

Test for human bioopløselighed af jordforureninger

Christian Grøn, Olaf W. Asmussen & Lise Samsøe-Petersen

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
1 INDLEDNING	15
1.1 BAGGRUND	15
1.2 FORMÅL	15
1.3 AFGRÆNSNING	16
1.4 RAPPORTENS OPDELING	16
2 TIDLIGERE OFFENTLIGGJORTE UNDERSØGELSER AF <i>IN VIVO - IN VITRO</i> SAMMENHÆNG	17
2.1 BENYTTET <i>IN VITRO</i> TEST METODER	17
2.2 BENYTTET <i>IN VIVO</i> UNDERSØGELSESMETODER	19
2.3 SAMMENHÆNG <i>IN VITRO - IN VIVO</i> , BLY	22
2.4 SAMMENHÆNG <i>IN VITRO - IN VIVO</i> , CADMIUM	24
2.5 SAMMENHÆNG <i>IN VITRO - IN VIVO</i> , NIKKEL	25
2.6 SAMMENHÆNG <i>IN VITRO - IN VIVO</i> , PAH	25
2.7 SAMMENHÆNG <i>IN VITRO - IN VIVO</i> GENERELT	26
3 DOSERINGSFORM I TOKSIKOLOGISKE STUDIER	28
3.1 GRUNDLAG FOR JORDKVALITETSKRITERIERNE	29
3.2 BLY	29
3.3 CADMIUM	30
3.4 NIKKEL	31
3.5 PAH FORBINDELSER	32
3.6 VALG AF REFERENCEBETINGELSER	33
4 VALG AF TESTS OG TESTBETINGELSER	35
4.1 TESTMETODE OG -BETINGELSER	35
4.1.1 <i>Testmetode principper</i>	36
4.1.2 <i>Fødetilsætning</i>	37
4.1.3 <i>Fordøjelsessegmenter</i>	37
4.1.4 <i>Praktisk testudførelse</i>	38
4.1.5 <i>Valg af testmetode og betingelser</i>	38
4.1.6 <i>Krav til testkvalitet</i>	39
4.2 ANALYSER AF JORD OG TESTOPLØSNINGER	40
4.2.1 <i>Valg af analysemetoder</i>	40
4.2.2 <i>Krav til analysekvalitet</i>	41
4.2.3 <i>Opnået kvalitet af analyser af jord</i>	41
4.2.4 <i>Opnået kvalitet af analyser af testopløsninger</i>	47
4.3 KVALITETSKONTROL AF ANALYSER OG TESTS	48
4.4 FORBEHANDLING AF JORD	49

5	AFPRØVNING AF RIVM TESTMETODER	52
5.1	TEST FOR METALLERS BIOOPLØSELIGHED	52
5.2	TEST FOR PAH'S BIOOPLØSELIGHED	54
5.3	VARIATIONER I TEST PH	57
5.4	VARIATIONER I TESTBETINGELSER FOR PAH	60
6	TEST AF JORD FRA FORURENEDE, DANSKE LOKALITETER	61
6.1	AFPRØVNINGSLOKALITETER	61
6.2	PRØVETAGNING OG FORBEHANDLING	62
6.3	TOTALINDHOLD AF JORDFORURENINGER	65
6.4	BIOOPLØSELIGHED AF JORDFORURENINGER	66
7	TEST AF PRØVER MED <i>IN VIVO</i> MÅLT BIOTILGÆNGELIGHED EFTER RIVM	71
7.1	IDENTIFIKATION OG HJEMHENTNING AF JORDPRØVER	71
7.2	ENSARTETHED AF INDHENTEDE PRØVER	72
7.3	TEST AF HJEMHENTEDE PRØVER MED RIVM <i>IN VITRO</i> METODER	73
7.3.1	<i>Bly</i>	74
7.3.2	<i>Cadmium</i>	80
7.3.3	<i>Nikkel</i>	82
7.3.4	<i>PAH</i>	83
8	TEST AF PRØVER MED <i>IN VIVO</i> BIOTILGÆNGELIGHED EFTER ANDRE METODER	87
8.1	TEST AF HJEMHENTEDE PRØVER MED RIVM FASTENDE UDEN TARM SEGMENT	88
8.1.1	<i>Bly</i>	88
8.1.2	<i>Cadmium</i>	90
8.2	TEST AF HJEMHENTEDE PRØVER MED SBRC	91
8.2.1	<i>Bly</i>	92
8.2.2	<i>Cadmium</i>	93
8.3	SAMMENLIGNING AF BIOOPLØSELIGHEDSDATA OPNÅET MED FORSKELLIGE TESTMETODER FOR DE HJEMHENTEDE PRØVER	95
8.3.1	<i>Bly</i>	95
8.3.2	<i>Cadmium</i>	97
8.4	TEST AF DANSKE JORDPRØVER MED RIVM FASTENDE UDEN TARM SEGMENT OG SBRC	98
9	VURDERING OG ANBEFALINGER	100
9.1	<i>IN VIVO</i> OG <i>IN VITRO</i> METODER	100
9.2	DOSERINGSREFERENCE	101
9.3	VALG AF TESTS OG TESTBETINGELSER	102
9.4	AFPRØVNING AF RIVM TESTMETODER	102
9.5	TEST AF JORD FOR FORURENEDE DANSKE GRUNDE MED RIVM METODERNE	103
9.6	RIVM TEST AF PRØVER MED <i>IN VIVO</i> MÅLT BIOTILGÆNGELIGHED	104
9.7	TEST MED ANDRE METODER AF PRØVER MED <i>IN VIVO</i> MÅLT BIOTILGÆNGELIGHED	104
9.8	ANVENDELSE AF TEST FOR BIOOPLØSELIGHED I RISIKOVURDERING	105
10	REFERENCER	109

Bilag A
Test for bioopløselighed af metaller fra jord, Metodebeskrivelse

Bilag B
Test for bioopløselighed af PAH fra jord, Metodebeskrivelse

Bilag C
Betingelser i bioopløselighedstest

Bilag D
Prøveforbehandling af testopløsninger

Forord

Projektet **human tilgængelighed af forureninger i jord** er iværksat under Miljøstyrelsens teknologiprogram for jord- og grundvandsforurening. Supplerende jordanalyser er finansieret af Amternes Videncenter for Jordforurening.

Projektets formål har været at afprøve laboratorietestmetoder (**in vitro**) til undersøgelse af udvalgte jordforureningers opløselighed i menneskets mave-tarmsystem (bioopløselighed) med henblik på anvendelse af disse testmetoder i risikovurdering af jordforurening, herunder at undersøge sammenhængen imellem jordforureningers bioopløselighed som bestemt ved **in vitro** tests og deres biotilgængelighed som bestemt ved **in vivo** forsøg med dyr.

Projektet er udført af DHI – Institut for Vand og Miljø af:

Christian Grøn
Lise Samsøe-Petersen
Olaf W. Asmussen

Kemiske analyser er udført af Eurofins Danmark A/S, mens analyser for tekstur og humus er udført af Steins Laboratorium A/S.

Projektet har været fulgt af en følgegruppe med medlemmerne:

Irene Edelgaard, Miljøstyrelsen
Christina Ihlemann, Miljøstyrelsen
Anne Krag, Fyns Amt
Charlotte Weber, Amternes Videncenter for Jordforurening
John Jensen, Danmarks Miljøundersøgelser
Ole Ladefoged, Danmarks Fødevareforskning
Mariam Wahid, Miljøkontrollen (indtil 1. maj 2004)
Annette Bech Nielsen, Miljøkontrollen (fra 1. maj 2004)
Arne Scheel Thomsen, Embedslægeinstitutionen, Københavns Amt (maj 2004)
Henrik Hansen, Embedslægeinstitutionen, Vejle Amt (fra 1. januar 2004)
Anders Carlsen, Embedslægeinstitutionen, Viborg Amt (indtil 1. januar 2004)

Til projektet er modtaget jordprøver fra:

Stan Casteel, University of Missouri
Mike Ruby, Exponent
Nick Basta, Ohio State University
William Brattin, Syracuse Research Corporation
Agnes Oomen, National Institute for Public Health and the Environment
Jürgen Wittsiepe, Ruhr-Universität Bochum
Eric Weyand, Maple City Research Inc.
National Institute of Standards & Technology

Sammenfatning og konklusioner

Jordforureningers biotilgængelighed for mennesker efter oral eksponering varierer med forureningsart, -kilde og -alder, jordtype m.v. , ligesom jordforureningers biotilgængelighed for og toksicitet overfor mikroorganismer, planter og dyr varierer.

Grænser for jords indhold af forureninger er oftest sat ud fra giftighed overfor dyr eller baserede på målinger af optag i mennesker fundet i forsøg med forureninger tilført i ren form og dermed uden begrænsninger i biotilgængelighed. Derfor er der behov for at inddrage jordforureningers biotilgængelighed ved formulering og/eller håndhævelse af grænseværdier baseret på risiko ved oralt optag.

Der benyttes en række forskellige *in vivo* metoder til at måle stoffers orale biotilgængelighed i forsøgsdyr, men metoderne er omkostningskrævende, behæftede med betydelig variabilitet og kan give anledning til etiske diskussioner vedrørende anvendelse af forsøgsdyr.

Der benyttes en række forskellige *in vitro* metoder til i laboratoriet at måle stoffers bioopløselighed i det humane mave-tarm system som et mål for stoffernes højeste mulige orale biotilgængelighed. Disse metoder er mindre omkostningskrævende, men også behæftede med variabilitet, og deres anvendelighed afhænger af en god sammenhæng med optaget af stoffer i mennesker.

Med udgangspunkt i konkrete krav til udformning og ydelse af testmetoder til bestemmelse af human bioopløselighed af jordforureninger er udvalgt 2 testmetoder til første afprøvning i Danmark. Begge testmetoder er valgt for at give realistiske men forsigtige mål for udvalgte forureningers (metallerne cadmium, nikkel og bly, samt PAH forbindelserne benzo(a)pyren og dibenz(a,h)anthracen) bioopløselighed. Formålet har været anvendelse i forhold til kvalitetskriterier etableret med udgangspunkt i oralt optag. Metoden til test for metalleres bioopløselighed (RIVM fastende) er udformet for at svare til forholdene hos et fastende barn, mens metoden til test for PAH (RIVM efter måltid) er udformet for at svare til forholdene hos et barn efter måltid. RIVM metoderne indeholder mund/spiserør, mave og tarm segmenter og tilstræber at simulere fysiologiske forhold i menneskets mave-tarmsystem.

