物质标准贮备液。

7 仪器和设备

下列为本方法所用仪器和设备：

- a) pH 计。
- b) 分析天平：精度为 0.1 mg。
- c) 恒温振荡培养箱：温度稳定 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- d) 离心机：离心力可达 4500 r/min。
- e) 电感耦合等离子体质谱仪或电感耦合等离子体质谱法或石墨炉原子吸收分光光度计。
- f) 针式过滤器：0.45 μm 孔径聚醚砜滤膜。
- g) 聚丙烯离心管：50 mL。
- h) 非金属筛：60 目。

8 生物有效性测定

按照图1规定的流程开展模拟胃液提取。准确称取0.6 g土壤（过60目）至50 mL聚丙烯离心管中，精确到0.0010 g，每个样品称取三份。应注意确保静电不会导致土壤颗粒粘附在离心管口的唇缘或外螺纹上。准确加入9.0 mL 模拟唾液溶液，手动混合10 s后加入13.5 mL 模拟胃液溶液。盖上瓶盖，然后手动摇动或倒置，以确保溶液不会泄漏，并且瓶子底部没有土壤结块。在 37°C 恒温震荡器中以150 r/min振荡提取1 h，期间每隔15分钟利用pH计定时监测溶液 pH，通过添加适量盐酸使溶液pH值保持在1.2-1.5之间。提取结束后，三份试样经4500 g离心力离心15 min后，小心吸取上清液， 4°C 保存待测定。

注：胃液提取过程中注意保持土壤溶液pH值的稳定。

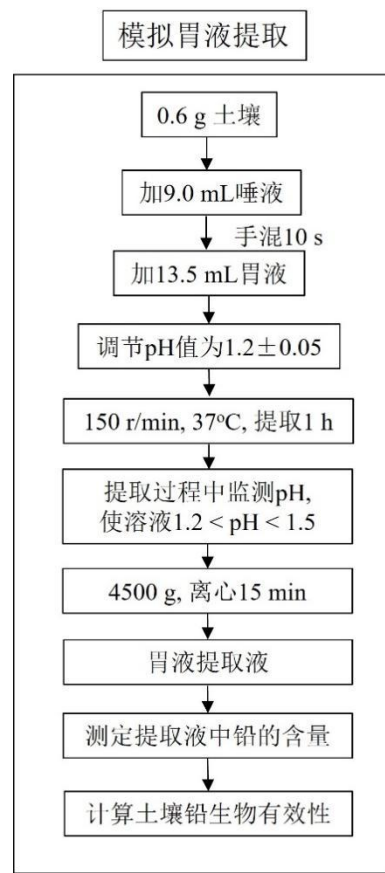


图 1 利用模拟胃液测定铅生物有效性的概括性示意图

9 仪器分析

制备至少 6 个浓度梯度的标准铅溶液，铅浓度分别为 0、0.5、1、2、5、10 和 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ （参考浓度，可根据实验条件灵活配制标准系列，但应保证样品测试浓度落在标准系列范围内），利用电感耦合等离子体质谱仪分析仪器响应信号，绘制标准曲线。

利用 0.1 M HNO_3 稀释土壤胃液提取液若干倍，利用电感耦合等离子体质谱仪测定胃液分析胃液铅的响应信号，利用标准曲线，计算土壤胃液提取液中铅的含量。

注：也可利用 HJ 803 规定的电感耦合等离子质谱仪、HJ 787 规定的石墨炉原子吸收分光光度计进行仪器分析。

10 结果计算与表示

土壤中铅的生物有效性（Bioavailability, BA）以（%）表示，下列公式计算。

$$\text{BA} = (\text{M}/\text{T}) \times 100\%$$

式中：

BA——生物有效性（%）；

M——土壤经胃液提取后溶解在胃液中铅的含量（ $\mu\text{g/g}$ ）；

T——用于提取的土壤样品中铅的总含量（ $\mu\text{g/g}$ ），参考 HJ 803 进行测定。

计算结果表示到小数点后两位。

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，相关系数应 ≥ 0.99 （标准溶液样点数为6个），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 $\pm 5\%$ 之内。

