

《土壤环境质量 建设用地污染土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》

（征求意见稿）

编制说明

《土壤环境质量 建设用地污染土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》起草组

二〇二三年四月

目录

1、编制背景.....	2
2、编制必要性.....	5
3、国内外标准化情况.....	7
3.1 国外相关标准情况.....	7
3.2 国内相关标准情况.....	10
4、工作简况.....	12
4.1 任务来源.....	12
4.2 起草单位与分工.....	12
4.3 主要起草人及情况简介.....	12
4.4 主要工作过程.....	15
5、标准的主要技术内容及编制依据.....	16
5.1 编制原则.....	16
5.2 编制依据.....	16
5.3 范围.....	16
5.4 规范性引用文件.....	17
5.5 术语及定义.....	17
5.6 原理.....	18
5.7 干扰消除.....	18
5.8 试剂和材料试剂和材料.....	18
5.9 仪器和设备.....	19
5.10 生物有效性测定.....	20
5.11 仪器分析.....	21
5.12 结果计算与表示.....	22
5.13 质量保证和质量控制.....	22
5.14 废物处理.....	23
5.15 标准方法的开发.....	23
6、与现行标准的协调关系.....	33
7、重大分歧依据的处理经过和依据.....	34

8、标准实施建议.....	35
---------------	----

1、编制背景

当前我国国民健康受到多介质、多途径、多重金属的复合污染暴露威胁，地方性重金属中毒健康事件频发，影响社会稳定，成为“健康中国”战略实施的重要瓶颈之一。镉元素是当前重点关注的有毒有害重金属之一，其在各类环境介质中的广泛赋存以及急慢性暴露后带来的包括肾脏功能损伤、“痛痛病”以及致癌风险等不容忽视。随着我国城市化和工业化的快速推进，我国近三十年来土壤重金属污染问题日益突出。近期的全国土壤调查显示，根据我国土壤环境质量标准，目前镉污染土壤占污染土壤的比例高达 7%（Zhao et al., 2015）。以耕地土壤为例，其土壤镉的三个主要来源是采矿冶金、污水灌溉和城市活动。受采矿冶金污染的土壤中镉含量显著高于其它来源，除了矿业活动直接导致土壤镉污染外，污水灌溉对土壤镉的贡献同样不容忽视，尤其在南方双季稻地区，灌水灌溉是农田土壤镉积累的主要来源（林欣颖 et al., 2020）。现今国内外已有部分研究团队针对各类土壤镉污染场地进行了镉生物有效性和健康风险的评价工作。

我国生态环境部高度重视环境与健康问题，确立了“预防为主、风险管理”的指导思想，将环境暴露评估和健康风险防控列为重点管控技术。对重金属人体暴露及其健康风险进行精确评估，不仅要关注重金属在各环境介质中的浓度和毒性，更要考虑重金属被摄入人体胃肠道后的生物有效性。人群镉暴露途径包括吸烟、食用受污染的食物或水、吸入灰尘以及偶然摄入受镉污染的土壤和灰尘。对于生活在污染场地附近的居民特别是儿童群体而言，通过手口行为无意识摄入土壤可能是镉重金属暴露的重要途径（Li et al., 2019）。然而现今我国对于污染场地重金属等污染物的人体健康风险评价和场地修复法规标准的制定仍基于污染物的总量，并没有考虑人体生物有效性。土壤颗粒经口被无意摄入人体胃肠道后，只有部分可被胃液溶解后在肠道内经跨膜吸收进入血液循环并在靶器官蓄积，产生健康危害（Li et al., 2019）。因此，基于土壤镉总量的健康风险评估常会高估其带来的健康风险，造成过度修复，带来人力和物力浪费。为更加准确地开展污染场地修复和治理，需要考虑特定污染土壤中镉的人体生物有效性，尤其是经口摄入后在其人体胃肠道内的生物有效性（Li et al., 2020）。

为了突破暴露评估关键技术，完善我国环境健康风险评估体系，亟待建立能够准确测定污染场地土壤镉经口摄入人体生物有效性的方法。动物体内实验（in vivo assays）是测试重金属人体相对生物有效性（relative bioavailability, RBA）的可靠方法，能够较为准确测定污染场地镉经口摄入人体生物有效性。为了评估摄入污染土壤带来的镉暴露风险，幼猪和小鼠动物模型已经被用来测定污染土壤中镉的相对生物有效性（Cd relative bioavailability, Cd RBA）(Schroder et al., 2003; Juhasz et al., 2010; Denys et al., 2012)，来反应人体对镉的吸收。然而，动物活体实验花费高、耗时长，不适宜于大批量场地土壤样品的快速测试需求。为避免动物活体实验的局限性并兼顾便利性和经济性，开发与动物实验具有相关性的体外人体胃肠模拟液提取测试（in vitro assays）方法，是开展污染场地土壤健康风险精准评价的关键。人体胃肠模拟液提取法是根据人体胃液和小肠液的主要成份以及化学环境配制模拟胃液和肠液，使用胃液或肠液对土壤污染物进行提取，计算可提取部分重金属含量占总量的百分比，进而得到污染物通过口腔摄入这一暴露途径的生物可给性（bioaccessibility）。

体外胃肠模拟液方法简便快捷，但需要利用动物活体实验进行验证。目前，国外研究机构已建立多种与动物活体实验存在较好线性相关关系的模拟人体胃肠道提取法，包括 SBRC（solubility bioaccessibility research consortium）方法、IVG（in vitro gastrointestinal）方法、PBET（physiologically based extraction test）方法、DIN（Deutsches Institut für Normung e.V.）、UBM（Unified BARGE Method）方法等。此外，体外胃肠模拟液提取方法的操作在不同实验室间往往具有不一致性，对生物有效性测试和人体健康风险评估带来了诸多不确定性。因此，亟需对体外胃肠模拟液提取方法进行标准化，规范和统一具体操作流程和参数，使其未来能够更好地服务于我国人体健康暴露和风险评估体系的构建，并推广应用于污染场地的管理和修复。

本标准依托科技部国家重点研发计划项目“场地土壤污染物形态原位表征和生物有效性的标准化测试方法研究”（2018YFC1801000）的研究成果。由于目前我国开展的建设用地污染土壤风险评估与确定的修复目标值都是以土壤中污染物的总含量为基础，是基于土壤中的目标污染物完全具有生物有效性为前提

的。现行的《建设用地土壤污染风险评估技术导则》（HJ 25.3-2019）、《建设用地土壤修复技术导则》（HJ 25.4-2019）等均不涉及生物有效性内容。污染物形态和生物有效性测定分析相关的理论与方法尚未融入到建设用地土壤污染风险评估与修复工作中。为填补以上空白，江苏省环境工程有限公司向江苏省环境科学学会提出团体标准《建设用地土壤污染物的生物有效性分析与应用技术指南》提出立项申请，经专家论证，江苏省环境科学学会于 2022 年正式立项（苏环学[2022]52 号）。

2、编制必要性

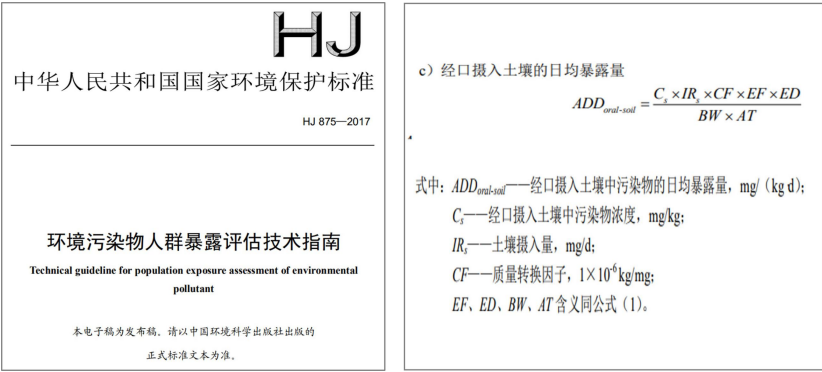


图 1. 《环境污染人群暴露评估技术指南》中对经口摄入土壤导致的污染物日均暴露量的计算



图 2. 《污染物风险评估技术导则》和《生态环境健康风险评估技术指南 总纲》中对经口摄入土壤污染物导致日均暴露量的计算

我国污染物人体生物有效性研究起步晚于欧美国家，当前对符合我国环境污染和人群暴露特征的污染物人体生物有效性的认识仍十分有限，在制定《环境污染人群暴露评估技术指南》、《污染场地风险评估技术导则》等一系列标准时仍不能以环境污染物的生物有效浓度为评估依据。比如在《环境污染人群暴露评估技术指南》（HJ 875-2017）中对经口摄入土壤的重金属日均暴露量的计算，是基于经口摄入土壤中污染物的浓度和土壤摄入量，没有考虑土壤摄入后污染物的吸收率因子（ ABS_o ），即人体生物有效性（图 1）。在另外一些健康风险评估指南如《污染物风险评估技术导则》（HJ 25.3-2014）和《生态环境健康风险评估技术指南 总纲》（HJ 1111-2014），提出了在计算重金属等污染物暴露量时需要考虑吸收率因子即人体生物有效性，但规定吸收率因子（ ABS_o ）值为 1，也