De 2 testmetoder er etablerede og afprøvede i Danmark, og afprøvningen viste på de fleste punkter en tilstrækkelig testkvalitet til vurdering af bioopløselig koncentration af de udvalgte jordforureninger i forhold til kvalitetskriterier. Testmetoderne er vedlagt i bilag. I rapporten er formuleret nødvendige krav til testkvalitet og til kvalitet af analyser af testopløsninger, samt til løbende kvalitetskontrol af testene. Testudførelsen og de tilknyttede kemiske analyser har overvejende opfyldt kvalitetskravene. Det har for RIVM fastende metoden vist sig nødvendigt at gennemføre analyser af testopløsninger som "straksanalyser" af ukonserverede men syrefortyndede prøver, samt at foretage en beregning af relativ bioopløselighed, der inkluderer slut pH i tarm segmentet. Endvidere har RIVM fastende testen særligt for bly

udvist en for høj variabilitet med længere tid imellem testserierne og imellem forskellige laboratorier (manglende robusthed af testen).

Testen forudsættes anvendt til at beregne jordforureningers bioopløselighed relativt til bioopløseligheden af de samme stoffer i de toksikologiske undersøgelser, som ligger bag kvalitetskriterierne. Derfor er ud fra de toksikologiske baggrundsoplysninger givet forslag til toksikologiske referencer, som efter afprøvningen er forenklet.

Jordprøver fra 7 danske lokaliteter hver med forskellige forureningskilder og – historie er udtaget og testet med metoderne. Resultaterne viser lavere eller betydeligt lavere bioopløselige koncentrationer end total koncentrationer (faktor 1-20 afhængig af forurening og lokalitet) af næsten alle de undersøgte forureninger (de nævnte metaller og PAH) og for næsten alle undersøgte lokaliteter. Undersøgelserne giver ikke mulighed for at angive relative bioopløseligheder til generel anvendelse for bestemte forureninger og/eller kilder. For bly kan den benyttede test metode have betydet, at bioopløseligheden for 4 af de 6 lokaliteter blev anslået for lavt, se nedenfor.

Variabiliteten af jordens indhold af bioopløselige forureninger var af samme størrelsesorden som variabiliteten af total indhold af forureninger. Samme fremgangsmåde ved kontrol af jordforurening i forhold til kriterieværdier kan derfor anvendes for de to størrelser.

For bly og cadmium er i tidligere offentliggjorte undersøgelser fundet god sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed, men sammenhængen afhænger både af *in vitro* metode og *in vivo* metode, særligt hvad angår bly. For nikkel og PAH er datamaterialet utilstrækkeligt.

Der er i denne undersøgelse foretaget *in vitro* test af i alt 66 jordprøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata fra tidligere undersøgelser. Heraf er 49 prøver testet med metoden RIVM fastende for metaller og 17 prøver med RIVM metoden efter måltid for PAH.

For cadmium blev med denne metode fundet tilfredsstillende sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed (lineær sammenhæng og *in vitro* resultater af samme størrelsesorden som *in vivo*).

For bly blev med denne metode ikke fundet en tilfredsstillende sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed (non-lineær sammenhæng og *in vitro* resultater lavere end *in vivo*). Som årsager til den utilfredsstillende sammenhæng *in vitro* til *in vivo* for bly blev identificeret for høj og ustabil pH efter testens mave segment og efter tarm segment, samt udfældning af bly med jordkomponenter.

For nikkel og PAH er ikke fundet tilstrækkeligt mange *in vivo* data til at vurdere *in vitro* til *in vivo* sammenhængen.

For alle undersøgelsens forureningsstoffer undtagen bly er fundet tilfredsstillende sammenhæng imellem den her benyttede *in vitro* metodes resultater og andre *in vitro* metoders resultater (lineær sammenhæng og *in vitro* resultater af samme størrelsesorden som andre metoders). For bly er fundet en lineær sammenhæng med resultater bestemt ved de fleste andre metoder, men lavere resultater med RIVM metoden i denne undersøgelse.

På grund af den utilfredsstillende sammenhæng *in vitro* til *in vivo* for bly efter RIVM fastende metoden er test af bly og cadmium supplerende afprøvet i en modifikation af RIVM fastende metoden, samt i den alternative SBRC metode. I RIVM fastende modifikationen er tarm segmentet udeladt af testen, idet dette var identificeret som hovedårsag til utilfredsstillende *in vitro* til *in vivo* sammenhæng, men ellers var RIVM fastende testen uændret. SBRC metoden omfatter et simpelt mave lignende segment med lav pH og høj bufferkapacitet for syren. Det skal bemærkes, at der for de 2 alternative test metoder ikke er foretaget en vurdering af test kvalitet af omfang som for de to RIVM test metoder.

For cadmium viste de 2 alternative test metoder, RIVM fastende uden tarm segment og SBRC, ikke forbedret lineær sammenhæng imellem *in vitro* resultater og *in vivo* resultater. For bly viste SBRC lineær sammenhæng men med relativt høje *in vitro* resultater, sammenholdt med *in vivo* resultaterne. RIVM fastende uden tarm segment viste lineær sammenhæng og mere realistiske *in vitro* værdier, når resultaterne for test af jordprøver med for høj pH i testopløsningerne blev udelukket. RIVM fastende uden tarm segment viste lineær sammenhæng med andre *in vitro* testmetoder for cadmium, men ikke for bly (kun det komplette datasæt inklusive pH afvigende prøver kunne vurderes), mens SBRC metoden netop opfyldte kravet til lineær sammenhæng for bly, men ikke for cadmium.

På den baggrund vurderes det, at RIVM fastende metoden kan benyttes til at beregne den bioopløselige koncentration af cadmium (test med tarm segment) og bly (test uden tarm segment) i forurenede jord, som derefter kan benyttes direkte til at holde op imod kriterieværdier. Hvis testopløsningens pH ikke opfylder de specificerede krav, skal testen gentages med en mindre mængde jord. Det vurderes desuden, at test for bioopløselighed kun kan udføres kvalitativt for nikkel og PAH, indtil til flere jordprøver med *in vivo* data for biotilgængelighed foreligger. Bioopløseligheden af nikkel eller PAH i en jordprøve kan således indtil videre kun tolkes relativt, dvs. til at sige at nikkel eller PAH i en testet jordprøve er mere eller mindre biotilgængelig end i en anden jordprøve eller i en toksikologisk reference, men dokumentationen er ikke tilstrækkelig til at tillade en beregning af en bioopløselig koncentration til at holde op imod en kriterieværdi.

For at sikre et tilstrækkeligt grundlag for vurdering af bioopløselig koncentration af jordforureningerne anbefales et undersøgelsesprogram svarende til det benyttede i denne undersøgelse med test af mindst 5 jordprøver per grund og med beregning af bioopløselig koncentration separat for hver prøve. Det foreslås at udarbejde en vejledning i konkret anvendelse af test for bioopløselighed i risikovurdering på baggrund af resultaterne af dette projekt.

Det foreslås at tilvejebringe redskaber for kvalitetssikring af test for human bioopløselighed ved at anvise en homogen og stabil kontrolprøve, samt at dele kontrolprøven med udenlandske laboratorier med henblik på kobling af testresultater til resultater fra dyreforsøg til fastlæggelse af biotilgængelighed.

En indsamling af data for jordforureningers bioopløselighed opnået med testmetoderne foreslås med henblik på efter en periode at vurdere muligheden for at give generelle faktorer for bioopløselighed af jordforureninger for bestemte forureninger og/eller kilder. I den forbindelse kan ligeledes foretages en vurdering af variationen i bioopløselighed på grunde med varierende forureningskilde.

Den overordnede konklusion er, at der foreligger én testmetode, der med variationer er anvendelig til måling af relativ bioopløselighed af bly, cadmium og nikkel fra jord, og én anden beslægtet testmetode anvendelig for PAH. For bly og cadmium kan testene anvendes kvantitativt i risikovurdering, hvor bioopløselige koncentrationer af jordforureningerne bly og cadmium for hver enkelt grund kan kontrolleres overfor kvalitetskriterier for forurenede jord, mens resultaterne for nikkel og PAH indtil videre alene kan benyttes relativt, dvs. til at beskrive én jord som mere risikabel end en anden.

Summary and conclusions

The effects of soil contaminants upon both the soil environment and humans depend upon the bioavailability of the contaminants from the soil. On the other hand, maximum contaminant limits are generally based upon toxicity studies with animals or uptake studies with humans exposed to the contaminants in their most soluble form. Therefore, there is a need for methods to estimate the bioavailability of soil contaminants to humans after **eg** oral exposure.

A variety of **in vivo** methods have been used for estimation of the bioavailability of soil contaminants in experimental animals, but all are expensive, subject to considerable random and systematic errors, and may impose ethical considerations regarding the pertinence of using experimental animals for the purpose.

Also, a variety of **in vitro** methods have been introduced to estimate the bioaccessibility of soil contaminants in laboratory tests, **eg** the dissolution of the contaminants in the human gastrointestinal tract, as an indicator of **in vivo** bioavailability. These methods are also subject to random and systematic errors, but they are less costly and without the ethical problems. A crucial point for the applicability of the **in vitro** methods is that they must give bioaccessibilities that are well correlated to accepted **in vivo** bioavailabilities.

Initially, two methods designed to test the human bioaccessibility of soil contaminants were selected for implementation and validation in order to evaluate their use in controlling Danish soil quality criteria based upon oral uptake. The methods are based upon physiologically representative conditions and are designed to yield "worst case realistic" (**ie**: cautious) estimates of bioaccessibility. Methods developed by RIVM mimicking the conditions in a fasting child have been selected for testing the selected heavy metals (cadmium, lead and nickel), and mimicking the conditions in a child after meal for the polycyclic aromatic hydrocabons benzo(a)pyrene and dibenzo(a,h)anthracene.