11.2 空白试验

对每10个土壤样品或每批次（ ≤ 10 个样品/批）进行模拟胃液提取时，至少包含一个实验室空白样，其测定结果应低于方法检出限。

11.3 平行试验

每个土壤样品需平行提取和测定三次，三次平行提取和测定得到的铅生物有效性的相对标准偏差应 $< 10\%$ （如附录表C.1）。

11.4 基质加标

对每10个土壤样品或每批次（ ≤ 10 个样品/批）进行模拟胃液提取时，至少包含一个基质加标，提取和测试后基质加标回收率应在90–100%范围间。

11.5 动物实验验证

建议参考附录B开展小鼠实验，测定土壤样品中铅的相对生物有效性（如附录表C.2）。建立利用该标准规定的模拟胃液提取法和小鼠实验测定的12个污染土壤样品铅生物有效性间的相关关系（如图B.1），验证模拟胃液提取方法能够代替小鼠实验用于测定污染土壤中铅生物有效性的适用性。

11.6 标准物质

对每10个土壤样品或每批次（ ≤ 10 个样品/批）进行模拟胃液提取时，至少测定附录表D.1中一个标准土壤物质中铅的生物有效性，其测定结果与推荐值（附录表D.2和表E.1）的相对误差应在 $\pm 10\%$ 之内。

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)
模拟唾液和胃液成分和溶液 pH 值

表 A. 1 配置 500 mL 模拟唾液和胃液所需要的各种成分的量

	成分	单位	唾液 (S)	胃液 (G)
无机成分	KCl	mg	448	412
	NaH ₂ PO ₄	mg	444	133
	KSCN	mg	100	
	Na ₂ SO ₄	mg	285	
	NaCl	mg	149	1376
	CaCl ₂	mg		200
	NH ₄ Cl	mg		153
	NaOH (1 M)	mL	0.9	
	HCl (37%)	mL		4.15
有机成分	尿素	mg	100	42.5
	葡萄糖	mg		325
	葡萄糖醛酸	mg		10
	盐酸葡萄糖胺	mg		165
酶	α -淀粉酶	mg	72.5	
	粘蛋白	mg	25	1500
	尿酸	mg	7.5	
	牛血清蛋白	mg		500
	胃蛋白酶	mg		500
pH 值			6.5±0.5	1.1±0.1

附录 B

(资料性)

利用模拟人体胃液测定土壤铅生物有效性与小鼠实验测试结果的相关性

当模拟胃液提取法与动物如小鼠实验测定的生物有效性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，认为该模拟胃液提取法能够代替动物实验，可以用于测定污染物的生物有效性。本标准以江苏省句容某化工厂区搬迁遗留厂区为研究示范对象，采集了 12 个铅污染土壤样品，土壤性质见附录 C.1。利用该标准规定的模拟胃液提取法测定了土壤铅的生物有效性，发现除个别样品铅生物有效性测试结果的相对标准偏差高于 10% 外，多数样品铅生物有效性测试具有较好的精密度，相对标准偏差 < 10% (附录表 C.1)。

此外，开展小鼠暴露实验测试土壤铅的生物有效性。首先，将每个土壤以 2% 质量比混入小鼠标准化饲料 AIN-93G 中，将醋酸铅（生物有效性参比物质）按照铅浓度 10、50、100 mg kg⁻¹ 也混入 AIN-93G 饲料中。饲料制备好后，采购品种为 Balb/c、体重为 20 ± 2 g 的雌性小鼠，在光照/黑夜各 12 小时、温度为 20–22℃、湿度为 50% 的动物放饲养和驯化 3 天后，开始铅污染土壤和醋酸铅暴露。将混有土壤和醋酸铅的饲料定量提供给小鼠，每个土壤或醋酸铅饲料的暴露设置 3 只平行小鼠，小鼠单只饲养在独立的饲养笼。定量提供饲料供小鼠自由进食 10 天后，采集小鼠肝脏和肾脏样品，冷冻干燥后，利用 1:1 硝酸和 30% 的过氧化氢进行消解肝脏和肾脏样品，使用电感耦合等离子体质谱仪测定消解液中铅的含量，计算得到小鼠肝脏和肾脏样品中铅的质量含量。对每只小鼠，基于暴露前饲料的提供量和暴露后饲料的剩余量，记录 10 天内饲料的总摄入量，并根据饲料中铅的含量，计算得到铅的日均暴露剂量。对比土壤铅和醋酸铅暴露后，小鼠肝脏和肾脏样品中铅的积累含量，计算得到土壤中铅的相对生物有效性（公式 1）。

$$\text{土壤铅相对生物有效性 (\%)} = \left(\frac{(\text{liver} + \text{kidney})_{\text{soil}}}{\text{Pb dose}_{\text{soil}}} \times \frac{\text{Pb dose}_{\text{Pb acetate}}}{(\text{liver} + \text{kidney})_{\text{Pb acetate}}} \right) \times 100\%, \quad [1]$$