即认为污染物的人体生物有效性是 100%，因此实际上仍然是基于土壤中污染物的总量来评估污染物经口摄入的暴露量（图 2）。

基于土壤中污染物总量的健康评估方法具有一定的优点，比如实际可操作性和可推广性很强，仅依靠测定土壤污染物的总量即可实施，也能最大程度地保障人体健康。然而，基于总量的健康风险评估方法常会高估重金属污染物带来的健康风险，造成过度修复和管控，带来人力和物力资源的浪费。为了突破暴露评估关键技术，完善我国环境健康风险评估体系，亟需将污染物人体生物有效性纳入目前现有的环境健康风险评估体系中，使我国健康风险评估理念由粗放向精细化迈进。而建立科学高效的污染物人体生物有效性测试标准方法，则是构建基于人体生物有效性的环境暴露和风险评估体系需首要解决的重点问题，对打赢污染防治攻坚战、加快生态文明建设提供有力的技术支撑，促进我国环境与健康学科的发展。鉴于土壤镉污染及其人体健康危害的普遍性，亟待建立能够准确测定污染场地土壤镉经口摄入人体生物有效性的标准方法。

本标准的内容提供了利用人体模拟胃液提取方法测定污染土壤中镉人体生物有效性的完整流程，对土壤中镉人体健康风险、生态风险评估起到积极作用。本标准实施后，可以带来以下收益：

（1）在污染土地治理过程复杂，修复成本较高的情况下，本标准有利于推动生物有效性技术在修复目标值制定中的应用，推动相关风险评估模型的完善，对推进我国生态文明环境建设具有重要而深远的意义，对支撑我国土壤污染修复行业健康发展具有宝贵的借鉴意义。

（2）有利于国家土壤污染防治政策的贯彻执行。本标准响应《土壤污染防治行动计划》，从技术层面提出在污染场地风险评估中需考虑污染物的人体生物有效性，为污染土壤风险的精准化评估，修复目标的合理制定提供技术支持，从而保障污染土壤的合理修复，降低污染场地修复成本，能够实现良好的环境效益和社会经济效益。。

3、国内外标准化情况

3.1 国外相关标准情况

表 1. 五种体外模拟方法 SBRC、IVG、DIN、PBET、UBM 的胃液和肠液的成分及提取参数 (Li et al., 2019b)。

方法	阶段	成分 (L ⁻¹)	pH 值	土 / 液 比	提取时 间 (h)
SBRC	胃液	甘氨酸 30.03 g	1.5	1:100	1
	肠液	胆汁 1.75 g、胰蛋白酶 0.50 g	7.0	1:100	4
PBET	胃液	胃蛋白酶 1.25 g、苹果酸钠 0.50 g、柠檬酸钠 0.50 g、乳酸 420 μL、醋酸 500 μL	2.5	1:100	1
	肠液	胆汁 1.75 g、胰蛋白酶 0.5 g	7.0	1:100	4
IVG	胃液	胃蛋白酶 10 g、NaCl 8.77 g	1.8	1:150	1
	肠液	胆汁 3.5 g、胰蛋白酶 0.35g	5.5	1:150	1
DIN	胃液	胃蛋白酶 1 g、粘蛋白 3 g、NaCl 2.9 g、KCl 0.7 g、KH ₂ PO ₄ 0.27 g	2.0	1:50	2
	肠液	胆汁 9.0、胰蛋白酶 9.0 g、蛋白酶 0.3 g、尿素 0.3 g、KCl 0.3 g、CaCl ₂ 0.5 g、MgCl ₂ 0.2 g	7.5	1:100	6
UBM	唾液	KCl 0.90 g、NaH ₂ PO ₄ 0.89 g、KSCN 0.20 g、Na ₂ SO ₄ 0.57 g、NaCl 0.30 g、尿素 0.2 g、淀粉酶 0.145 g、粘蛋白 0.05 g、尿酸 0.015 g	6.5	1:15	10 s
	胃液	KCl 0.824 g、NaH ₂ PO ₄ 0.266 g、NaCl 2.752 g、CaCl ₂ 0.4 g、NH ₄ Cl 0.306 g、尿素 0.085 g、葡萄糖 0.65 g、葡萄糖醛酸 0.02 g、盐酸葡萄糖胺 0.33 g、牛血清蛋白 1.0 g、粘蛋白 3.0 g、胃蛋白酶 1.0 g	1.2	1:37.5	1
	肠液	KCl 0.94 g、NaCl 12.3 g、NaHCO ₃ 11.4 g、KH ₂ PO ₄ 0.08 g、MgCl ₂ 0.05 g、尿素 0.35 g、CaCl ₂ 0.42 g、牛血清蛋白 2.8 g、胰蛋白酶 3.0 g、脂肪酶 0.5 g、胆汁 6.0 g	6.3	1:97.5	4

为测定土壤中镉等污染物的生物可利用性,大量的体外胃肠提取方法发展起来(表 1)。这些方法通过模拟发生在人体内的消化过程从而使得污染物从土壤中释放出来。简单快捷的体外试验最初是在营养学研究中用于测定食物中铁的生物有效性(Crews et al., 1983)。Ruby et al. (1992)首次将体外试验延伸,用于测试土壤中铅的生物有效性。Ruby et al. (1996)在此基础上进行了改进,建立了基于生理学的 PBET 方法(physiologically based extraction test)。此后,经过二十年的发展,其它体外试验方法也陆续被建立,常用的包括 Rodriguez et al. (1999)提出的 in vitro gastrointestinal (IVG)方法、德国 Deutsches Institut für

Normunge.V.提出的 DIN 方法 (DIN, 2000)、Kelly et al. (2002) 提出的 solubility bioaccessibility research consortium (SBRC) 方法、欧洲生物可给性研究小组提出的 Unified BARGE Method (UBM) 方法 (Wragg et al., 2011) 等。这些体外方法都是针对污染土壤建立的, 也已经在国际上得到广泛的应用 (Juhasz et al., 2009; Smith et al., 2011)。

上述体外提取方法主要模拟人体胃肠和肠相两个部分。胃相部分模拟是污染物在胃部所遇到的环境, 主要特征为酸性环境和含有一定含量无机盐、有机酸和蛋白类物质; 与之不同, 肠相是在偏中性的环境进行提取的, 其组成成分在胃部基础之上, 进一步引入胆盐、胰蛋白酶等物质。尽管体外方法都尽量模拟污染物通过口腔进入胃肠道后所遇到的环境, 不同的方法差异性还是比较明显的。比如说 SBRC 方法的胃相主要用甘氨酸缓冲液调节到 pH 1.5, 模拟人体胃部所遇到的酸性环境, 而 UBM 的胃相在模拟酸性环境的同时还考虑到了无机盐所组成离子强度和胃部所存在带有活性的酶类。PBET 还在胃部加入了一定有机酸类。另外它们模拟的固液比、提取时间和胃肠液 pH 值也有一定的差异性。

由于上述模拟胃肠液成分和提取参数的巨大差异, 不同体外方法对相同土壤的铅生物可给性的测试结果经常存在巨大差异。例如, 对 7 种污染土壤用 SBRC、IVG 和 PBET 胃相得到的镉生物可利用性各不相同, 分别为 57–122%、43–107% 和 0–110%。存在差异的原因之一是由于三种方法胃相 pH 值不同 (Juhasz et al., 2010)。Oomen et al. (2002) 对 3 种土壤应用 5 种体外方法研究 Cd 的生物可利用性发现, 得到的镉生物可利用性同样存在差异。对污染土壤中铅生物可利用性的研究也发现了类似的结果。Li et al. (2015) 指出 SBRC 胃相方法测得的 12 个污染土壤中铅的生物可利用性 (3.0–99%) 显著高于 UBM、IVG 和 PBET 方法 (0.46–84%)。这可能是由于模拟液组成和提取参数 (pH, 固液比等) 不同导致的。因此在众多体外测试方法中, 推荐哪一个成为测试污染土壤镉生物有效性的标准方法, 是建立镉生物有效性标准测试方法的重中之重。评判不同体外方法优越性的一个重要方法是, 建立体外方法与动物实验测定结果之间的线性相关关系, 通过评判相关关系的强弱, 来确立最佳的体外测试方法, 进而可以推荐成为生物有效性标准测试方法。

体外方法能否代替动物活体实验来测定土壤镉的人体生物有效性,需要建立通过体外胃肠液提取方法测定的重金属体外生物可给性(in vitro bioaccessibility, IVBA)与通过动物实验测定的重金属生物有效性间的相关关系,两者间的相关关系应该满足以下三点标准,(1)体内体外之间的线性关系应满足相关性系数 $R^2>0.6$;(2)回归曲线的斜率为0.8~1.2;(3)回归曲线的截距接近于0。

过去二十年以来,国际众多学者通过建立活体实验与体外试验之间的线性相关关系,镉生物有效性预测模型已经在污染土壤中被构建。例如, Schrodter et al. (2003) 发现用 IVG 方法测得的镉生物可利用性与幼猪经 15 天暴露后在肾脏中得到的镉生物有效性之间具有良好的相关关系 ($R^2=0.64$)。UBM 方法得到的镉生物可利用性与经 14 天暴露后以幼猪的肝脏、肾脏、大腿骨或尿液中镉为生物靶器官测定的相对生物有效性存在很强的相关性 ($R^2=0.77-0.94$) (Denys et al., 2012)。SBRC 和 PBET 方法测得的可提取镉也与基于小鼠模型肝脏和肾脏中镉的相对生物有效性相关($R^2=0.72-0.91$) (Juhasz et al., 2010)。然而,对不同体外方法测定的镉生物可利用性与污染土壤中镉相对生物有效性之间关系的研究仍十分有限。Juhasz et al. (2010) 对镉生物有效性和不同方法得到的镉生物可利用性进行了相关性分析,然而只研究了 7 种土壤,其中包括 2 个人为污染土壤和 5 个污染土壤。因此,为了验证体外方法预测污染土壤中镉相对生物有效性的能力,还需要使用更多的污染土壤。