Test validation demonstrated a sufficient test quality for the intended purpose at most points. The test methods are enclosed as appendices (in Danish), and requirements for the quality and quality control of analyses and tests are presented in the report. The test performance was satisfactory and compliant with requirements set earlier, but with an indication of too high between-series variation, in particular for lead. Adjustments of the test method with respect to analysis of test solutions and calculation of bioaccessibility relative to a pH dependent reference were suggested.

In order to enable calculation of the bioaccessibility relative to a toxicological reference (the form of the contaminants used in toxicological studies behind the soil quality criteria), suggestions for such references are included.

The RIVM tests have been employed with contaminated soils from seven sites, each representing different sources of contamination. The bioaccessible concentrations were in almost all cases lower or significantly lower (up to a

factor of 20) than the "total" soil contaminant concentrations. The data did not allow for derivation of generic bioaccessibility factors for specific contaminants and/or sources.

The variability of the bioaccessible concentrations of soil contaminants over the sites was of the same order of magnitude as the variability of the "total" concentrations of soil contaminants. Bioaccessible concentrations can accordingly be used similarly to "total" concentrations in controlling soil quality criteria.

In previously published studies, a good correlation has been found for lead and cadmium between *in vitro* bioaccessibility and *in vivo* bioavailability. For nickel and PAH, only very few *in vivo* bioavailability data have been published.

In this study, soil samples with *in vivo* bioavailability data obtained in other studies have been tested for *in vitro* bioaccessibility of the metals: cadmium, lead and nickel (49 samples), and the PAH: benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene (17 samples). Heavy metals were initially tested using the fasted state method and PAH using the fed state method, both developed by RIVM to simulate the physiological conditions in the human gastrointestinal tract and including mouth/oesophagus, gastric and intestinal steps.

For cadmium, the correlation *in vitro* to *in vivo* was satisfactory, but not for lead. For nickel and PAH, the *in vivo* data were insufficient to evaluate the correlation. The *in vitro* test results obtained in this study correlated well with *in vitro* data obtained in other studies with other methods, except for lead, where the RIVM fasted state method gave low results.

The poor *in vitro* to *in vivo* correlation for the RIVM fasted state method lead data were attributed to the high and insufficiently stable pH in the stomach and intestinal segment of the test, as well as to a lead-precipitating effect of other soil constituents.

Accordingly, two other test methods were subsequently applied to soil samples with *in vivo* bioavailability data from other studies: the RIVM fasted state without the intestinal step and the SBRC method (a simple test simulating stomach dissolution at low pH and high buffering capacity). Here the SBRC provided adequate correlation and high values for lead, but unsatisfactory correlation for cadmium. The RIVM fasted state without intestinal segment provided adequate correlation for both lead (only test results with pH in the test solution below the required maximum of 1.8) and cadmium, but high values for cadmium.

In conclusion, it is recommended to apply the *in vitro* RIVM fasted state test method for cadmium and the same test method without the intestinal step for lead for quantitative estimates of the bioavailability for oral exposure. If the pH values in the test solutions are not within specified limits, the test must be repeated with smaller amounts of soil. Furthermore, it is recommended to apply the *in vitro* fasted state method from RIVM and the RIVM fed state method for qualitative assessments of the bioavailability of nickel and PAH from soil, respectively.

An investigation program including as a minimum testing of five soil samples from each site is suggested, giving relative bioaccessibilities, “total” concentrations and bioaccessible concentrations of the contaminants for each sample (site-specific application of bioaccessibility). It is recommended to prepare a guideline for the use of bioaccessibility tests in site-specific risk assessments based upon the results obtained in this project.

In order to facilitate the implementation and quality control of the tests in practical use, it is suggested to identify stable and homogenous control material to be used by the test laboratories for routine quality control. It is also suggested to share the control material with laboratories outside Denmark in order to enable comparison of data among laboratories and potential correlation to bioavailability data obtained in animal studies. Finally, it is suggested to collect data from using the tests over a trial period in order to evaluate subsequently whether generic bioaccessibility factors can be derived for specified soil contaminants or contaminant sources. An evaluation of the variation of bioaccessibilities over sites with varying sources of soil contamination can be made simultaneously.

The general conclusion is that correction of soil cadmium and lead concentrations for relative bioaccessibility in evaluation of compliance with soil quality criteria and cleanup levels based upon reduced bioavailability/bioaccessibility of the contaminants may be recommended in site-specific risk approach. Conversely, the data available at present do not allow for general regulation of soil quality criteria and cleanup levels for specific contaminants, soil types or sources. One test can, with modifications, be used for measuring cadmium, lead and nickel bioaccessibility, and another, but similar, test for PAH. However for nickel and PAH, the bioaccessibilities can currently only be used for estimates of the relative risk associated with different soils.

1 Indledning

1.1 Baggrund

Forurening af jord med for eksempel metaller og PAH (tjærestoffer, polycyclic aromatic hydrocarbons) er i Danmark reguleret ved jordkvalitetskriterier og afskæringskriterier, der fastlægger højest tilladelige værdier for forureningernes totalindhold i jorden under forskellige forhold. Bag kriterierne ligger vurderinger af forureningernes giftighed, af optagsveje, af typiske optagne mængder, samt af stoffernes generelle optagelighed i mennesker. For en række almindelige jordforureninger gælder imidlertid, at forureningernes totalindhold i jorden er et utilstrækkeligt mål for risikoen for mennesker ved indtag af jorden, fordi stofferne kan opløses i forskellig grad i menneskets mave-tarmsystem afhængig af for eksempel forureningens type og alder, samt jordens egenskaber.

Den eksisterende viden om optageligheden af jordforureninger i mennesker (udfra human bioopløselighed, human bioaccessibility) er i 2002-3 indsamlet og sammenfattet i en rapport udarbejdet for Miljøstyrelsen /1/. Rapporten giver baggrunden for beslutningen om efterfølgende at indarbejde og afprøve testmetoder til undersøgelse af jordforureningers opløselighed i menneskets mave-tarmsystem, herefter kaldet jordforureningers humane bioopløselighed, til brug i den enkelte forureningssituation for at justere vurderinger overfor jordkvalitetskriteriet i netop denne situation ("site specific bioaccessibility").

Med henblik på anvendelse af testmetoderne i praktisk risikovurdering af forurenede jord er yderligere besluttet at afprøve sammenhængen imellem **bioopløselighed** af jordforureninger bestemt ved disse **in vitro** metoder og biotilgængeligheden opnået **in vivo** i forsøg med dyr. Baggrunden for dette ønske er, at de gældende grænser for jords indhold af forureninger i de fleste tilfælde er baseret på giftighed undersøgt i dyreforsøg. I dyreforsøgene er forureningsstofferne i reglen doseret i fri, letopløselig form, mens forureningerne i jord kan være stærkt bundne og dermed mindre giftige.

1.2 Formål

Projektets hovedformål har været:

- at udvælge og vurdere metoder til test for bioopløselighed af udvalgte jordforureninger med henblik på vurdering af anvendelse i Danmark ved administration af kriterier for jordforurening
- at afprøve testmetoderne for udvalgte danske forurenede jorde
- at indhente jordprøver, hvor der i anden sammenhæng er foretaget **in vivo** undersøgelser af jordforureningernes biotilgængelighed
- at gennemføre **in vitro** test af disse jordprøver for at undersøge sammenhængen imellem **in vivo** og **in vitro** data for forureningerne

Som delmål er endvidere foretaget:

- en sammenstilling af oplysninger om doseringsform anvendt i de toksikologiske undersøgelser, der ligger bag de danske kriterier
- en udvidet sammenstilling af oplysninger om sammenhæng imellem ***in vitro*** bioopløselighed og ***in vivo*** biotilgængelighed fra andre undersøgelser

1.3 Afgrænsning

Ved test for human bioopløselighed forstås i denne sammenhæng laboratorietests ***in vitro*** af "human bioaccessibility", hvor frigørelsen af forureningerne fra jorden i menneskets mave og tarm simuleres "i reagensglas". Ved undersøgelse for biotilgængelighed forstås i denne sammenhæng ***in vivo*** forsøg, hvor optaget af forureninger fra jord undersøges ved måling af optagne eller udskilte mængder i forsøgsdyr.

I samråd med Miljøstyrelsen er det aftalt, at undersøgelsen skulle omfatte (anført efter faldende prioritet)

- PAH forbindelserne benzo(a)pyren (BaP) og dibenz(a,h)anthracen (DBahA)
- metallerne bly (Pb), cadmium (Cd) og nikkel (Ni)

Det blev endvidere besluttet, at afprøvningen foruden en undersøgelse af testkvaliteten skulle omfatte afprøvning overfor jord fra i alt 7 forurenede lokaliteter i Danmark.

Da antallet af jordprøver med ***in vivo*** data for biotilgængelighed af PAH viste sig at være begrænset, er det endvidere aftalt at supplere test af disse jordprøver med undersøgelser af PAH ***in vitro*** testmetodens følsomhed for variationer i testbetingelser (testtid og surhedsgrad i testen).

1.4 Rapportens opdeling

Rapporten indeholder foruden en indledning tre teoretiske afsnit:

- udvidet sammenfatning af tidligere offentliggjorte undersøgelser af sammenhæng imellem ***in vivo*** biotilgængelighed og ***in vitro*** bioopløselighed af jordforureninger
- sammenfatning af doseringbetingelser i toksikologiske undersøgelser
- valg af testmetoder og -betingelser

fire eksperimentelle afsnit:

- resultater af laboratorieafprøvningen af de valgte testmetoder (projektets fase 1)
- resultater fra test af jord fra forurenede, danske lokaliteter (fase 1)
- resultater fra RIVM ***in vitro*** test af indhentede jordprøver med vurdering af ***in vitro*** - ***in vivo*** sammenhængen (fase 2)
- resultater fra andre ***in vitro*** test af indhentede og danske jordprøver med vurdering af ***in vitro*** - ***in vivo*** sammenhængen (fase 3)

samt en vurdering af testmetodernes anvendelighed med anbefalinger.

I bilag er givet detaljerede forskrifter for de benyttede tests, samt detaljer vedrørende forskellige testmetoders gennemførelse og prøveforbehandling af testopløsninger.

