

中国科学院生态环境研究中心土壤环境研究室简报

# *In Vitro* 法评估铅污染土壤 对人体的生物有效性<sup>1)</sup>

唐翔宇 朱永官 陈世宝<sup>2)</sup>

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

**摘 要** 采用基于生理学的 *In Vitro* 实验, 测定经口无意摄入的铅污染土壤在人体内的生物有效性. 通过模拟人体的胃和小肠环境, 研究土壤中铅被消化道吸收的最大量. 结果表明, 在铅污染土壤中施加羟基磷灰石后, 铅对人体的生物有效性下降约 20 倍.

**关键词** 土壤, 铅, 污染, 体外实验, 修复.

有关土壤重金属污染的研究, 大多是以土壤-植物系统为切入点, 研究重金属通过食物链进入人体的总量. 但是, 在食物链的重金属摄入量得以有效控制的情况下, 经口无意摄入(手-口直接接触)在很多情况下会成为人体摄入重金属的主要来源. 因此, 非常有必要采取有效方法, 来评估重金属污染土壤对于人体的生物有效性, 为确定土壤重金属的临界值或环境清洁目标值提供可靠的依据.

评估土壤中重金属对人体的生物有效性, 通常有两种方法, 即动物实验 (*In Vitro* or Animal Test) 和体外实验 (*In Vitro* of Physiologically Based Extraction Test). 传统的动物口服毒性实验的结果通常认为是相当可靠的, 但这种方法的应用受到其相对较长的实验周期和较高的实验费用的限制. 许多研究均表明, 基于生理学的 *In Vitro* 实验, 与动物实验的结果表现出良好的相关性<sup>[1]</sup>. 近十年来, 该法不断得以改进和完善, 其应用范围正在日益拓宽.

本文采用人工添加铅的土壤, 应用基于生理学的 *In Vitro* 实验, 分析重金属进入人体消化道后表现的有效性. 与此同时, 还应用该法评价在铅污染土壤中添加羟基磷灰石后, 重金属经口摄入的人体有效性的降低效果.

## 1 实验部分

### 1.1 土壤及试剂

供试土样取自安徽省阜阳市肖口镇居民区附近的黄褐土, pH 值为 8.0, 有机质含量为 1.7%, 全磷含量(以  $P_2O_5$ ) 为 0.13%, 有效磷含量为  $26.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

(1) 居民区土壤 (AH) 人为添加  $10000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  铅(以硝酸铅形态加入), 使铅的总

1) 国家自然科学基金项目 (40235054) 和中国科学院知识创新工程重大方向性项目 (KZCX3-SW-424) 资助.

2) 中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京, 100081.

含量达  $10260\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 稳定 5 个月。(2) 处理土壤 (AH-P) 是在 AH 中人为添加铅稳定培养 2 周后, 再加入相当于  $5000\text{mg}\cdot\text{Pbkg}^{-1}$  的羟基磷灰石, 以期降低铅对人体的可能毒性, 土壤继续稳定达 5 个月。

*In Vitro* 实验材料包括胃蛋白酶 (Porcine Pepsin, 产品号 P7000)、胰酶 (Porcine Pancreatin, 产品号 P1500) 和胆盐 (bile extract, 产品号 B8631), 均为 Sigma 公司产品。

有机酸包括柠檬酸、苹果酸、乳酸和醋酸, 均为分析纯。

## 1.2 实验方法

采用经改造的天津大学无线电厂生产的符合中国药典要求的药物溶出仪为主要组成部分, 建立了由氙气供应系统, 集成了反应器 (6 个)、水浴槽、搅拌器的药物溶出仪, 以及气体流量计和 pH 计组成的基于生理学的 *In Vitro* 实验装置。

本实验主要采用 Ruby 等提出的实验方法<sup>[2]</sup>, 并参考 Rodriguez 等的方法<sup>[3]</sup>, 进行了改进, 具体实验步骤如下。