由于与动物实验之间具有较好的线性相关关系,目前 SBRC 胃液提取方法已成为美国环保局(USEPA)认定的评价污染土壤铅生物可给性的标准方法(USEPA Method 1340: In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil); UBM 方法已经成为被 International Organization for Standardization 接纳为 ISO17924 标准方法; DIN 方法被德国标准研究院定为土壤中无机和有机污染物生物有效性的测定方法(DIN 19738-2004)。

3.2 国内相关标准情况

我国《土壤污染防治行动计划（国发〔2016〕31号）》（以下简称“土十条”）提出“坚持预防为主、保护优先、风险管控，突出重点区域、行业和污染物，实施分类别、分用途、分阶段治理，严控新增污染、逐步减少存量”的土壤治理思路的总体要求。“土十条”第四条第十二款要求：暂不开发利用或现阶段不具备治理修复条件的污染场地，由所在地县级人民政府组织划定管控区域，开展环境风险管控措施。

2016年12月，环境保护部发布的《污染地块土壤环境管理办法（试行）》（环境保护部令第42号）第十八条明确规定“污染场地土地使用权人应当根据风险评估结果，并结合污染场地相关开发利用计划，有针对性地实施风险管控。对暂不开发利用的污染场地，实施以防止污染扩散为目的的风险管控。对拟开发利用为居住用地和商业、学校、医疗、养老机构等公共设施用地的污染场地，实施以安全利用为目的的风险管控”。

2019年1月1日起施行的《中华人民共和国土壤污染防治法》也明确规定，土壤污染防治应当坚持预防为主、保护优先、分类管理、风险管控、污染担责、公众参与的原则（第一章总则第三条）。“第四章风险管控和修复”中规定，实施风险管控、修复活动，应当因地制宜、科学合理，提高针对性和有效性。实施风险管控、修复活动，不得对土壤和周边环境造成新的污染（第一节一般规定，第三十八条）。对建设用地土壤污染风险管控和修复名录中的地块，地方人民政府生态环境主管部门可以根据实际情况采取下列风险管控措施：（一）提出划定隔离区域的建议，报本级人民政府批准后实施；（二）进行土壤及地下水污染状况监测；（三）其他风险管控措施（第三节建设用地，第六十三条）。

针对污染地块健康风险评估技术标准，我国目前发布的污染地块系列环境保护标准主要有《环境污染物人群暴露评估技术指南》（HJ 875-2017）、《污染物风险评估技术导则》（HJ 25.3-2014）、《生态环境健康风险评估技术指南 总纲》（HJ 1111-2014）。在这些技术指南和导则中，对经口摄入土壤的重金属日均暴露量的计算是基于经口摄入土壤中污染物的浓度和土壤摄入量，没有考虑

土壤摄入后污染物的吸收率因子 (ABS_o)，即人体生物有效性；或者是考虑吸收率因子即人体生物有效性，但规定吸收率因子 (ABS_o) 值为 1，实际上仍然是基于土壤中污染物的总量来评估污染物经口摄入的暴露量。

我国污染物人体生物有效性研究起步晚于欧美国家。唐翔宇等 (2003) 首次把体外方法用于中国，利用并改进了 Ruby et al. (1996) 建立的 PBET 方法，评估了铅污染土壤对人体的生物有效性和健康风险。2004 年，唐翔宇和朱永官 (2004) 对体外试验的发展现状进行了综述，为体外胃肠模拟方法在我国的应用起到了推动作用。目前，国内对于重金属生物有效性体外方法的开发和应用仍相对较少。

最近几年国内学者已经针对镉污染土壤，开展了多种体外胃肠模拟液体外方法与动物实验特别是小鼠活体实验间的相关关系研究，初步确立了可以推荐成为铅污染土壤生物有效性测试的最佳体外方法。比如，Li et al. (2016) 选取来自中国不同地域和不同污染源的 12 个污染土壤进行实验，利用 UBM、SBRC、IVG 和 PBET 四种方法测定土壤中镉的相对生物可利用性，并将土壤暴露给老鼠和选取肝、肾、大腿骨或肝+肾作为生物靶器官测定了镉的相对生物有效性，通过镉生物可利用性与相对生物有效性的相关分析，评估了体外方法预测污染土壤中镉生物有效性的适用性。然而，目前我国仍未出台测试污染土壤镉人体生物有效性的标准体外胃肠模拟液体提取方法。

4、工作简况

4.1 任务来源

江苏省环境科学学会于 2022 年 11 月批准立项（苏环学【2022】52 号）。

4.2 起草单位与分工

表2. 起草单位与分工

序号	单位名称	分工
1	南京大学	主编
2	江苏省环境工程技术有限公司	参编
3	江阴秋毫检测有限公司	参编

南京大学负责技术开发，主要包括实验室内动物活体和体外模拟实验。起草标准草案文本和编制说明。江苏省环境工程技术有限公司负责提供土壤样本和方法验证。江阴秋毫检测有限公司负责污染物的检测分析。

4.3 主要起草人及情况简介

历红波，南京大学环境学院博士生导师，副教授。国家优秀青年科学基金入选者。主要从事环境多介质重金属暴露的人体生物有效性及其调控机制研究，基于“建立测试方法-评估人群暴露-揭示调控机制”的链条式研究思路，在重金属人体生物有效性测试方法、人群暴露评估和源解析、生物有效性调控机制等关键领域开展了创新工作。先后主持参与国家自然科学基金，国家重点研发计划子课题，江苏省自然科学基金等十余项项目，其中包括主持国家优秀青年科学基金《基于人体生物有效性的重金属暴露评估与调控》、国家自然科学基金面上项目《稻米中镉的人体生物有效性及调控机制研究》、国家重点研发计划子课题《场地土壤典型重金属人体生物有效性测试方法开发》等与生物有效性相关的项目课题。牵头制定团体标准《利用人体胃肠模拟液测试污染土壤中砷生物有效性的标准方

法》。受邀编制本科生教材《环境化学实验》中关于基于生物有效性开展土壤重金属污染健康风险评价的实验。致力于从优化动物实验方法、寻求可以替代动物实验的最佳人体胃肠模拟液提取法两个方面，展开了一系列创新工作，建立了适用于环境多介质重金属人体生物有效性的测试方法。主要成果：1) 对污染土壤，开展了不同模式动物（小鼠和幼猪）、不同暴露方式（灌胃和饲喂）、不同靶器官（肝、肾、尿液和血液）等实验方法间的对比研究，确立了具有操作简便、花费较低、数据重复性更好等优势测试土壤中典型重金属（镍、砷、铅、镉）人体生物有效性的小鼠活体实验方法（*Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 453-461; *J. Hazard. Mater.* 2017, 326, 94-100）；2) 对污染土壤、城市土壤、室内灰尘等多介质，确立了可替代动物实验的最佳体外胃肠模拟液提取法（*Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 8548-8555; *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 13652-13659; *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 4989-4996）。相关工作在 *Environ. Sci. Technol.* (8 篇)、*J. Hazard. Mater.* (4 篇)、*Environ. Int.* (2 篇)、*Sci. Total Environ.* (2 篇) 等多个期刊发表，引起了国内外学者的关注。研究成果推动了我国重金属人体生物有效性研究，实现了对土壤、灰尘、农产品等环境多介质的关注，拓展了研究方向和范畴，促进了学科发展。牵头制定《利用人体胃肠模拟液测试污染土壤中砷生物有效性的标准方法》（已立项，2020），在影响人体重金属内暴露的关键环节—肠道吸收过程即人体生物有效性方面具有雄厚的研究基础。目前担任 SCI 期刊 *Chemosphere* 编委、SCI 期刊 *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology-BECT*、*Frontiers in Chemistry*、*Frontiers in Microbiology* 客座编辑。在评价污染物生物有效性这一领域中已发表 SCI 论文 100 余篇，参与撰写教材 1 部，授权发明专利 1 项。建立的生物有效性测试技术服务于江苏省镇江市某化工场地的风险评价项目，也曾多次服务于浙江卓锦环保科技有限公司、璞锦环境工程等多家环保公司的土壤修复项目。

本标准的主要起草人及简介见下表 3。

表3. 主要起草人简介

主要起草人				
序号	姓名	单位	职务/职称	研究方向
1	厉红波	南京大学	副教授	重金属人体生物有效性
2	丁亮	江苏省环境工程技术有限公司	土壤所副所长（主持工作）/高级工程师	土壤地下水污染调查与协同防治
3	林欣颖	南京大学	博士研究生	重金属人体生物有效性
4	薛荣跃	南京大学	博士研究生	重金属人体生物有效性
5	邱成浩	江苏省环境工程技术有限公司	工程师	土壤地下水污染状况调查及环境管理
6	徐鹏程	江苏省环境工程技术有限公司	工程师	土壤与地下水污染管控与修复
7	张光	江苏省环境工程技术有限公司	工程师	土壤地下水污染状况调查评估
8	黄澄伟	江阴秋毫检测有限公司	工程师	环境监测
9	卢菲菲	江阴秋毫检测有限公司	工程师	环境监测
10	孔超	江阴秋毫检测有限公司	工程师	环境监测
11	孔艺	南京大学	博士研究生	有机污染物人体生物有效性
12	崔昕毅	南京大学	教授	有机污染物人体生物有效性
13	谷成	南京大学	教授	污染物的环境界面过程及行为原位表征