2 Tidligere offentliggjorte undersøgelser af *in vivo* - *in vitro* sammenhæng

Der er, særligt indenfor de seneste år, offentliggjort et mindre antal undersøgelser af sammenhængen imellem *in vivo* biotilgængelighed og *in vitro* bioopløselighed af jordforureninger. Undersøgelserne har sædvanligvis været gennemført for et enkelt forureningsstof, med et begrænset antal jorde og med forskellige testmetoder.

In vitro testmetodernes udformning er tidligere beskrevet /1/ med diskussion af fordele og ulemper ved de enkelte metoder, samt en principiel gennemgang af metoder til *in vivo* undersøgelse af jordforureningers biotilgængelighed /1/.

Med henblik på at understøtte fortolkning og vurdering af data er i denne rapport suppleret med en kort opsummering og diskussion af de *in vitro* og *in vivo* metoder, der er benyttet til test af forurenede jorde, hvor der foreligger både *in vivo* og *in vitro* resultater. Der er i fremlæggelsen og diskussionen af *in vivo* og *in vitro* data for jordforureninger alene inddraget jorde, hvor begge typer af data foreligger og alene for de udvalgte jordforureninger: bly, cadmium, nikkel og PAH.

2.1 Benyttede *in vitro* test metoder

I Tabel 2.1 er vist principperne for de testmetoder, der er benyttet til *in vitro* test for human, oral bioopløselighed af jordprøver, hvor der også foreligger *in vivo* data.

Hvor der foreligger *in vitro* bioopløselighedsdata bestemt med forskellige udformninger af metoderne, er i diskussionen i dette afsnit inddraget resultater opnået med den udformning, der kommer tættest på de metoder, der oprindeligt er indarbejdet og afprøvet til de danske undersøgelser: RIVM uden fødetilsætning (fastende) til metaller og RIVM med fødetilsætning (efter måltid) til organiske forureninger.

For de fleste metoder til *in vitro* bestemmelse af bioopløselighed rapporteres bioopløseligheden som den del af en jordprøves totale indhold af forurening, der kan bringes i opløsning ved simulering af mave-tarmsystemet, dvs. som den absolutte bioopløselighed. Den absolutte bioopløselighed kan omregnes til den relative bioopløselighed som forholdet imellem den absolutte bioopløselighed af forureningen fra jordprøven og bioopløseligheden af en letopløselig referenceform af forureningen opnået i samme system, se afsnit 3 og 9.8. For både den absolutte og den relative bioopløselighed vil totalkoncentrationen af forurening i jorden indgå i beregningen. Variationer i målt totalkoncentration som følge af eksempelvis anvendelse af forskellige analysemetoder vil således forringe sammenligneligheden af bioopløselighedsdata.

Tabel 2.1 Principper for testmetoder benyttet til *in vitro* test for human, oral bioopløselighed af jordprøver med *in vivo* data

Metode	Segmenter	Fødetil-sætning	Princip	Forureninger testet	Reference
PBET	Mave og tarm	Ingen	Betingelser forenklede ud fra human fysiologi	Bly	/2/
SBRC	Mave, kan suppleres med tarm	Ingen	Simpel bufret syre, tilstræbt robust worst case	Bly	/3;4/
IVG	Mave (G), kan suppleres med tarm separat efter mave (I, sekventielt)	Kan vælges	Betingelser forenklede ud fra human fysiologi	Bly og cadmium	/5;6/
MB	Spyt, mave og tarm	Ingen	Betingelser forenklede ud fra human fysiologi	Bly	/7/
RIVM	Spyt, mave og tarm	Kan vælges	Betingelser nøje svarende til human fysiologi	Bly	/8;9/
DIN	Mave og tarm, spyt muligt tilvalg	Kan vælges	Betingelser nøje svarende til human fysiologi	Bly, cadmium, nikkel og PAH	/10/
SHIME	Mave og tarm	Kan vælges	Betingelser nøje svarende til human fysiologi	Bly	/11/
TIM	Mave og tarm	Inkluderet	Dynamisk simulering af human fysiologi	Bly	/11/

I Tabel 2.2 er vist bioopløselighed af bly og cadmium bestemt for 2 forskellige jordprøver med 3 forskellige testmetoder, /12/.

Tabel 2.2 Bioopløselighed af bly og cadmium opnået for 2 forskellige jordprøver med 3 forskellige *in vitro* testmetoder, efter /12/

	SBRC modificeret	DIN	RIVM
<i>Bly</i>			
Oker 11	0.56	0.16	0.29
Montana 2711	0.90	0.46	0.11
<i>Cadmium</i>			
Oker 11	0.92	0.62	0.51
Montana 2711	0.99	0.45	0.40

Det ses, at de benyttede metoder til test for bioopløselighed af jordforureninger er meget forskellige med hensyn til underliggende princip (enkel og robust eller fysiologisk realistisk) og udformning (med og uden tarm segment, med og uden fødetilsætning, simpel syreekstraktion eller sekventiel ekstraktion med sammensatte fordøjelsvædske).

De relativt få sammenlignende undersøgelser tyder på, at bioopløseligheden afhænger af den valgte testmetode, samt at simple testmetoder uden tarm segment for f.eks. bly giver højere bioopløselighed end metoder, der simulerer fysiologiske betingelser med spyt, mave og tarm segment.

2.2 Benyttede *in vivo* undersøgelsesmetoder

I Tabel 2.3 er vist de undersøgelsesmetoder og forsøgsdyr, der er benyttet til ***in vivo*** undersøgelse af jordforureningers biotilgængelighed, sammen med en kort beskrivelse af principperne. Kun de forureninger/metoder/dyr, hvor der også foreligger ***in vitro*** data, er medtaget.

De fleste metoder til undersøgelse af ***in vivo*** biotilgængelighed er udformet med henblik på at nå til et udtryk for den relative biotilgængelighed af jordforureningen i forhold til en letopløselig reference målt med samme metode. I metoderne får dyrene foder med forurenede jord tilsat, og indholdet af forureningen i dyrene måles efter en periode. Toksiciteten af jordforureningerne undersøges typisk ikke i disse forsøg.

For PAH findes ikke en anerkendt metode til ***in vivo*** undersøgelse af stoffernes biotilgængelighed for dyr fra jord. Dette skyldes primært, at sådanne undersøgelser kompliceres af organiske stoffers omdannelse og nedbrydning. Ved forskning i medicinske optag benyttes i reglen radioaktivt mærkede stoffer, hvor optag og skæbne af såvel moderstof som af omdannelses- og nedbrydningsprodukter kan følges. Denne fremgangsmåde lader sig ikke anvende til undersøgelser af organiske jordforureningers biotilgængelighed, idet tilsatte radioaktivt mærkede stoffer vil have en anden biotilgængelighed end stofferne bundet i jorden.

Til undersøgelse af PAH forbindelsers biotilgængelighed er benyttet stoffer udskilt med fæces som et udtryk for ikke optagne PAH /14/, samt udskillelse af PAH metabolitter (f.eks.: 3-hydroxybenzo(a)pyren) i urinen som et udtryk for optaget PAH /19/. Den første metode vil medføre en overvurdering af biotilgængeligheden, fordi også nedbrudte og omdannede stoffer medregnes som biotilgængelige, mens den anden metode vil medføre en undervurdering af biotilgængeligheden, fordi kun en begrænset del af de optagne stoffer udskilles med urinen som de målte metabolitter.

Supplerende er for PAH udviklet en metode, hvor ***in vivo*** biotilgængelighed undersøges i mus ved måling af koncentrationen af PAH bundet til DNA i lungevæv efter fodring af mus med forurenede jord og med jord tilsat et ekstrakt af den forurenede jord (DNA adduct metoden) /18/.

For en enkelt jordprøve foreligger undersøgelser af ***in vivo*** biotilgængelighed af bly i forskellige forsøgsdyr, Tabel 2.4. Desuden er der for 4 områder foretaget ***in vivo*** undersøgelser af forskellige jordprøver fra samme område, hvilket også er vist i Tabel 2.4.

Tabel 2.3 Forsøgsdyr og principper benyttet til *in vivo* undersøgelse af biotilgængelighed af jordprøver med *in vitro* data

Metode/dyr	Målepunkter	Princip	Forureninger undersøgt	Reference
EPA/svin	Vægtet gennemsnit af blod og organer, evt. separat for blod og udvalgte organer	Biotilgængelighed relativ til opløseligt metalsalt i føden	Bly og cadmium	/13/
UWBA/svin	Udvalgte organer eller udskillelse med fæces eller urin	Biotilgængelighed, for bly og benzo(a)pyren relativ til opløselig form i føden	Bly, cadmium, nikkel og PAH	/14/
Sprague-Dawley rotter	Blod	Biotilgængelighed relativ til opløseligt metalsalt i føden	Bly	/2/
Sprague-Dawley rotter	Vægtet gennemsnit af blod og organer	Biotilgængelighed relativ til opløseligt metalsalt i føden	Bly	/15/
New Zealand hvide kaniner	Blod	Biotilgængelighed relativ til opløseligt metalsalt i føden	Bly	/16/
Mennesker	Blod	Absolut biotilgængelighed baseret på isotopfortynding	Bly	/17/
Mus	Udskillelse af metabolit i urin	Biotilgængelighed relativ til ekstrakt af jord	PAH	/18;19/

Tabel 2.4 Resultater af *in vivo* undersøgelser af jordprøver for relativ biotilgængelighed af bly i forskellige forsøgsdyr /2;16;20/

	Rotter	EPA/svin	Kaniner
<i>Samme prøve</i>			
Butte MW-1	0.093	-	0.48
<i>Samme område, forskellige prøver</i>			
Butte	0.093-0.23	0.19	0.48
Bingham Creek	0.36	0.28-0.31	-
Murray	0.41	0.53-0.71	-
Joplin	0.34	0.59-0.67	-

Relative biotilgængeligheder opnået i de forskellige forsøgsdyr viser ikke umiddelbart overensstemmelse, men i vurderingen skal inddrages, at der kun i et enkelt tilfælde er tale om sammenligning af data opnået for samme jordprøve.