式中，(liver+kidney)_{soil} 和 (liver+kidney)_{Pb acetate} 为土壤铅和醋酸铅暴露 10 天后铅在小鼠肝脏和肾脏中积累含量的加和 (μg Pb g⁻¹)；Pb dose_{soil} 和 Pb dose_{Pb acetate} 为小鼠摄入土壤铅和醋酸铅饲料导致的铅日均暴露剂量 (μg Pb kg⁻¹ 体重 d⁻¹)。利用上述小鼠实验，12 个铅污染土壤样品铅的相对生物有效性见附录表 C.2。

利用该标准规定的模拟胃液提取法和上述小鼠实验测定了 12 个污染土壤样品铅的生物有效性后，对两者进行相关性分析，见图 B.1。采用胃液提取的测定结果与小鼠测试结果具有显著的相关性，线性相关系数即 $R^2 \geq 0.6$ ，说明了本方法规定的模拟胃液提取方法能够代替小鼠实验，可以用于测定污染土壤中铅的生物有效性。

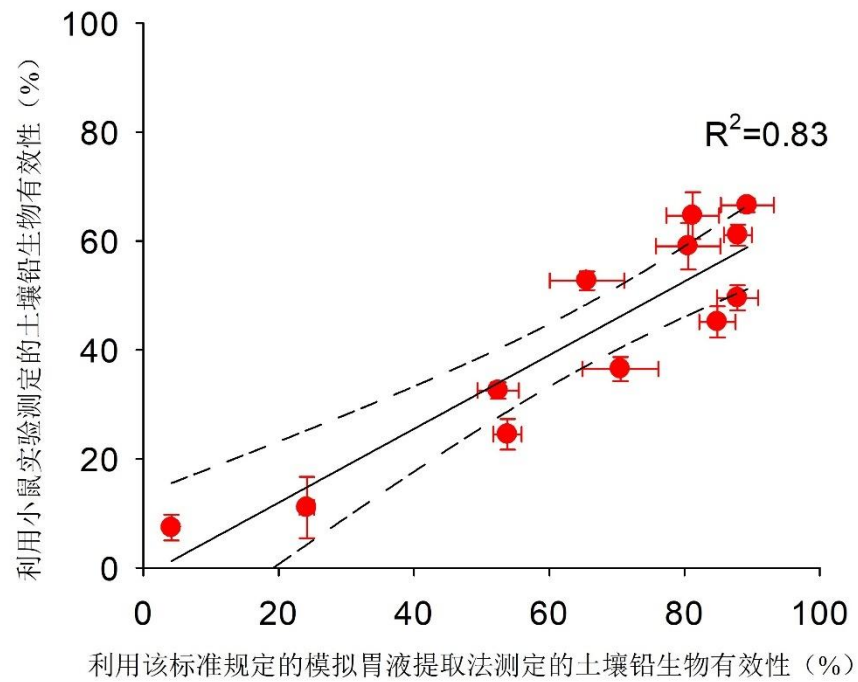


图 B.1 利用模拟胃液提取法测定土壤中铅的生物有效性与小鼠实验结果的相关性分析

附 录 C
(资料性)
污染土壤铅生物有效性

表 C.1 利用模拟胃液提取法测定 12 个污染土壤中铅的生物有效性及精密度

土壤样品	铅质量浓度 (mg/kg)	砷质量浓度 (mg/kg)	镉质量浓度 (mg/kg)	生物有效性平均值 (%)	相对标准偏差 (%)
1	739±5.32	38.9±4.18	1.61±0.53	24.17	1.06
2	1148±16.06	546±0.59	20.6±0.27	81.21	3.89
3	880±4.40	556±6.70	19.8±0.31	84.84	2.67
4	187±28.91	107±3.75	2.62±0.32	70.51	5.59
5	4715±21.85	700±30.73	13.9±0.56	4.17	0.28
6	3343±13.05	2372±92.51	59.1±1.61	80.53	7.75
7	1713±42.82	1005±12.80	31.3±0.76	87.83	3.03
8	3014±17.21	681±3.54	42.8±0.75	53.82	11.08
9	2365±73.40	1684±9.39	41.4±1.48	65.57	5.51
10	6044±33.72	4269±53.12	52.3±4.37	52.46	3.04
11	2008±30.91	1828±69.94	47.6±0.90	89.27	3.91
12	1648±16.55	1112±16.43	39.8±5.84	87.87	2.07