4.4 主要工作过程

为保证本标准的制定质量，力求标准符合科学发展与切合实际，使《土壤环境质量 建设用地土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》具有可操作性，标准实施后能对镉污染土壤精准化修复的实施和开展具有指导作用，标准编制组在开展大量资料收集、实地调研、数据分析的基础上，综合参考国内、外有关经验，并广泛听取国内污染地块修复技术领域的专业人员、相关专家的意见，经过多次讨论研究和反复修改，起草编制完成江苏省环境科学学会团体标准《土壤环境质量 建设用地土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》草案。主要开展工作情况如下：

2018 年 12 月-2020 年 6 月，结合主编单位前期工作的基础上，开展实验工作，开发建立土壤多铅的生物有效性测定方法。

2020 年 7 月，本标准项目承担单位和参编单位成立标准编制组。

2020 年 7 月 6 日，标准编制组组织召开了标准启动会暨第一次讨论会。

2020 年 8 月-2021 年 12 月，编制组调研并系统分析了欧美等发达国家以及我国已发布的相关技术指南，并通过方法学研究手段，获得了大量实验数据，结合国内外相关研究成果及多个实际调查案例，形成了《土壤环境质量 建设用地土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》(草案)及编制说明。

2022 年 4 月，依托国家重点研发专项，在主编单位-南京大学环境学院内征求相关专业教授的意见，再次完善标准草案和编制说明。

2022 年 9 月，向江苏省环境科学学会正式提交《土壤环境质量 建设用地土壤镉生物有效性的测定 模拟胃液提取法》(草案)及编制说明。

2022 年 10 月，江苏省环境科学学会在南京组织召开了标准立项审查会，经专家质询和讨论，同意立项。

2022 年 12 月，江苏省环境科学学会组织以函审形式开展团体标准初审。标准编制组针对专家函审意见进行了认真研讨和修改。

2023 年 4 月，编制组进一步完善了指南及编制说明材料，形成征求意见稿。

5、标准的主要技术内容及编制依据

5.1 编制原则

(1) 政策衔接

满足相关环保标准和环保管理工作的要求吗，按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ/T 168-2010）的要求进行方法检出限和测定范围的测定。方法技术参数能够满足《土壤环境质量建设用地土壤污染风险管控标准（试行）》（GB 36600-2018）等标准的要求。

(2) 方法技术稳定准确可靠

国内外多项研究使用本方法，对数十种铅污染土壤进行了胃肠模拟液体外提取，确保本方法准确可靠，方法的精密度和准确度能够满足各方面的要求。

(3) 具有简便快捷易于推广的优点

本标准结合了土壤生物有效性测试技术发展趋势，实验操作简便快捷，易于进行大批量测定，使用试剂安全易得，对实验条件要求较低，便于推广使用。

5.2 编制依据

按照 GB/T1.1-2022《标准化工作导则第一部分：标准的结构和编写》给出的规则编写。

5.3 范围

本标准规定了利用人体模拟胃液提取法测定污染土壤中镉生物有效性的方法。

本标准适用于建设用地污染土壤中镉生物有效性的测定，描述的测定方法也可用于其他类型污染土壤镉人体生物有效性的测定。

5.4 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

5.5 术语及定义

本文件涉及以下术语：

（1）建设用地 **contaminated site soil**：根据 GB 36600，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。

（2）污染土壤 **contaminated soil**：基于 GB/T 36200、GB 36600、HJ 25.1、HJ 25.2、HJ 25.3 等，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。

（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。

（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。

5.6 原理

根据人体胃液的成份以及 pH 环境，利用 HCl、无机盐、消化酶等配制模拟胃液，使用模拟胃液对土壤中镉进行提取，分析提取液中镉的含量，计算土壤中可提取部分镉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镉的人体生物有效性。

5.7 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。

5.8 试剂和材料试剂和材料

5.8.1 土壤样品

5.8.1.1 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。

5.8.1.2 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。

5.8.2 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。

5.8.2.1 盐酸（HCl 盐酸（HCl）

5.8.2.2 胃蛋白酶（pepsine）

5.8.2.3 苹果酸钠（ $C_4H_4O_5Na_2 \cdot H_2O$ ）

5.8.2.4 醋酸钠（ CH_3COONa ）

5.8.2.5 乳酸（ $C_3H_6O_3$ ）

5.8.2.6 醋酸（ CH_3COOH ）

5.8.3 试剂配制

该方法的胃液提取液含有 1.25 g/L 胃蛋白酶、0.50 g/L 苹果酸钠、0.50 g/L 醋酸钠、420 μ L/L 乳酸和 500 μ L/L 醋酸。将上述试剂准确称量后，溶于一级水，使用容量瓶定容。使用分析纯或更高纯度浓盐酸（HCl）在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下调节至 pH 至 2.50 ± 0.05 。提取液应预热至 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

5.8.4 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贮备液。

5.9 仪器和设备

本标准所适用的仪器和设备非固定型号，能够达到相同效果的仪器和设备即可。包括以下：

5.9.1 pH 计。

5.9.2 分析天平：精度为 0.1 mg。

5.9.3 恒温振荡培养箱：温度稳定 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

5.9.4 离心机：离心力可达 4500 rpm。

5.9.5 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。

5.9.6 针式过滤器：0.45 μm 孔径聚醚砜滤膜。

5.9.7 聚丙烯离心管：50 mL。

5.9.8 非金属筛：60 目。

5.10生物有效性测定

按照图3规定的流程开展模拟胃液提取。准确称取1.0 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HDPE瓶口的唇缘或外螺纹上。

准确加入100 mL模拟胃液。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。放入恒温振荡器，在37°C和150 r/min条件下提取1 h，期间利用pH计定时监测溶液pH，通过添加适量HCl（37%）使溶液pH值保持在2.0 - 3.0之间（图1）。提取结束后，三份试样经4000 r/min离心10 min后，准确分离上清液并过0.45 μ m滤膜，样品于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。

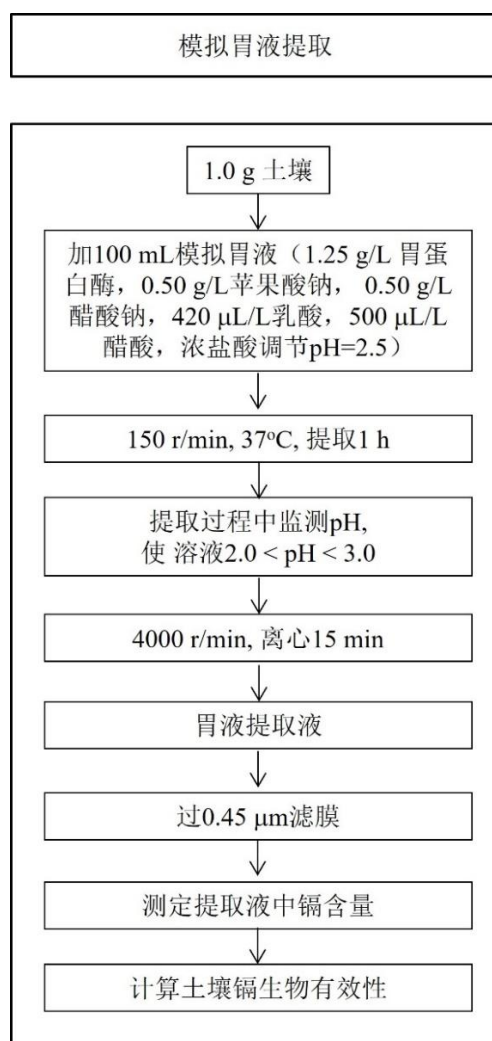


图 3. 利用模拟胃液测定镉生物有效性的概括性示意图

5.11 仪器分析

制备至少6个浓度梯度的标准镉溶液，镉浓度分别为0、0.5、1、2、5、10和20 μg 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 HNO₃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镉的响应信号，利用标准曲线，计算土壤胃液提取液中镉的含量。

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。

5.12 结果计算与表示

土壤中镉的生物有效性（Biaccessibility, BA）以(%) 表示，下列公式计算。

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

式中：

BA——生物有效性（%）；

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

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

计算结果表示到小数点后两位

5.13 质量保证和质量控制

5.13.1 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。

5.13.2 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，至少测定一个实验室空白样，其测定结果应低于方法检出限。

5.13.3 平行试验

每个样品需平行提取和测定三次，三次平行提取和测定得到的镉生物有效性的相对标准偏差应 $< 10\%$ 。

5.13.4 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。

5.13.5 动物实验验证

建议参考附录 B 开展小鼠实验，测定土壤样品中镉的相对生物有效性（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 个污染土壤样品镉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镉生物有效性的适用性。

5.13.4 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镉的生物有效性, 其测定结果与推荐值 (附录表 D.2) 的相对误差应在 $\pm 10\%$ 之内。