I en større undersøgelse af metoder til stabilisering af bly i forurenede jord er der for den amerikanske miljøstyrelse, US EPA, foretaget test af udvalgte

jordprøver i forskellige forsøgsdyr og mennesker. Der kunne ikke findes en entydig sammenhæng imellem den relative biotilgængelighed af bly fra jordprøverne i de forskellige organismer, og det blev konkluderet, at der endnu ikke er et tilstrækkeligt datamateriale til rådighed til at vise sammenhængen imellem biotilgængelighed i de forskellige organismer /21/.

Biotilgængeligheden i samme forsøgsdyr varierer afhængig af målepunktet (f.eks.: knogler, lever, nyrer eller blod), ligesom relevansen af målepunktet varierer med forureningsstoffet (f.eks.: blod er mest relevant for bly, mens nyre er mest relevant for cadmium). Forskellen på *in vivo* biotilgængelighed i forskellige målepunkter er vist i Tabel 2.5 for bly fra forurenede jord.

For bly anvendes som standard en beregning af en samlet, vægtet relativ biotilgængelighed, hvor blod indgår med vægten 3 og hver af de øvrige målepunkter med vægten 1 /13/.

Tabel 2.5 Relativ biotilgængelighed i forskellige målepunkter fundet ved *in vivo* (rotter og svin) undersøgelser af bly fra forurenede jord /5//15/

	Blod	Nyrer	Lever	Knogler
<i>Rotter</i>				
Joplin	0.34	0.48	0.27	0.34
<i>Svin</i>				
Butte	0.22	0.13	0.090	0.13

Der er generelt fundet en lineær sammenhæng imellem dosis af bly og indhold af bly i målepunkterne nyrer, lever og knogler, mens der for målepunktet blod ses et faldende optag med stigende dosis, se Figur 2.1, /13;15/. Optaget i blod beskrives normalt med en eksponentiel funktion:

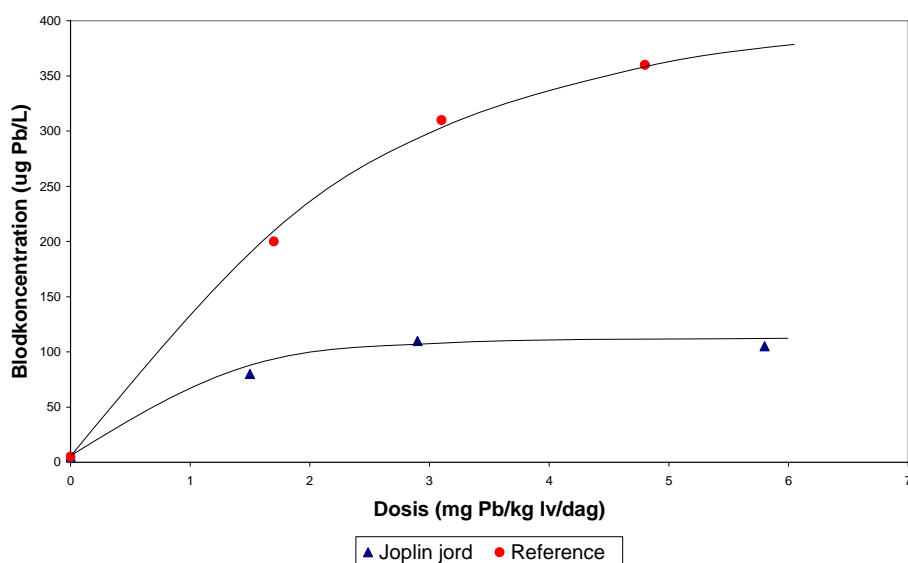
$$C_b = k_1 + k_2 * (1 - e^{(-k_3 * C_d)})$$

, hvor k_1 , k_2 og k_3 er konstanter, C_b er blodkoncentrationen i f.eks. $\mu\text{g Pb/L}$ blod, og C_d er den tildelte dosis i f.eks. $\text{mg Pb/kg legemsvægt (lv)/dag}$. Den lineære sammenhæng imellem dosis af bly og optag i organer sammenholdt med den non-lineære sammenhæng for blod peger på, at denne non-linearitet skyldes andre processer end optag af bly fra mave-tarmsystemet /22/.

I Figur 2.1 er vist et eksempel på en kurve for optag af bly i rotters blod fra forurenede jord og fra en referencedosering af letopløseligt blysalt. Figuren viser, at den absolutte bioopløselighed kan afhænge af dosis, og der er fundet en faldende biotilgængelighed af bly med stigende dosis fra både forurenede jord og referenceopløsning /23/. For at tage højde for, at biotilgængeligheden kan afhænge af dosis, er foreslået at beregne den relative biotilgængelighed som forholdet imellem den maksimale blodkoncentration ("plateaukoncentrationen") for jord og for referencen, svarende til k_2 værdierne i den eksponentielle beskrivelse af bly optag i blod vist ovenfor.

Som et eksempel på effekten af forskellig beregning kan nævnes, at den relative biotilgængelighed af bly i jord fra Joplin var 0.44 beregnet ved en blodkoncentration på $60 \mu\text{g Pb/L}$, 0.32 ved en blodkoncentration på $100 \mu\text{g Pb/L}$ og 0.34 beregnet ud fra plateau koncentrationerne /15/.

Figur 2.1 Eksempel på en kurve baseret på optag af bly i rotters blod fra forurennet jord og fra en referencedosering af letopløseligt blysalt, efter /15/



Samlet må det vurderes, at der kan være en betydelig variabilitet i *in vivo* relative biotilgængelighedsdata alene udfra brug af forskellige forsøgsdyr, forskellige målepunkter og forskellige doseringer. Samme variabilitet må forventes at ligge under de toksikologiske og epidemiologiske undersøgelser, der ligger bag højst tilladelige koncentrationer i forurennet jord. En yderligere variabilitet for *in vivo* data er knyttet til valget af forskellig beregningsmetode.

2.3 Sammenhæng *in vitro* – *in vivo*, bly

Sammenhængen imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed er vist for bly i Figur 2.2 og Figur 2.3 baseret på tidligere offentliggjorte data, se Tabel 2.1 og Tabel 2.3 for forklaring af benyttede forkortelser og metoder.

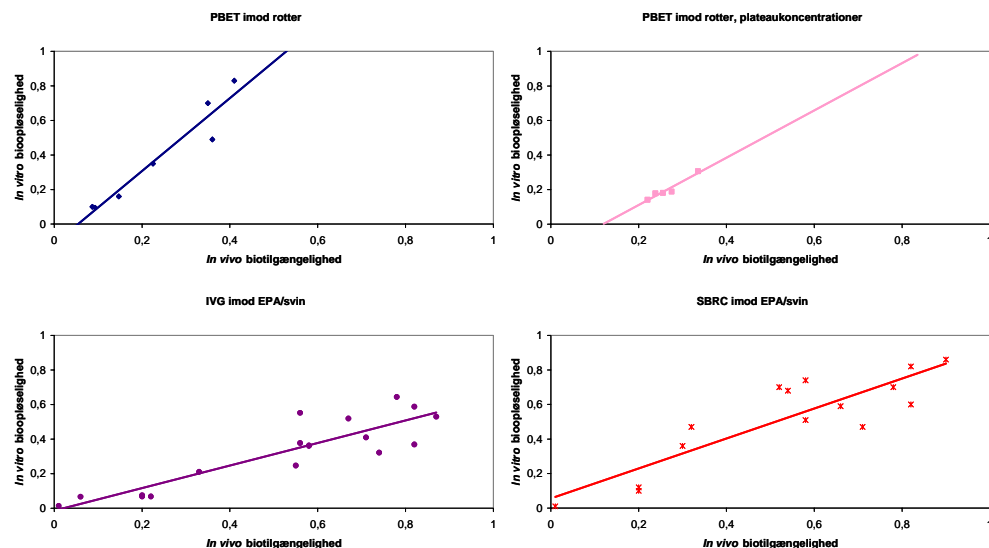
De offentliggjorte data viser, at:

- forskellige målepunkter giver forskellig *in vitro* til *in vivo* forhold, selvom samme *in vitro* metode og samme *in vivo* forsøgsdyr er benyttet (Figur 2.2 og Figur 2.3 øverste 2 grafer i hver figur)
- forskellige testmetoder for bioopløselighed giver forskellig *in vitro* til *in vivo* forhold, selvom samme *in vivo* metode/målepunkt og samme *in vivo* forsøgsdyr er benyttet (Figur 2.2 nederste 2 grafer)
- testmetoder for bioopløselighed med et tarm segment giver lavere *in vitro* til *in vivo* forhold end metoder med kun et mave segment, selvom samme *in vivo* metode/målepunkt og samme *in vivo* forsøgsdyr er benyttet (Figur 2.2 og Figur 2.3)
- nogle kombinationer af *in vitro* og *in vivo* viser meget dårlig sammenhæng imellem bioopløselighed og biotilgængelighed (Figur 2.3 nederst til højre)

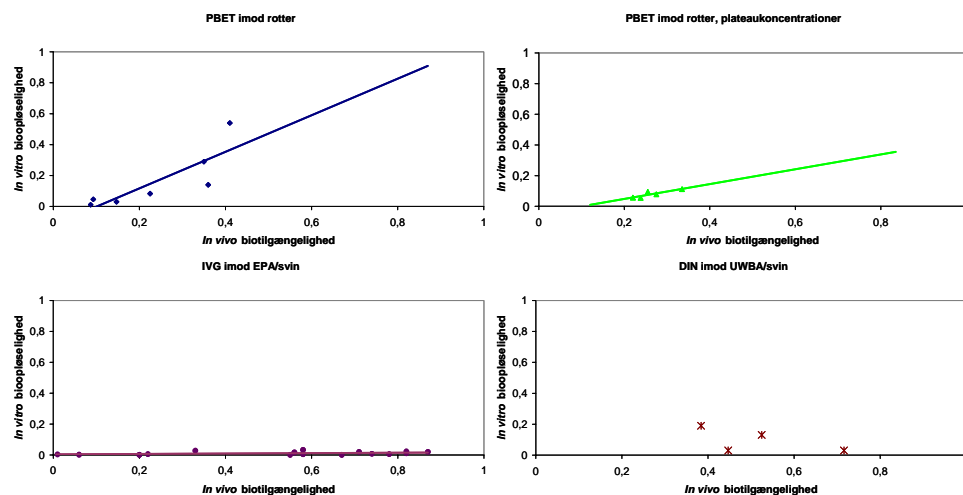
Det skal bemærkes, at IVG testens tarm segment er udført efter et mave segment i modsætning til de øvrige tests, der omfatter summen af et mave

segment og et tarm segment. Derfor giver med tarm segment (IVG I) væsentligt lavere forhold bioopløselighed/biotilgængelighed.