### 1.2.1 胃阶段

每批样品配制模拟胃液 4L (内含  $0.15\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl), 加入柠檬酸 2g, 苹果酸 2g, 乳酸 1.68ml, 冰乙酸 2ml, 用  $12\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl 将 pH 值调到 1.5, 再加入胃蛋白酶 5g, 然后在 6 个反应器加入 600ml 模拟胃液。在各反应器中加入过 0.25mm 筛的待测土壤 6g, 在反应液中以  $1\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  通入氙气创造厌氧环境,  $100\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  搅动 1h。然后用针筒吸取 20ml 反应液,  $10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心, 0.45 $\mu\text{m}$  过滤, 采用原子吸收法分析滤液中的铅含量。

### 1.2.2 小肠阶段

用  $\text{NaHCO}_3$  饱和溶液将反应液的 pH 值调至 8, 在每个反应器中加入胰酶 0.36g, 胆盐 1.2g, 以  $1\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  通入氙气,  $100\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  搅动 4h。每隔 15min 测定反应液 pH 值, 若升高, 滴加  $12\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl 维持 pH 值为 8.0。4h 后吸取 20ml 反应液, 离心, 0.45 $\mu\text{m}$  抽滤, 采用火焰原子吸收法测定滤液的铅水平。

## 1.3 计算

在胃阶段或小肠阶段的生物有效性 (生物可给性) 可由下式计算:

$$\text{BA} = \frac{C_{IV}V_{IV}}{C_S M_S} \times 100 \quad (1)$$

式中, BA 为特定重金属的生物可给性 (%);  $C_{IV}$  是 *In Vitro* 实验的胃阶段或小肠阶段反应液中特定重金属的可溶态总量 ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ );  $V_{IV}$  为各反应器中反应液的体积 (l);  $C_S$  是土壤样品中特定重金属的总量 ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ );  $M_S$  为加入反应器中的土样的重量 (kg)。

## 2 结果与讨论

由表 1 数据, 采用式 (1), 可计算得到土壤在胃和小肠中的生物可给性。结果表明: 对照土壤 AH 在胃阶段中铅的生物可给性为 91.4%, 而小肠阶段则为 20.1%。由此可见, 铅在胃阶段的生物可给性相当高, 这可能主要与其强酸性环境导致铅活性提高有关; 到了小肠阶段, 由于 pH 值上升到微碱性, 可溶态铅含量明显下降。

表 1 *In Vitro* 实验模拟胃肠液的可溶态铅浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )

Table 1 Bioaccessible Pb concentration in simulated gastro intestinal digestive solutions

土 壤	模拟胃阶段反应液的铅浓度	模拟小肠阶段反应液的铅浓度
对照土壤(AH)	93.8	20.6
处理土壤(AH-P)	92.4	1.1

对于加入羟基磷灰石的 AH-P 而言, 胃阶段铅的生物可给性与 AH 相近, 为 90.1%, 羟基磷灰石的加入并未起到降低铅在胃中可能毒性的作用; 值得注意的是, 在小肠阶段, 羟基磷灰石的加入大大降低了可溶态铅的含量, 生物可给性降低至 1.1%。这可能与磷氯铅矿( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ) 沉淀的形成有关<sup>[4]</sup>。

由于人体胃的吸收能力是相当弱的, 吸收过程主要发生在小肠阶段, 羟基磷灰石的加入对于降低人体的主要吸收器官——小肠对铅的吸收起到非常显著的作用, 铅在小肠阶段的生物可给性降低约 20 倍。

据研究, 儿童经口无意的土壤摄入量可达  $50-200\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ <sup>[5-7]</sup>。长期摄入过量重金属, 无疑会对人体健康产生严重的危害。以 Pb 为例。据报导, 经口直接摄入污染土壤和尘土是儿童吸收铅的主要途径<sup>[8-10]</sup>。*In Vitro* 实验有效地模拟了人体的胃肠环境, 所以, 其结果能有效地表征经口无意摄入的土壤所含重金属的生物可给性, 也就是可能被人体真正吸收的最大量。因此, 运用 *In Vitro* 实验来快速筛选重金属生物可给性较高的污染土壤是非常有意义的。