5.14 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。

5.15 标准方法的开发

5.15.1 土壤样品

在体外方法开发时, 使用了采集于中国的 5 个省份的 12 个镉污染土壤, 其采集区域包括农田、矿区、冶炼区和住宅区等 (表 4)。12 个污染土壤中的镉浓度在 $3.00\text{--}296\text{ mg kg}^{-1}$ 之间, 远高于中国土壤环境质量二级标准 (pH 小于 7.5 的土壤限值为 0.3 mg kg^{-1} , 大于 7.5 为 0.6 mg kg^{-1})。土壤 pH 值为 2.8–8.9, 总有机碳 0.64–5.26%, 粘土含量 2.91–13.4%, 无定形态铝氧化物、铁氧化物和锰氧化物分别为 $0.74\text{--}5.88\text{ g kg}^{-1}$ 、 $1.76\text{--}45.5\text{ g kg}^{-1}$ 、 $2.58\text{--}8463\text{ mg kg}^{-1}$ 。其他可能会与镉在肠相中产生竞争吸收效应的因素如钙、铁、锌以及磷的浓度也进行了测定, 结果分别为 $2.22\text{--}48.1\text{ g kg}^{-1}$ 、 $21.1\text{--}134\text{ g kg}^{-1}$ 、 $50.7\text{--}2404\text{ mg kg}^{-1}$ 、 $170\text{--}1317\text{ mg kg}^{-1}$ 。

表 4 进行镉生物有效性测试方法开发的供试土壤（粒径<250 μm）的性质

ID	位置 (省份)	Land uses	Cd (mg kg ⁻¹)	Ca (g kg ⁻¹)	Fe (g kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	pH	TOC (%)	粘粒 (%)	Al _{AM} ^a (g kg ⁻¹)	Fe _{AM} (g kg ⁻¹)	Mn _{AM} (mg kg ⁻¹)
S1	湖南	采矿	3.00 ± 0.50 ^b	7.37 ± 0.20	134.3 ± 1.7	834 ± 84	205 ± 18	2.8	0.64	13.1 ± 0.24	2.82 ± 0.23	45.5 ± 1.6	2.58 ± 0.12
S2	云南	采矿	9.59 ± 0.23	6.61 ± 0.42	104.1 ± 6.2	1801 ± 36	336 ± 11	7.8	1.26	13.4 ± 0.05	2.69 ± 0.24	5.10 ± 0.62	8463 ± 451
S3	江苏	农业	11.1 ± 3.2	14.2 ± 0.32	51.1 ± 0.21	2404 ± 31	834.8 ± 9.2	7.5	2.23	2.91 ± 0.21	0.98 ± 0.05	15.4 ± 0.84	1202 ± 21
S4	河南	农业	13.6 ± 1.9	42.8 ± 2.3	25.1 ± 1.6	380 ± 32	290.6 ± 5.8	8.3	4.55	7.64 ± 0.16	1.24 ± 0.08	1.95 ± 0.34	275 ± 18
S5	江苏	冶炼	18.6 ± 1.2	11.1 ± 0.37	51.4 ± 0.79	3101 ± 45	211.5 ± 6.3	6.5	1.47	3.86 ± 0.13	1.92 ± 0.14	9.88 ± 0.57	2437 ± 18
S6	江苏	冶炼	25.6 ± 0.88	2.22 ± 0.12	20.7 ± 0.90	1584 ± 59	433.2 ± 8.3	6.1	2.51	9.66 ± 0.18	0.74 ± 0.05	6.08 ± 0.52	141 ± 4.3
S7	湖南	农业	36.1 ± 0.71	4.71 ± 0.14	30.2 ± 0.26	560 ± 91	9246 ± 13	7.2	2.12	7.15 ± 0.46	1.34 ± 0.21	12.7 ± 0.12	349.3 ± 5.8
S8	河南	农业	59.7 ± 1.3	16.4 ± 0.01	28.4 ± 0.47	210 ± 91	170.4 ± 4.5	8.3	2.41	8.37 ± 0.03	1.24 ± 0.12	1.76 ± 0.06	330.1 ± 8.2
S9	山东	居住	130.3 ± 7.3	6.59 ± 0.40	21.1 ± 1.1	50.7 ± 7.3	244.5 ± 6.3	7.8	3.14	3.44 ± 0.18	0.87 ± 0.09	4.51 ± 0.75	497.4 ± 5.4
S10	山东	工业	204 ± 13	5.59 ± 0.63	34.3 ± 1.8	349 ± 18	2297 ± 20	7.8	5.26	3.83 ± 0.06	5.88 ± 0.25	12.5 ± 0.41	270.8 ± 2.5
S11	山东	居住	212 ± 3.57	6.46 ± 0.02	29.9 ± 0.06	380 ± 11	13173 ± 12	7.3	2.69	3.62 ± 0.06	2.17 ± 0.11	8.84 ± 0.13	424.1 ± 3.4
S12	江苏	采矿	296 ± 21	48.1 ± 1.0	29.3 ± 0.87	44.5 ± 7.6	560.6 ± 4.6	8.9	3.16	3.51 ± 0.31	2.06 ± 0.17	7.94 ± 0.65	251.3 ± 5.3

5.15.2 小鼠实验测定镉的相对生物有效性

使用雌性、体重在 18–22 g 的 Balb/c 小鼠来测定污染土壤中镉的相对生物有效性。小鼠实验过程符合南京大学动物实验委员会制定的实验室动物管理与使用条理。小鼠在代谢笼中进行驯化, 设置光照条件为 12 小时光照/12 小时黑夜交替, 并自由进水 (Milli-Q) 和鼠粮。经过 7 天的适应期后, 按照每个代谢笼一只小鼠对其进行随机分配, 三只小鼠为一组。以质量比 1:50 的比例把土壤混入鼠粮中, 最终添加鼠粮中的镉浓度为 0.06–5.92 mg kg⁻¹ (干重)。把 CdCl₂ 的制备成溶液, 使混合食物中 Cd 浓度为 0.5–5.0 mg kg⁻¹。所有制备鼠粮均为球状并冻干。

小鼠禁食过夜后, 对其进行称重, 并每日饲以添有 CdCl₂ 或污染土壤的鼠粮, 连续暴露 10 天。用未添加其他物质的鼠粮饲喂小鼠作为空白对照。实验过程中, 小鼠每日摄入约 4 克食物。根据土壤中 Cd 的总量, 设定建立剂量响应曲线所使用的浓度暴露剂量范围设定为 0–800 μg Cd Kg BW day⁻¹ (CdCl₂)。10 天暴露期后, 小鼠再次禁食过夜, 然后进行称重, 取肝、肾和大腿骨作为生物靶器官测定 Cd RBA。取的肝和肾样品要快速在–80°C 冰箱中冷冻, 然后使用冷冻干燥机冻干。老鼠的大腿从躯体分离后, 通过蒸煮去除附带的肌肉等组织, 最后冷冻干燥。将这些样品冻干后使用 USEPA 3050B 方法消解, 并用 ICP–MS 测定其中镉含量。

在计算土壤中 Cd 的相对生物有效性之前, 首先, 要建立镉在肝、肾和大腿骨中的镉积累与暴露剂量之间的线性效应关系。然后用土壤镉暴露后的小鼠肝脏、肾脏、大腿骨以及肝+肾中镉浓度与 CdCl₂ 暴露后对应生物标志中镉浓度的比值计算镉相对生物有效性 (公式 1)。所有的浓度都是干重浓度。

$$\text{Cd relative bioavailability (\%)} = \left(\frac{\text{LKF Cd}_{\text{soil}}}{\text{LKF Cd}_{\text{CdCl}_2}} \times \frac{\text{Cd dose}_{\text{CdCl}_2}}{\text{Cd dose}_{\text{soil}}} \right) \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

其中 LKF Cd_{soil} 和 LKF Cd_{CdCl₂} 是指土壤和 CdCl₂ 暴露后小鼠肝、肾或大腿骨中的镉浓度; Cd dose_{soil} 和 Cd dose_{CdCl₂} 是指土壤和 CdCl₂ 暴露小鼠的镉剂量水平。

在计算 Cd 相对生物有效性之前，需要建立 Cd 在不同生物靶器官的剂量响应曲线。经过 10 天连续食物暴露后，肝、肾及大腿骨中的镉浓度与镉的暴露剂量高度相关 (图 4; $r^2=0.93-0.99$)，表明 Cd 在这些生物靶器官中呈现出良好的线性响应关系。肾剂量响应曲线的斜率最高 (0.77)，肝脏 (0.42) 次之，大腿骨 (0.018) 最低。说明肾脏和肝脏是研究小鼠镉 RBA 较理想的生物靶器官。已有研究使用肝脏和肾脏作为生物靶器官展开镉相对生物有效性的研究 (Schroder et al., 2003; Juhasz et al., 2010; Denys et al., 2012)，但用大腿骨的却很少 (Denys et al., 2012)。空白对照中小鼠肾、肝和大腿骨中的镉浓度较低，分别为 $40.6-58.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、 $27.3-31.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ 和 $0.55-0.61 \mu\text{g kg}^{-1}$ 。这与 Juhasz et al. (2010)测定的对照组小鼠中镉浓度结果一致，它们也报道了肾中镉浓度高于肝。当鼠粮中加入 $0.5-5 \text{ mg kg}^{-1}$ Cd 后，小鼠肾脏、肝脏和大腿骨中的镉浓度分别增加至 $86.0-815 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、 $49.3-349 \mu\text{g kg}^{-1}$ 和 $2.71-15.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ，分别是对照组的 1.7-12 倍、1.7-16 倍和 4.8-28 倍。