Figur 2.2 Sammenhæng mellem *in vitro* bioopløselighed for metoder med kun mave segment og *in vivo* biotilgængelighed af bly fra jord baseret på tidligere offentliggjorte data /2;3;5;15/



Figur 2.3 Sammenhæng mellem *in vitro* bioopløselighed for metoder med tarm segment og *in vivo* biotilgængelighed af bly fra jord baseret på tidligere offentliggjorte data /2;5;14;15/



Dårlig *in vitro* til *in vivo* sammenhæng er endvidere fundet for en jord med certificeret indhold af metaller (NIST 2710) i en undersøgelse med MB bioopløselighedsmetoden og biotilgængelighed fundet hos rotter /7/.

Tabel 2.6 viser, at *in vitro* testmetoder som RIVM og TIM i en anden tidligere udført undersøgelse /11/ kunne give bioopløselighed svarende til eller højere end biotilgængelighed målt i mennesker for én jord, mens de øvrige metoder viste betydelige afvigelser imellem *in vitro* og *in vivo*.

Tabel 2.6 In vitro bioopløselighed af bly for jord fra Bunker Hill sammenholdt med in vivo biotilgængelighed målt i mennesker /11/

Metode	Bioopløselighed		Absolut biotilgængelighed i mennesker	
	Fastende	Efter måltid	Fastende	Efter måltid
PBET	0.13	0.22	0.26	0.025
RIVM	0.32	0.24		
DIN	0.14	0.29		
SHIME	0.020	0.24		
TIM	0.28	0.038		

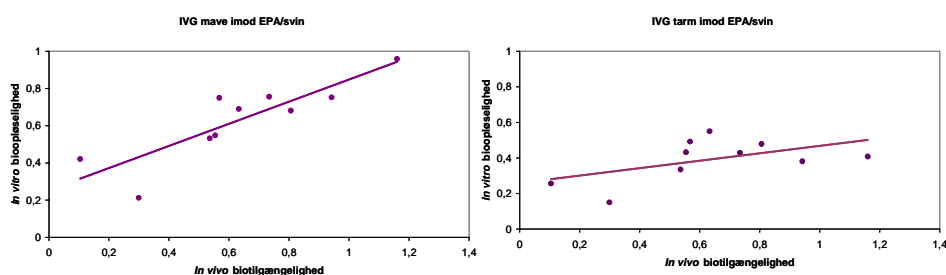
Samlet viser de offentliggjorte undersøgelser, at der er fundet en klar sammenhæng imellem bly *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed fra jord, men at forholdet varierer mellem forskellige metoder til *in vitro* test og *in vivo* undersøgelser.

In vitro test med PBET, SBRC eller RIVM testmetoder, samt *in vivo* undersøgelser med EPA/svin synes at give de højeste værdier for henholdsvis bioopløselighed og biotilgængelighed.

2.4 Sammenhæng *in vitro* – *in vivo*, cadmium

Sammenhængen imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed er vist for cadmium i Figur 2.4 baseret på tidligere offentliggjorte data. Resultater af test er opdelt efter test med mave segment (til venstre) og test med både mave- og tarm segment. (til højre). *In vivo* biotilgængelighedsdata stammer fra forsøg med svin efter én metode, og *in vitro* data stammer fra én test i udformning svarende til fastende forhold.

Figur 2.4 Sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed af cadmium fra jord baseret på tidligere offentliggjorte data /6/ for test med kun mave segment (venstre) og med tarm segment (højre)



IVG metoden med mave segment viser et mere konstant forhold bioopløselighed/biotilgængelighed (mere lineær sammenhæng) end IVG metoden med tarm segment efter mave segment. Desuden var *in vitro* test data efter IVG metoden med mave segment overvejende højere end *in vivo* data, mens dette ikke var tilfældet efter IVG metoden med tarm segment. Igen skal bemærkes, at IVG testens tarm segment er udført efter mave segment i modsætning til andre tests, der omfatter summen af et mave segment og et tarm segment. Derfor giver IVG lave forhold imellem bioopløselighed og biotilgængelighed efter tarm segment.

Der foreligger desuden et sæt samhörørende data for *in vitro* bioopløselighed efter DIN test metoden og *in vivo* biotilgængelighed efter undersøgelsesmetoden med UWBA/svin /14/, men disse data kan ikke sammenlignes, da den relative biotilgængelighed ikke kan beregnes på grund af undersøgelsens udformning (doseringsreference ikke medtaget).

Samlet viser de offentliggjorte undersøgelser, at der i en enkelt undersøgelse er fundet en klar sammenhæng imellem cadmiums *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed fra jord, men at forholdet varierer for forskellige segmenter i *in vitro* test metoden.

In vitro test med IVG testmetoden med mave segment giver højere værdier for cadmium bioopløselighed end *in vivo* undersøgelser med EPA/svin og metoden må altså betragtes som konservativ.

2.5 Sammenhæng *in vitro* – *in vivo*, nikkel

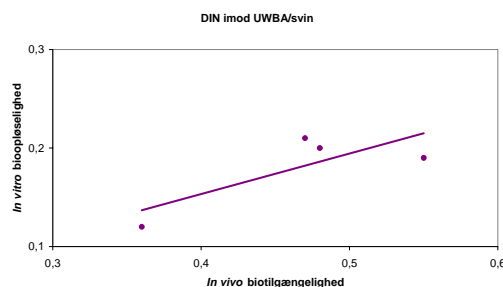
Der er fundet ét sæt samhörørende data for *in vitro* bioopløselighed af nikkel fra jord efter DIN test metoden og *in vivo* biotilgængelighed efter undersøgelsesmetoden med UWBA/svin /14/, men disse data kan ikke sammenlignes, da den relative biotilgængelighed ikke kan beregnes på grund af undersøgelsens udformning (doseringsreference ikke medtaget).

2.6 Sammenhæng *in vitro* – *in vivo*, PAH

Der er fundet ét sæt samhörørende data for *in vitro* bioopløselighed af PAH fra jord efter DIN test metoden og *in vivo* biotilgængelighed efter undersøgelsesmetoden med UWBA/svin beregnet på basis af PAH udskilt med fæces /14/. Kun for benzo(a)pyren er medtaget en doseringsreference, som tillader beregning af relativ biotilgængelighed. Resultaterne er vist i Figur 2.5.

Figur 2.5 Sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed af benzo(a)pyren fra jord baseret på tidligere offentliggjorte data /14/

Det begrænsede antal data tillader ikke en vurdering af *in vitro* til *in vivo*



korrelationen, og der skal erindres om, at den her benyttede *in vivo* metode giver en overvurdering af de organiske stoffers biotilgængelighed, fordi den er baseret på udskilt restmængde med fæces, se afsnit 2.2.

Det er i en tidligere analyse /1/ af data fra denne undersøgelse /14/ vist, at selvom der ikke er lineær sammenhæng imellem *in vivo* biotilgængelighed (ikke udskilt med fæces) og *in vitro* bioopløselighed for alle undersøgelsens PAH fra alle jordprøver, så er der god sammenhæng for alle PAH fra én af jordprøverne, samt for 4 udvalgte PAH fra alle jordprøverne.

For pyren kan biotilgængeligheden opgøres ud fra mængde udskilt med fæces og ud fra mængde udskilt som 1-hydroxypyren med urin i *in vivo* undersøgelser med henblik på sammenligning med bioopløselighed målt ved *in vitro* test /14/. I Tabel 2.7 er på denne måde vist biotilgængelighed og bioopløselighed for 4 undersøgte jorde, normeret i forhold til den jord, der viste højeste biotilgængelighed og bioopløselighed.

Tabel 2.7 Biotilgængelighed og bioopløselighed af pyren fra jorde, normeret i forhold til den jord, der viste højeste biotilgængelighed og bioopløselighed, data fra /14/

Jord	Biotilgængelig rækkefølge ud fra ikke udskilt med fæces		Biotilgængelig rækkefølge ud fra udskilt som 1-hydroxypyren med urin Pyren	Bioopløselig rækkefølge Pyren
	Pyren	BaP		
Bruchsal	0.39	0.65	0.73	0.24
Carl 1	0.79	1.00	0.60	0.28
Lothringen 1	0.75	0.86	0.53	0.36
Lothringen 2	1.00	0.85	1.00	1.00

De relative udtryk for pyrens biotilgængelighed og bioopløselighed viser ikke samme billede, ligesom der ikke kan ses en sammenhæng imellem rækkefølgen for pyren og benzo(a)pyren (BaP).

Det skal bemærkes, at udskillelse af 1-hydroxypyren med urinen varierede op til over 100% imellem de fire svin i én forsøgsgruppe doseret med samme jord. For én gruppe så man endvidere bort fra resultaterne fra ét dyr af fire pga. stor variation.

Samlet er der ikke offentliggjort undersøgelser, der hverken kan vise eller afvise sammenhæng imellem *in vivo* biotilgængelighed og *in vitro* bioopløselighed af PAH.

2.7 Sammenhæng *in vitro* – *in vivo* generelt

I forbindelse med sammenligninger af *in vitro* og *in vivo* værdier for henholdsvis bioopløselighed og biotilgængelighed skal gøres opmærksom på en række begrænsninger for sådanne sammenligninger:

- de fleste tests for bioopløselighed har til formål at måle den del af en jordforurening, der kan opløses i menneskets mave-tarmsystem som en overgrænse for den mængde, der kan optages
- de fleste undersøgelser af biotilgængelighed har til formål at måle den del af en jordforurening, der når målepunkter (f.eks. blod eller nyrer) i forsøgsdyr som et realistisk mål for både optag og transport til målepunktet
- menneskets mave-tarmsystem er forskelligt fra mave-tarm systemet i forsøgsdyr
- test for bioopløselighed opnår meget forskellige resultater afhængig af den benyttede test metode

- undersøgelser af biotilgængelighed opnår meget forskellige resultater afhængig af f.eks. forsøgsdyr, dosering og beregningsmetode
- undersøgelser af biotilgængelighed udviser ofte den store variabilitet, som forventes i biologiske systemer

Derfor bør sammenhænge alene vurderes opdelt i sammenlignelige metoder, og hverken *in vitro* eller *in vivo* resultater kan *a priori* betragtes som "sande".