*In Vitro* 实验系统还可与目前常用于药物的人体吸收评估的 Caco-2 细胞吸收器结合<sup>[11]</sup>, 这样, 不仅测定重金属的生物可给性, 而且可以进一步分析其绝对生物有效性(即土壤重金属被人体吸收的量占口服摄入总量的比例)。

### 3 结论

(1) *In Vitro* 实验表明, 羟基磷灰石的加入能非常有效地降低土壤铅在人体(主要是小肠)内的吸收量, 其修复效果是相当好的。

(2) 采用基于生理学的 *In Vitro* 实验, 为污染土壤的筛选和可能毒性的快速评估提供了一种非常有效的手段。

### 参 考 文 献

- [1] Ruby M V, Schoof R., Brattin W et al., Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science and Technology*, 1999, **33** (21): 3697-3705
- [2] Ruby M V, Davis A, Schoof R et al., Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science and Technology*, 1996, **30** (2): 422-430
- [3] Rodriguez R R, Basta N T, Casteel S W et al., An *In Vitro* Gastrointestinal Method to Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science and Technology*, 1999, **33** (4): 642
- [4] Ma Q Y, Traina S J, Logan T J, In Situ Lead Immobilization by Apatite. *Environmental Science and Technology*, 1993, **27**: 1803-1810

- [ 5 ] Davis S, Waller P, Quantitative Estimates of Soil Ingestion in Normal Children Between the Ages of 2 and 7 Years: Population-Based Estimates Using Aluminium, Silicon, and Titanium As Soil Tracer Elements. *Arch Environ Health*, 1990, **45** 112—122
- [ 6 ] Van Wijnen J H, Clausing P, Brunekreef B, Estimated Soil Ingestion by Children. *Environ. Res.*, 1990, **51** 147—162
- [ 7 ] Calabrese E J, Stanek E J, James R C et al., Soil Ingestion. A Concern for Acute Toxicity in Children. *J Environ Health*, 1999, **61** 18—23
- [ 8 ] Healy M A, Harrison P G, Aslam M et al., Lead Sulphide and Traditional Preparations: Routes for Ingestion, Solubility and Reactions in Gastric fluid. *Journal of Clinical Hospital Pharmacy*, 1982, **7** 169—173
- [ 9 ] Xintaras C, Analysis Paper: Impact of Lead Contaminated Soil on Public Health. US Department of Health and Human Services Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1992, Atlanta Georgia 30333 USA
- [ 10 ] USEPA, Guidance Manual for the Integrated Exposure Uptake Biokinetic Model for Lead in Children (IEUBK). Prepared by the Technical Review Workgroup for Lead for the Office of Emergency and Remedial Response, USEPA. Publication Number 9285 7 15 1 EPA 540-R 93-081 PB93-963510, with Document Production Assistance from Envir. Criteria and Assessment Office, USEPA, 1994, Research Triangle Park, NC 27711
- [ 11 ] Oomen A G, Tolls J, Sips A J A M et al., *In Vitro* Intestinal Lead Uptake and Transport in Relation to Speciation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, **44** 116—124

## ASSESSMENT OF LEAD BIOACCESSIBILITY IN CONTAMINATED SOIL USING *IN VITRO* TEST

TANG Xiang-yu      ZHU Yong-guan      CHEN Shi-bao<sup>1)</sup>

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085)

### ABSTRACT

Physiologically based *In Vitro* test was used to estimate Pb bioaccessibility of inadvertently ingested soil in human. The maximum Pb absorption by human was assessed in an artificial system of human gastro-intestinal environment. Results showed that the addition of hydroxyapatite to Pb contaminated soil could significantly reduce the Pb oral bioaccessibility in human by a factor of 20.

**Keywords:** soil, lead, contamination, *In Vitro* test, remediation.

---

1) Institute of Soil Science and Fertilizer, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081.