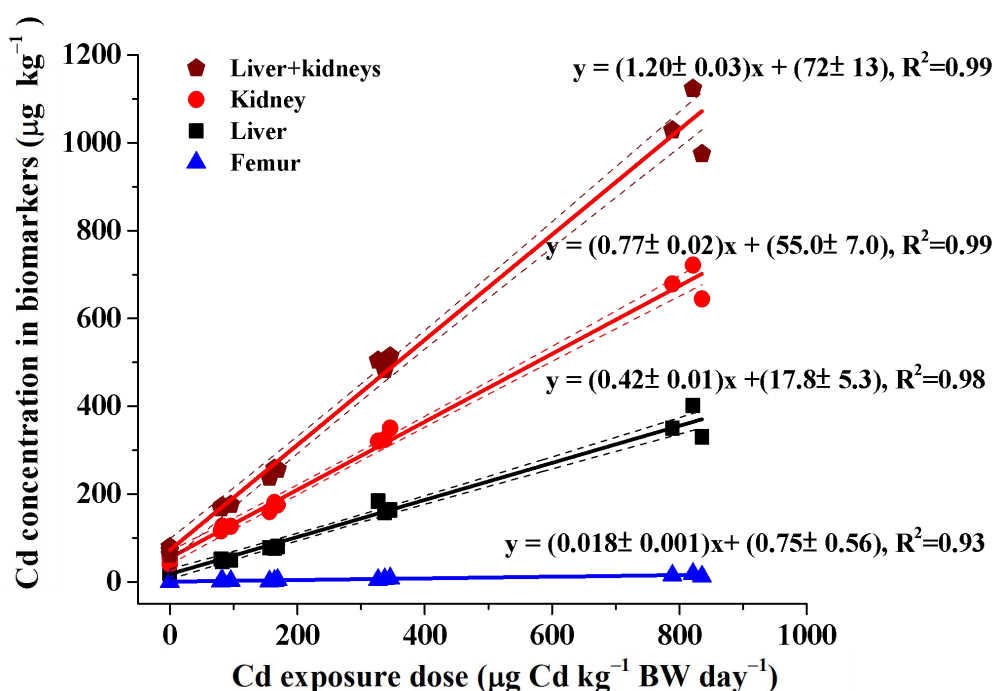


图 4 10 天稳态暴露后小鼠肝、肾、大腿骨以及肝+肾中镉浓度剂量响应曲线。虚线代表 95%的置信区间。回归方程以 $y=(\text{斜率} \pm \text{标准偏差})x + (\text{截距} \pm \text{标准偏差})$ 的形式表示。

当建立起 Cd 在小鼠肝、肾和大腿骨中的剂量效应曲线后, 根据公式 1 计算镉的相对生物有效性。由于镉在大腿骨中的镉积累较少, 本研究不将其作为镉的生物靶器官计算 Cd RBA。在幼猪模型中, 对于 Cd 浓度较低的土壤 ($20\text{--}106\text{mg kg}^{-1}$), 大腿骨不是一个合适的生物靶器官 (Denys et al., 2012)。基于镉在肝和肾中的积累, 计算得到的 12 个土壤样品中 Cd 的 RBA 为 33.5–89.8% 和 39.6–77.8% (图 5)。这与 Juhasz et al. (2010) 的研究结果相吻合。12 个土壤样品中, 有 9 个土样的肝脏镉相对生物有效性与肾脏镉相对生物有效性间没有显著差异, 且二者有很强的相关性 ($r^2=0.81$; 图 6)。而其他三个土样中, 基于肝脏的 Cd RBA 与肾脏的 Cd RBA 之间则存在显著差异。为增加相对生物有效性测定的准确性, 研究建议将两种或多种生物靶器官结合考虑。例如, 将肝、肾、大腿骨和血液等共同作为生物靶器官来测定土壤中铅的相对生物有效性 (Casteel et al., 2006), 将肾脏和肝脏结合来测定土壤中镉的相对生物有效性 (Juhasz et al., 2010)。

基于此, 本研究选取肝脏和肾脏作为复合生物靶器官。小鼠在不同剂量 CdCl_2 暴露下, 其剂量效应关系与其在复合生物靶器官的富集量呈强相关性 ($r^2=0.99$; 图 4)。基于肝和肾复合生物靶器官计算得到的镉相对生物有效性消除了肾和肝中镉分布不同带来的差异。基于肝肾复合靶器官计算的土壤样品中 Cd 的 RBA 为 36.3–83.8%, 其标准偏差为 5.78%, 远低于肝 (8.99%) 或肾 (7.10%) 的 Cd RBA 的标准偏差 (图 5)。同时, 复合生物靶器官中 Cd RBA 与单一肝或肾中 Cd RBA 之间没有出现显著差异 ($P>0.05$)。这表明, 利用复合生物靶器官有利于消除用单一生物靶器官测定 Cd RBA 造成的差异。

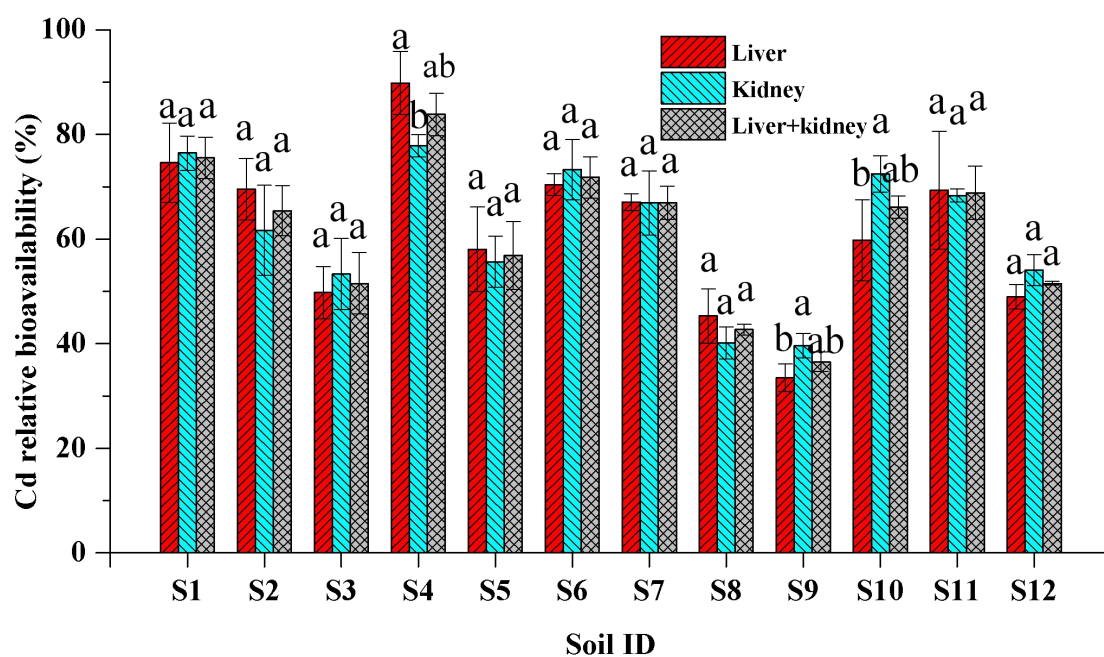


图 5 由肝、肾以及肝+肾脏为生物靶器官测得的 Cd RBA。柱子和误差线代表平均值和三个平行样的标准偏差。每个土样中，不同字母标记表示不

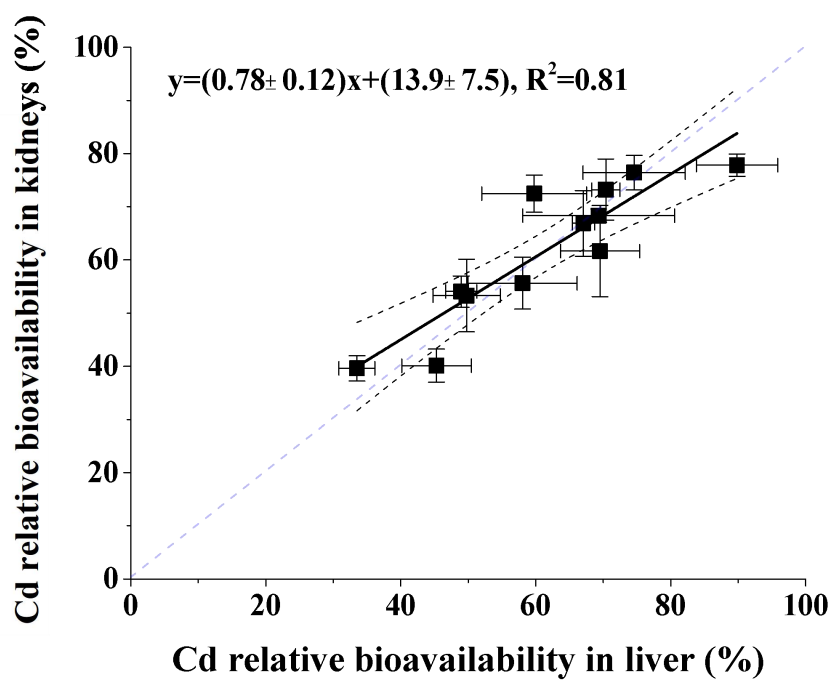


图 6 10 天稳态暴露后，以肝和肾为生物靶器官测定的 Cd RBA 之间相关关系。虚线代表 95%的置信区间。回归方程以 $y = (\text{斜率} \pm \text{标准偏差})x + (\text{截距} \pm \text{标准偏差})$