3 Doseringsform i toksikologiske studier

De danske kvalitetskriterier og afskæringskriterier for forurenede jord er udarbejdet for at sikre, at mennesker ikke udsættes for sundhedsskader. I dyreforsøg til fastlæggelse af stoffernes giftighed ved indtagelse af jorden (oralt optag) benyttes i reglen letopløselige salte i vand eller i foder, mens stofferne i jord efter al sandsynlighed er langt mindre tilgængelige for opløsning i menneskers mave-tarmsystem (reduceret human bioopløselighed).

Anvendelse af koncentrationsbaserede kriterier for jordforurening forudsætter, at menneskets orale optag af forureningerne stiger med stigende eksponering. Sagt på en anden måde, så er det accepteret, at en mindre forureningskoncentration eller et mindre oralt optag af jorden giver en mindre mængde forurening og en mindre koncentration af forureningen i mave-tarmsystemet og dermed et mindre optag og videre en mindre risiko/effekt.

Den totale biotilgængelighed af jordforureninger afhænger først og fremmest af mave-tarmsystemets mulighed for at opløse forureningerne (den humane bioopløselighed), af tarmvæggens mulighed for at optage stofferne (absorptionen) og endelig af nedbrydningen/udskillelsen under transport fra tarmvæggen (via leveren) til det arterielle blod (first pass effekten). Det forudsættes normalt /24/, at effekten af hver faktor er uafhængig, således at det totale optag, M_d , kan beskrives ud fra den indtagne mængde forurening, M , bioopløselighedsfaktoren, f_b , absorptionsfaktoren, f_a , og first pass faktoren, f_d :

$$M_d = f_b \times f_a \times f_d \times M$$

Med andre ord, så vil det totale optag eller den indre eksponering være mindre, alt andet lige, hvis en forurening indgives bundet i jord på en måde, så forureningen ikke frigives i mave-tarmsystemet (bioopløseligheden er lav), sammenlignet med indgivelse i en letopløselig form (bioopløseligheden er høj). Jordforureningers bioopløselighed, f_b , afhænger af forureningens egenskaber, af jorden og af forholdene i mave-tarmsystemet.

Der er tidligere gennemført en indsamling, sammenfatning og vurdering af den tilgængelige viden om human bioopløselighed (bioaccessibility) af udvalgte metaller og PAH fra forurenede jord /24/. Heri blev det bl.a. påvist, at resultater af forsøg med dyr tyder på, at optaget af arsen, bly og PAH forbindelser netop er afhængig af, hvordan stoffet indgives (med f.eks. vand, føde eller i jord). I en test for bioopløselighed vil det derfor være nødvendigt at sammenholde bioopløseligheden af forureningerne fra jord med bioopløseligheden i en toksikologisk reference (referencetilstanden). Denne skal svare til betingelserne, der er benyttet i de toksikologiske eller epidemiologiske undersøgelser, der ligger til grund for det relevante kvalitetskriterium.

Da toksiciteten af de enkelte stoffer i denne undersøgelse (Pb, Cd, Ni og PAH forbindelserne BaP og DBahA) er blevet vurderet på forskelligt eksperimentelt grundlag, og da betydningen af mediet for tilgængeligheden (opløseligheden)

varierer fra stof til stof, må stofferne vurderes enkeltvis for at identificere de relevante toksikologiske referencer.

3.1 Grundlag for jordkvalitetskriterierne

For hvert enkelt stof blev grundlaget for det gældende kvalitetskriterium og/eller afskæringskriterium undersøgt. De parametre, der blev fokuseret på, var:

- hvorvidt det pågældende kriterium er baseret på, at eksponering sker via indtagelse af jord ("jordspisning", oralt optag).
- hvordan stoffet blev indgivet i de(t) eksperiment(er), der ligger til grund for den beregnede værdi (hvilket medie blev anvendt, f.eks. vand, føde eller jord og i hvilken form).

Baggrunden for de enkelte jordkvalitetskriterier og afskæringskriterier er beskrevet i flere publikationer fra Miljøstyrelsen, senest meget udførligt i Miljøprojekt 425, "Afskæringskriterier for forurenede jord" /25/, hvor der dog er refereret hyppigt til /26/. I senere udgivelser /27;28/ er motivationen for kvalitets- og/eller afskæringskriterier revideret eller uddybet for nogle af stofferne. Arbejdet med revurdering af jordkvalitets- og kortlægningskriterier (Kriteriegruppens arbejde) /29;30/ er udført efter færdiggørelse af identifikationen af doseringsformer i toksikologiske studier og er derfor ikke inddraget i denne rapport.

3.2 Bly

Jordkvalitetskriteriet for bly (40 mg bly per kg jord) er baseret på, at jordspisning er den vigtigste eksponeringsvej for jord /25/.

Selve beregningen af jordkvalitetskriteriet er angiveligt baseret på, at der for børn er "afsat" 5 µg/kg lgv/uge til jordspisning, og det antages, at et barn, der vejer 10 kg, spiser 0,2 g/jord/dag (lgv = legemsvægt).

Til grund for de 5 µg/kg lgv/uge ligger en værdi for "Provisional Tolerable Weekly Intake" (PTWI) fra WHO på 25 µg/kg lgv/uge, hvorfra man ved beregningen af jordkvalitetskriteriet har trukket bidrag fra føden, indånding osv. på 20 µg/kg lgv/uge /25/. Der er ikke foretaget særlige overvejelser vedrørende forskelle i biotilgængelighed mellem jord og andre medier.

PTWI-værdien fra WHO (WHO 1996) er baseret på to undersøgelser af blodbly som funktion af oralt blyindtag /31;32/.

I den ene undersøgelse blev blodbly niveauet hos spædbørn sammenholdt med blyindholdet i det drikkevand, deres modermælkserstatning blev fremstillet af, samt i brystmælk. Her viste det sig, at blodbly var korreleret til bly i kosten, og at bly var væsentligt mere tilgængeligt i vand end i brystmælk /32/. PTWI-værdien er baseret på den del af børnene, der fik bly via vandet. Den anden undersøgelse blev gennemført ud fra samme princip og med samme resultat for såvidt angår sammenhæng mellem blyindtag og blodbly. Her tydede resultaterne dog på, at bly fra modermælk var mere tilgængeligt end bly fra drikkevand (modermælkserstatning) /31/.

Det anbefalede maksimale indtag af bly er altså baseret på indhold af bly i drikkevand som målt.

Det vil derfor være relevant at benytte et letopløseligt bly salt i vand som toksikologisk reference ved undersøgelse af bioopløseligheden af bly i forurenede jord.

Det skal dog bemærkes, at beregningerne bag jordkvalitetskriteriet er baseret på ældre undersøgelser og er foretaget for over 10 år siden (1989 og 1992). Miljøstyrelsen noterer selv dette samt:

" Resultaterne af nyere undersøgelser understreger den manglende sikkerhedsmargen ved fastsættelsen af kriterierne" /27/.

Såfremt jordkvalitetskriteriet (og afskæringskriteriet) revideres på grundlag af nyere undersøgelser, kan der være behov for at ændre dette valg af reference. Kriteriegruppens revurdering af jordkvalitetskriteriet for bly er som nævnt ikke inddraget i denne rapport.

3.3 Cadmium

For cadmium er jordkvalitetskriteriet (0,5 mg cadmium per kg jord) af forsigtighedshensyn baseret på en hollandsk oplysning om muligt optag af Cd i hvede /25;27/.

Afskæringskriteriet (5 mg cadmium per kg jord) er derimod baseret på antagelsen om, at den vigtigste eksponeringsvej er jordspisning. Udgangspunktet for beregningen er den af WHO foreslåede PTWI på 7 µg/kg lgv/uge /25;27/. Bag grænsen ligger undersøgelser af sammenhængen imellem cadmiumindholdet i menneskers nyrebark og effekter på urindannelsen. Denne er kombineret med undersøgelser af optag af cadmium fra føden.

Afskæringskriteriet er baseret på følgende argumentation:

" For at Cd-niveauet i nyrebarken ikke skal overstige 50 µg/g og under antagelse af en absorptionshastighed på 5% og en daglig udskillelse på 0,005% af den mængde, der er i kroppen (body burden), bør den totale indtagelse ikke overstige 1 µg/kg lgv/dag kontinuert igennem 50 år."/33/

Det antages altså, at 5% af det Cd, der findes i føden, optages i kroppen. Endvidere antages, at optaget af cadmium fra forurenede jord er sammenligneligt med optaget fra føde. I det seneste udkast til risikovurdering af cadmiumoxid /34/ angives, at cadmiumoxid ligesom de fleste andre letopløselige cadmiumsalte er næsten fuldstændigt opløseligt (94%) i menneskets mavesæk.

Hovedkilden til værdien for optag af cadmium fra føden må formodes at være: Rahola et al. 1972 /35/, der nævnes hyppigt i WHO rapporten /33/, men også flere andre kilder synes at omhandle forsøg med mennesker /36-39/.

Både Rahola et al. /35/ og Shaikh & Smith /39/ gennemførte forsøg med mennesker, der fik cadmium serveret i nyrebarkshomogenat. Begge anvendte radioaktivt mærket cadmium, samt en opløsning af en ikke-mærket cadmiumforbindelse. Rahola et al. /39/ brugte en "Cd-HNO₃ carrier solution", formodentlig en opløsning af et cadmiumsalt i fortyndet salpetersyre, mens Shaikh & Smith /39/ benyttede CdCl₂. Flanagan et al. /38/ tilsatte CdCl₂ til havregryn med mælk, der blev serveret for en gruppe forsøgspersoner. Undersøgelsen omfattede belysning af, hvorvidt jernmangel førte til øget cadmium optag (hvilket den gjorde). Optaget af cadmium lå mellem 2 og 11%

/38/, hvilket er i samme størrelsesorden som hos Rahola et al. /35/, der fandt 5.9%.