表 C.2 利用小鼠实验测定 12 个污染土壤中铅的生物有效性及精密度

土壤样品	铅质量浓度 (mg/kg)	砷质量浓度 (mg/kg)	镉质量浓度 (mg/kg)	生物有效性平均值 (%)	相对标准偏差 (%)
1	739±5.32	38.9±4.18	1.61±0.53	11.09	5.62
2	1148±16.06	546±0.59	20.6±0.27	64.67	4.31
3	880±4.40	556±6.70	19.8±0.31	45.16	2.84
4	187±28.91	107±3.75	2.62±0.32	36.51	2.20
5	4715±21.85	700±30.73	13.9±0.56	7.39	2.37
6	3343±13.05	2372±92.51	59.1±1.61	59.05	4.28
7	1713±42.82	1005±12.80	31.3±0.76	49.58	2.29
8	3014±17.21	681±3.54	42.8±0.75	24.52	2.83
9	2365±73.40	1684±9.39	41.4±1.48	52.71	1.71
10	6044±33.72	4269±53.12	52.3±4.37	32.55	1.53
11	2008±30.91	1828±69.94	47.6±0.90	66.57	1.27
12	1648±16.55	1112±16.43	39.8±5.84	61.09	1.92

附录 D
(资料性)
标准土壤物质铅生物有效性 (实验室内部可重复性)

选取了四个标准土壤物质，在南京大学环境学院实验室开展了实验室内部可重复性评估。利用该标准规定的模拟胃液提取法，共7位操作者对标准物质中铅的生物有效进行测试。四个标准物质中，NIST 2710a和NIST 2587为美国国家标准与技术研究院（National Institute of Standards and Technology，NIST）制备的标准土壤；BGS 102为英国地质调查局（British Geological Survey）制备的标准土壤；GBW07405为中国地质科学院地球物理地球化学勘查研究所制备的标准土壤（附录表D.1）。对四个标准土壤，7位测试者的测试结果总体具有较好的一致性，表明该标准规定的模拟胃液提取法在实验室内部具有较高的可重复性。

表 D.1 四种标准土壤物质的具体信息以及土壤中砷和铅的总量
(单位为 $\mu\text{g/g}$)

Type	SRMs	Detail	Pb 含量
Soil	NIST 2710a	Soil from a former smelting site, Montana	5520
Soil	NIST 2587	Residence soil containing lead from paint, Connecticut	3242
Soil	BGS 102	Ironstone soil	80
Soil	GBW07405	Yellow red soil from a mining area, Hunan	552

表 D.2 同一实验室 7 位不同测试者利用胃液提取法测定 4 个标准土壤物质中铅的生物有效性及精密度

测试者	NIST 2710a		NIST 2587		BGS 102		GBW07405	
	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)
1	50.39	2.51	92.43	0.91	29.47	7.15	28.34	1.18
2	51.53	1.49	95.36	2.31	23.71	0.50	28.22	0.52
3	42.24	4.55	83.30	1.20	23.66	2.64	17.71	4.36
4	46.79	3.74	82.48	11.09	23.89	2.83	18.59	2.09
5	47.17	7.99	87.86	3.31	26.57	2.99	25.82	0.16
6	44.82	6.73	81.33	7.78	31.61	2.74	25.58	2.86
7	43.63	4.69	80.46	7.95	19.24	7.83	24.40	2.25

附 录 E
(资料性)
标准土壤物质铅生物有效性 (实验室间可重复性)

选取了四个标准土壤物质,在四家实验室开展了实验室间准确度和精密度验证。利用该标准规定的模拟胃液提取法,分别在南京大学(NJU)、山东师范大学(SDNU)、济南大学(UJ)以及江苏实朴检测服务有限公司(SP),对附录表D.1的四个标准土壤物质中铅的生物有效性进行了测试。不同实验室的测试结果总体具有较好的一致性,表明该标准规定的模拟胃液提取法在不同实验运用时具有较高的可重复性。

表 E.1 在四家不同实验室利用胃液提取法测定 4 个标准土壤物质中铅的生物有效性及精密度

实验室	NIST 2710a		NIST 2587		BGS 102		GBW07405	
	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)
NJU	46.65	3.42	86.20	5.84	25.45	4.14	24.10	4.31
SDNU	37.55	0.81	78.41	1.89	35.56	15.6	20.65	1.05
UJ	46.49	3.66	83.44	1.60	35.48	0.56	21.98	1.11
SP	38.53	0.73	89.35	3.30	24.00	1.15	29.29	6.56