5.15.3 体外胃肠模拟液测定镉的生物有效性

本研究采用四种常用的体外方法 (UBM、SBRC、IVG 和 PBET) 测定 12 个污染土壤中镉的生物有效性, 测定结果见图 7 所示。如预期一致, 土样和体外方法不同, 镉生物有效性存在明显差异。总体来讲测定的 Cd 生物有效性范围为 18.6–107%。SBRC、UBM、IVG 和 PBET 四种方法胃相的 Cd 生物有效性分别为 59.4–103% (均值 86.5%)、60.9–99.4% (79.0%)、54.4–107% (75.4%) 和 34.7–97.3% (68.9%)。总体而言, 基于 SBRC 方法的镉生物有效性最高, 而 PBET 最低, 可能是由于各方法 pH 值的不同导致的 (Oomen et al., 2002)。Li et al. (2015) 在测定土壤中铅生物有效性时也发现了类似结果。但是, SBRC 胃相的 pH 值 (1.5) 高于 UBM 胃相 (1.2)。所以除了提取液 pH 值外可能还存在其他影响因素。Van de Wiele et al. (2007) 指出固液比越低, 胃相中铅的溶解度越高, 这被 Li et al. (2015) 的研究结果所验证。由于 UBM (固液比为 1:37.5) 中固液比高于 SBRC (1:100), 当二者固液比相同时, Pb 在 UBM 中的生物有效性要明显高于其在 SBRC 中的值 (Li et al., 2015)。本研究中 SBRC、IVG、UBM 和 PBET 四种方法的胃相镉生物有效与文献报道的研究结果一致, 其结果分别为 56–92%、21–96%、8.4–88% 和 53–77% (Tang et al., 2006)。

与肠相相比, 基于胃相的 Cd 生物有效性 (34.8–107%, 平均值为 77.5%) 远大于肠相 (18.6–87.9%, 47.4%; 图 7)。从胃相到肠相, 提取液 pH 值从 1.2–2.5 增加到 5.5–7.0。从而 SBRC、UBM、IVG 和 PBET 四种方法测得的 Cd 生物有效性分别降低至 36.7–77.3%、19.8–56.3%、41.9–87.9% 和 18.6–63.5%。其他学者也发现了类似的规律 (Tang et al., 2006; Juhasz et al., 2010; Wragg et al., 2011)。Juhasz et al. (2010) 通过测定胃肠液中 Cd 和 Fe 浓度发现, 二者有共同的变化趋势, 这表明镉生物有效性的降低可能是由于镉与铁共沉淀或是镉被新形成的铁氧化物吸附引起的。

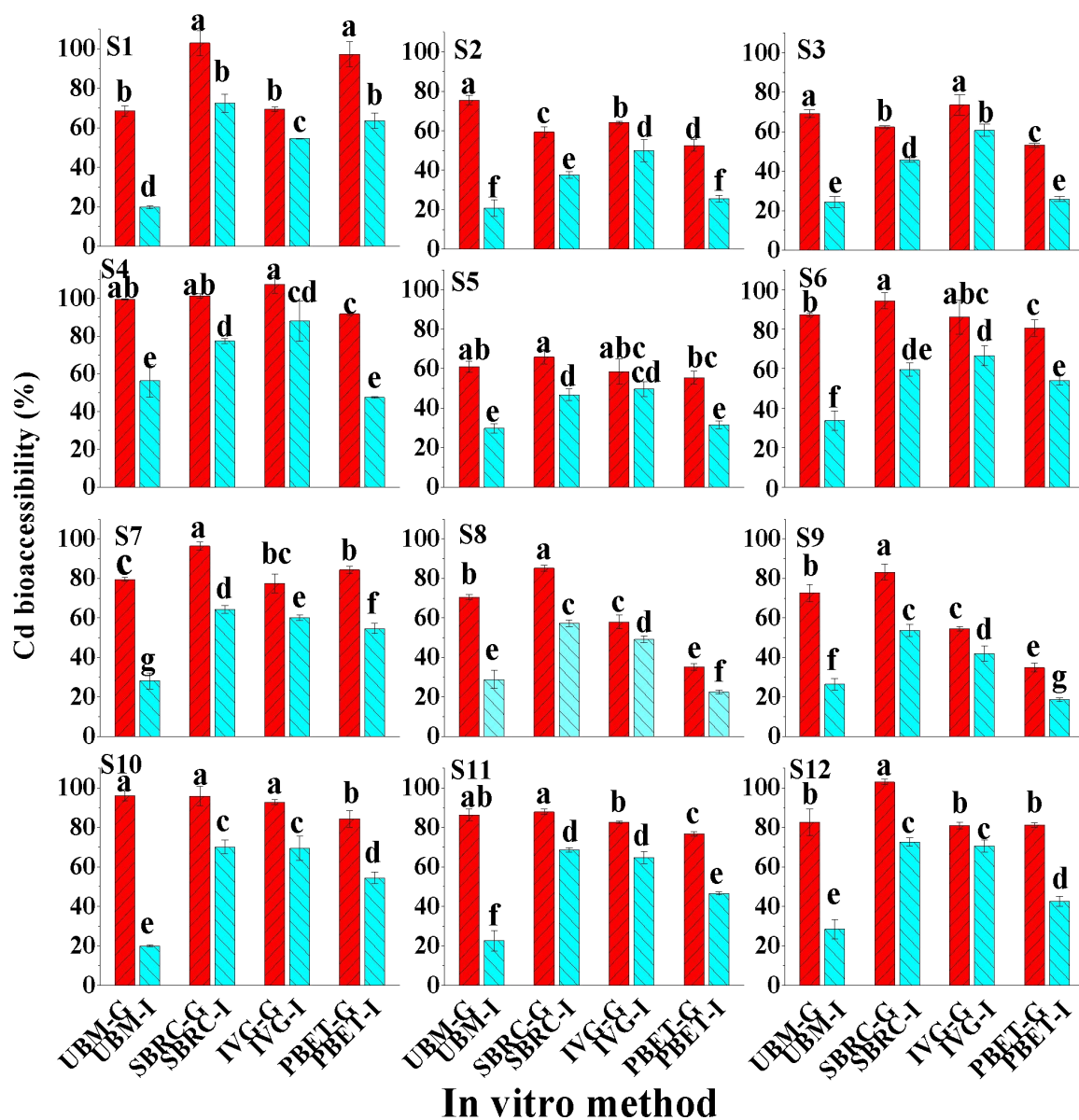
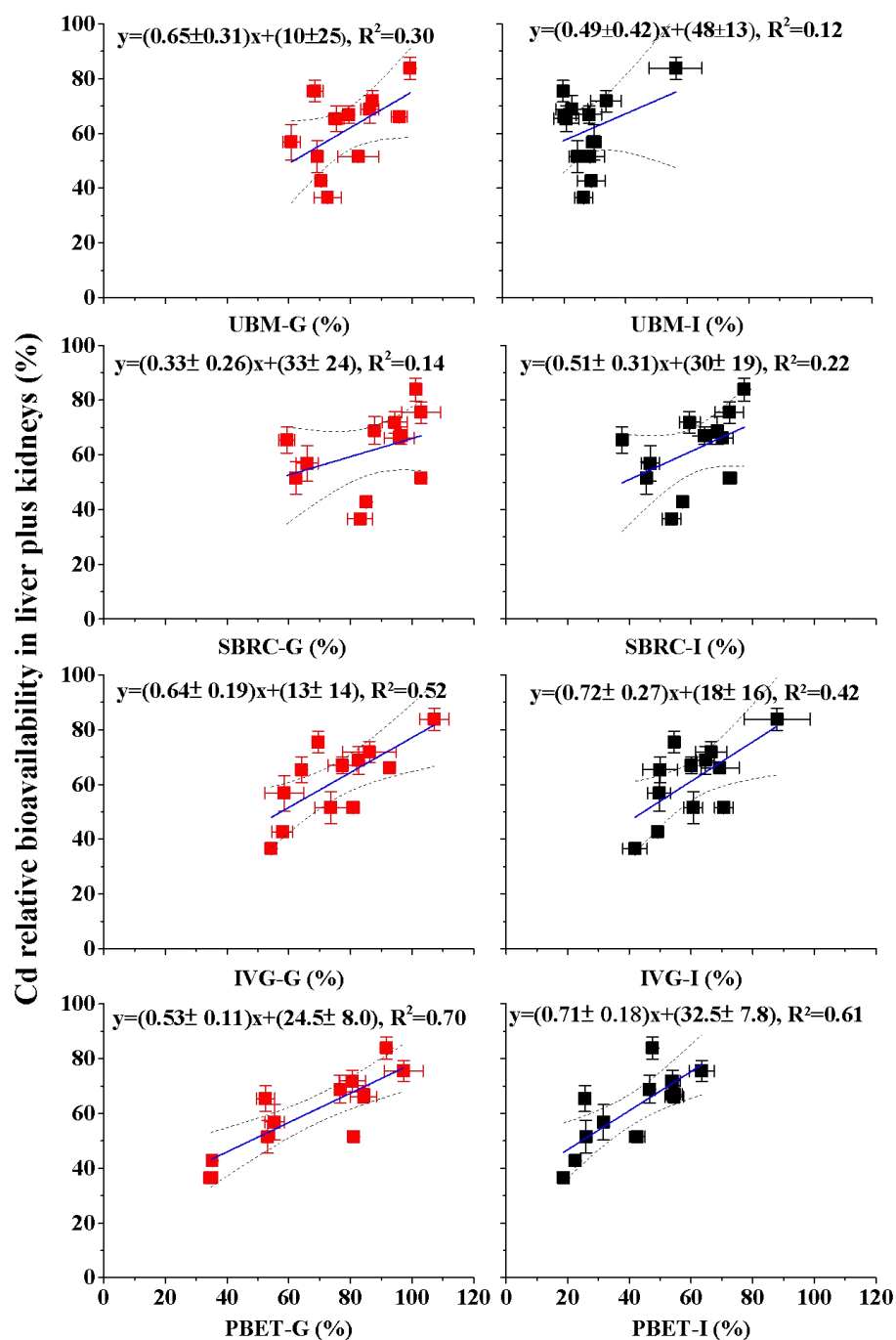


图 7 由 UBM, SBRC, IVG 和 PBET 胃相 (G) 和肠相 (I) 得到 12 个土样中镉生物有效性的对比。柱子和误差线代表平均值和三个平行样的标准偏差。每个土样中平均值用不同字母标记表示不同镉相对生物有效性值间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

5.15.4 最佳体外测试方法的确立



In vitro methods

图 8 基于肝+肾得到的 Cd RBA 与基于 UBM、SBRC、IVG 和 PBET 胃相 (G) 和肠相 (I) 得到的镉生物有效性间的相关关系。回归方程以 $y = (\text{斜率} \pm \text{标准偏差})x + (\text{截距} \pm \text{标准偏差})$ 的形式表示

利用四种体外方法测定的 Cd 生物有效性之间存在明显的差异。为确定这四种体外方法预测土壤中 Cd 相对生物有效性的能力，我们把利用模拟胃肠液测定的 Cd 生物有效性与基于肝+肾作生物靶器官得到的 Cd RBA 进行了相关性分析(图 8)。PBET 中 Cd 生物有效性与 Cd RBA 之间的相关系数最好(胃相 0.70，肠相 0.61)，IVG 次之(胃相 0.52，肠相 0.42)，UBM(胃相 0.30，肠相 0.12) 和 SBRC(胃相 0.14，肠相 0.22) 的相关性较差，且都是胃相优于肠相。四种体外方法中，PBET 得到的相关系数是唯一符合 Wragg et al. (2011) 推荐的标准 ($r^2 > 0.6$) 的方法。Juhasz et al. (2010) 用体外方法和小鼠模型测定 7 个土壤样品的生物有效性和 Cd RBA，并做相关分析发现，PBET(胃相 0.75，肠相 0.83) 要优于 IVG 方法(胃相 0.42，肠相 0.58) 的相关性。然而，Schroder et al. (2003) 研究结果显示 IVG 方法(胃相 0.74，肠相 0.29) 测得的镉生物有效性与用幼猪实验以肾为生物靶器官得到 Cd RBA 相关性更强。Juhasz et al. (2010) 和 Denys et al. (2012) 也报告了，SBRC 方法(胃相 0.58，肠相 0.80) 和 UBM 方法 ($r^2=0.88-0.94$) 测得的 Cd 生物有效性与用小鼠和幼猪实验以肾脏和肝脏为生物靶器官得到 Cd RBA 之间具有良好的相关性。

此外，统计学参数，如截距(接近 0)和斜率(0.8–1.2)也需要考虑在内(Wragg et al., 2011)。IVG 和 PBET 的斜率比 UBM 和 SRBC 更接近 1，其中 IVG 胃相和肠相斜率为 0.62 和 0.72，PBET 为 0.53 和 0.71，UBM 为 0.65 和 0.49，SBRC 为 0.33 和 0.51，而它们的截距范围为 9.77 到 47.7。但考虑到基于 PBET 胃相得到的镉生物有效性与动物实验具有最强的线性相关系数(0.70)和可接受的斜率(0.53)，因此 PBET 胃液提取可能适合污染土壤中镉人体生物有效性的测试。本研究结果表明，PBET 胃液提取具有预测我国污染土壤中镉生物相对有效性的潜能，可推荐成为标准测试方法。

6、与现行标准的协调关系

目前国内无相关技术标准。国际标准：USEPA Method 1340: In vitro Bioaccessibility Assay for Lead in soil 为本标准开发提供了一定的技术依据和参考价值。此标准是利用模拟胃液对土壤中铅的生物有效性进行测定，模拟胃液的成分是 0.43 M 甘氨酸。本标准使用的模拟胃液的成份为 1.25 g/L 胃蛋白酶，0.50 g/L 苹果酸钠，0.50 g/L 醋酸钠，420 μ L/L 乳酸和 500 μ L/L 醋酸，是对土壤中镉的人体生物有效性进行测定。

7、重大分歧依据的处理经过和依据

无。

8、标准实施建议

由江苏省环境科学学会组织，编制单位向各相关单位和相关部门开展规范宣传活动，并积极配合江苏省环境科学学会，做好相关条款的执行与实施准备；组织关于本标准的宣传贯彻培训，以帮助相关单位及技术人员正确理解和应用本标准；选择典型的铅污染场地污染土壤样品开展铅人体生物有效性测试示范，组织相关技术人员进行实地调研和学习，深化对标准条文的理解。

参考文献

- Casteel, S.W., Weis, C.P., Henningsen, G.M., Brattin, W.J., 2006. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using young swine. *Environ. Health Perspect.* 114, 1162-1171.
- Crews, H.M.; Burrell, J.A. McWeeney, D.J. Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1983, 34, 997–1014.
- Denys, S.; Caboche, J.; Tack, K.; Rychen, G.; Wragg, J.; Cave, M.; Jondreville, C.; Feidt, C. In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils. *Environmental Science & Technology* 2012, 46, 6252–6260.
- DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. Soil Quality—Absorption availability of organic and inorganic pollutants from contaminated soil material. DIN E 19738, 2000.
- Juhasz, A.L., Weber, J., Naidu, R., Gancarz, D., Rofe, A., Todor, D., Smith, E., 2010. Determination of cadmium relative bioavailability in contaminated soils and its prediction using in vitro methodologies. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5240-5247.
- Juhasz, A.L.; Weber, J.; Smith, E.; Naidu, R.; Marschner, B.; Rees, M.; Rofe, A.; Kuchel, T.; Sansom, L. Evaluation of SBRC-gastric and SBRC-intestinal methods for the prediction of in vivo relative lead bioavailability in contaminated soils. *Environmental Science & Technology* 2009, 43, 4503–4509.
- Kelley, M.E.; Brauning, S.E.; Schoof, R.A.; Ruby, M. V. Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil; Battelle Press: Columbus, OH, 2002.
- Li, H. B.; Li, M. Y.; Zhao, D.; Li, J.; Li, S. W.; Juhasz, A. L.; Basta, N. T.; Luo, Y. M.; Ma, L. Q. Oral bioavailability of As, Pb, and Cd in contaminated soils, dust, and foods based on animal bioassays: a review. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53, 10545–10559.
- Li, H. B.; Li, M. Y.; Zhao, D.; Li, J.; Li, S. W.; Xiang, P.; Juhasz, A. L.; Ma, L. Q. Arsenic, lead, and cadmium bioaccessibility in contaminated soils: Measurements and validations. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2020, 50, 13, 1303-1338.
- Li, J.; Li, K.; Cave, M.; Li, H. B.; Ma, L. Q. Lead bioaccessibility in 12 contaminated soils from China: Correlation to lead relative bioavailability and lead in different fractions. *J Hazard Mater* 2015, 295, 55–62.
- Li, S. W., Sun, H.; Li, H. B.; Luo, J.; Ma, L. Q. Assessment of cadmium bioaccessibility to predict its bioavailability in contaminated soils. *Environ Int* 2016, 94, 600–606.
- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rempelberg, C.J., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3326-3334.
- Rodriguez, R.R.; Basta, N.T.; Casteel, S.W.; Pace, L.W. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science & Technology*

- 1999, 33, 642–649.
- Ruby, M.V.; Davis, A.; Kempton, J.H.; Drexler, J.W.; Bergstrom, P.D. Lead bioavailability: Dissolution kinetics under simulated gastric conditions. *Environmental Science & Technology* 1992, 26, 1242–1248.
- Ruby, M.V.; Davis, A.; Schoof, R.; Eberle, S.; Sellstone, C.M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science & Technology* 1996, 30, 422–430.
- Schroder, J.L.; Basta, N.T.; Si, J.; Casteel, S.W.; Evans, T.; Payton, M., 2003. In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Relative Bioavailable Cadmium in Contaminated Soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1365-1370.
- Smith, E.; Kempson, I.M.; Juhasz, A.L.; Weber, J.; Rofe, A.; Gancarz, D.; Naidu, R.; McLaren, R.G.; Gräfe, M. In vivo–in vitro and XANES spectroscopy assessments of lead bioavailability in contaminated periurban soils. *Environmental Science & Technology* 2011, 45, 6145–6152.
- Tang, X.Y., Zhu, Y.G., Cui, Y.S., Duan, J., Tang, L., 2006. The effect of ageing on the bioaccessibility and fractionation of cadmium in some typical soils of China. *Environ. Int.* 32, 682-689.
- Wragg, J.; Cave, M.; Basta, N.; Brandon, E.; Casteel, S.; Denys, S.; Gron, C.; Oomen, A.; Reimer, K.; Tack, K.; Van de Wiele, T. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the Total Environment* 2011, 409, 4016–4030.
- Zhao, F.J., Ma, Y., Zhu, Y.G., Tang, Z., McGrath, S.P., 2015. Soil Contamination in China: Current Status and Mitigation Strategies. *Environ. Sci. Technol.* 49, 750-759.
- 林欣颖, 谭祎, 历红波*. 稻米镉积累的影响因素与阻控措施. *环境化学*, 2020, 39, 1530-1543.
- 唐翔宇, 朱永官, 陈世宝. In Vitro 法评估铅污染土壤对人体的生物有效性. *环境化学* 2003, 22, 503–506.
- 唐翔宇, 朱永官. 土壤中重金属对人体生物有效性的体外试验评估. *环境与健康杂志* 2004, 21, 183–185.