Anbefalingen af maksimal cadmiumbelastning er altså baseret på undersøgelser af cadmium målt i menneskers nyrebark, mens den benyttede biotilgængelighedsfaktor er fremkommet efter undersøgelser af cadmiumopløsning tilsat føde.

Det vil derfor være relevant at benytte cadmium tilsat fødevarer som toksikologisk reference ved undersøgelse af bioopløseligheden af cadmium i forurenede jord. I de refererede optagsforsøg er benyttet opblanding af letopløselige cadmiumsalte med fødevarer, og det foreslås derfor at anvende en sådan blanding som reference.

3.4 Nikkel

Jordkvalitetskriteriet for nikkel (30 mg nikkel per kg jord) er afledt ud fra, at jordspisning kan være den vigtigste eksponeringsvej for jord, idet f.eks. nikkelallergikere kan udvise symptomer ved indtagelse af en meget lav enkeltdosis /25/.

Af den tilgrundliggende baggrundsrapport /25/, samt af "Rådgivningsvejledningen" /27/ fremgår det, at den af Miljøstyrelsen fastsatte tolerable dosis for nikkel er 1 µg/kg lgv/dag. Denne er baseret på forsøg med nikkelfølsomme personer, hvor nikkel blev indtaget i vandig opløsning (flere undersøgelser, primært benyttet nikkelsulfat). På baggrund af andre forsøg, der viser, at kun 1/30 af nikkel i føde bliver optaget i kroppen, antages det, at tilgængeligheden/optageligheden af nikkel i jord er sammenlignelig med tilgængeligheden/optaget fra føde, hvorefter der beregnes en TDI_{jord} på $30 \cdot 1 \mu\text{g/kg lgv/dag} = 30 \mu\text{g/kg/dag}$. Med udgangspunkt i denne værdi og antagelse af, at et barn på 10 kg maksimalt vil indtage 10 g jord i en enkeltdosis, nås et jordkvalitetskriterium på 30 mg/kg jord /40/.

Ved udarbejdelsen af jordkvalitetskriteriet for nikkel er det således antaget, at optaget af nikkel fra føde er sammenlignelig med optaget fra jord, samt at dette indebærer en reduktion i forhold til det anvendte forsøg med optag fra vandig opløsning.

De forsøg, den anvendte faktor 30 er baseret på, synes at være citeret i WHO's nikkemonografi /41/. Der er tale om forsøg med rotter, der er gennemført i 1950'erne og -70'erne. I det ene forsøg fik rotterne nikkel via forskellige kilder, i det andet blev nikkel indført direkte i fordøjelseskanalen i form af en nikkelchlorid opløsning. I forsøg med mennesker fra 1970'erne og -80'erne, der er refereret samme steds, var det maksimale optag i tarmen ca. 30% af det indtagne nikkel. Dette var tilfældet for nikkelsulfat i drikkevand, mens optaget fra føde enten ikke kunne måles eller var cirka 1% /41/. I et af de forsøg, der er citeret af WHO /41/, indgik nikkel i form af nikkelsulfat tilsat til "scrambled eggs", der indgik som en del af et større morgenmåltid /42/. Desuden har Solomons et al. /43/ undersøgt en række parametres betydning for optaget af nikkel i tarmen hos mennesker. Det refereres /41/, at nikkelabsorption er lineært afhængig af nikkelkoncentrationen i mavesækken, men at også tilstedeværelsen af andre stoffer i mave-tarmsystemet påvirker absorptionen.

Det kan formodes, at nikkel, der er bundet i forurenede jord, vil være mindre tilgængeligt for optag i mave-tarmsystemet end nikkel, der (som i forsøgene

bag anbefalingerne om maksimalt indtag) er tilsat til drikkevand. Den benyttede biotilgængelighedsfaktor er fundet ud fra nikkel tilsat føde.

Det vil derfor være relevant at benytte et letopløseligt nikkelsalt i vand som toksikologisk reference ved undersøgelse af bioopløseligheden af nikkel i forurenede jord.

Det gælder også for nikkel, at det gældende jordkvalitetskriterium er baseret på undersøgelser af ældre dato, og der kan derfor være behov for at revurdere valget af toksikologisk reference, såfremt jordkvalitetskriteriet revideres på grundlag af nyere undersøgelser.

3.5 PAH forbindelser

"PAH forbindelser" er en samlebetegnelse for gruppen af polycykliske aromatiske hydrocarboner, der omfatter en række stoffer med forskellige fysisk-kemiske og sundhedsmæssige egenskaber. Det stof, der er bedst undersøgt, er benzo(a)pyren, der vides at være bl.a. kræftfremkaldende. For dette stof er der derfor udarbejdet et specifikt jordkvalitetskriterium (0,1 mg/kg jord). Da dibenz(a,h)anthracen har samme kræftfremkaldende potentiale som benzo(a)pyren, er kvalitetskriteriet for denne ligeledes sat til 0,1 mg/kg jord. Forholdet mellem benzo(a)pyren og de øvrige PAH forbindelser i forurenede jord er almindeligvis meget ensartet, så for at sikre mod en usædvanlig PAH sammensætning er der stillet krav til totalindholdet af PAH forbindelser i form af summen af stofferne fluoranthen, benzo(b+j+k)fluoranthen, benzo(a)pyren, dibenz(a,h)anthracen og indeno(1,2,3-cd)pyren (1,5 mg/kg jord) /27/.

Kvalitetskriterier for PAH forbindelser er altså baseret på et kvalitetskriterium for benzo(a)pyren, hvorfra der ekstrapoleres til øvrige PAH forbindelser ud fra den typiske sammensætning af forureninger i jord /28/.

For PAH forbindelserne er de to vigtigste eksponeringsveje fra forurenede jord hudkontakt og jordspisning. Disse synes at være tillagt forskellig betydning i forskellige publikationer vedrørende jordkvalitetskriterier – f.eks. /25/ og det senest opdaterede datablad /28/ samt i "Rådgivningsvejledningen" /27/.

Larsen /25/ beskriver eksplicit baggrunden for fastsættelse af jordkvalitetskriteriet for benzo(a)pyren og PAH som:

"Jordkvalitetskriteriet for benzo(a)pyren og PAH er sat til 0,1 mg/kg jord henholdsvis 5 mg/kg jord (siden ændret til 1,5 mg/kg, forfatterens anmærkning), idet det antages, at 2% af PAH stofferne i en blandingsforurening udgøres af benzo(a)pyren (et forhold, der gør sig gældende for kultjære). Kvalitetskriterierne er baseret på PAH stoffernes kræftfremkaldende effekt ved hudkontakt."

Hertil føjes et afsnit i parentes, hvor der kort gøres rede for, at beregninger, baseret på eksponering af børn via indtagelse af jord ville give samme resultat.

I databladet "Polyaromatiske hydrocarboner, PAH" /28/ baseres beregningerne af jordkvalitetskriteriet for benzo(a)pyren primært på direkte indtag af jord. I "Rådgivningsvejledningen/27/ nævnes hudeksponeringen dog som den første motivation for kvalitetskriteriet, og den anvendes som grundlag for det analoge kvalitetskriterium for dibenz(a,h)anthracen.

I databladet /28/ baseres optaget på eksponering via jordspisning og den 10^{-6} livstidsrisiko, som WHO har beregnet i forbindelse med anbefalinger af maksimalt indhold i drikkevand /44/. Beregningen af koncentrationen i vand ($0,07 \mu\text{g/L}$) heri er baseret på et studie, hvor mus fik benzo(a)pyren i føden. Beregningen sker dog i form af en modelbaseret ekstrapolationsberegning, som ikke er beskrevet. Det kan derfor ikke afgøres, hvorvidt en eventuel forskel på tilgængeligheden i føde og vand er medtaget i de WHO-beregninger, der ligger til grund for de danske kvalitetskriterier.

De danske beregninger tager udgangspunkt i, at tilgængeligheden af benzo(a)pyren i grundlaget for WHO's anbefaling er den samme som i jord, og dermed i, at WHO's drikkevandskriterium er baseret på tilgængeligheden i føde. Herved fås, at indtagelse af benzo(a)pyren i en mængde på 2 ng/kg lgv/dag medfører en livstidsrisiko på 10^{-6} . Herefter anvendes standardscenariet med et barn på 10 kg , der kan indtage $0,2 \text{ g jord per dag}$ (dvs. $0,02 \text{ g/kg lgv/dag}$).

Den undersøgelse, der citeres af WHO /44/, er et fodringsforsøg med mus, hvor en opløsning af benzo(a)pyren blev tilsat til musefoder (i hvedemel som blev blandet med foderet) /45;46/.

Som for cadmium er der altså bag det anbefalede maksimale indtag forsøg, der er baseret på eksponering via føde, og det antages at optag af stoffet fra jord er sammenlignelig med optag af stoffet fra det foder, der er anvendt i forsøget.

I de refererede effektforsøg er benyttet opblanding af benzo(a)pyren opløst i et organisk opløsningsmiddel med mel, carboxymethylcellulose og husdyrfoder. Det foreslås derfor at anvende en blanding af benzo(a)pyren opløsning og fødevarer som toksikologisk reference. De samme referencebetingelser anvendes for dibenz(a,h)anthracen.

Det skal bemærkes, at den undersøgelse, der ligger til grund for WHO's beregninger og dermed for beregningen af kvalitetskriteriet, er af ældre dato (1967), og der kan derfor være behov for at revurdere valget af toksikologisk reference, såfremt jordkvalitetskriteriet revideres på grundlag af nyere undersøgelser. Det skal endvidere bemærkes, at undersøgelse af PAH forbindelsers humane bioopløselighed i mave-tarmsystemet ikke bidrager til en belysning af risikoen ved hudkontakt med disse stoffer. Kriteriegruppens revurdering af jordkvalitetskriteriet for PAH er som nævnt ikke inddraget i denne rapport.

3.6 Valg af referencebetingelser

Ud fra gennemgangen af de benyttede doseringsformer er der foreslået toksikologiske referencer (referencebetingelser) til brug i test for human bioopløselighed som angivet i Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Opsummering af doseringsformer og forslag til toksikologiske referencer for de udvalgte jordforureninger

	Bly	Cadmium	Nikkel	Benzo(a)pyren og dibenz(a,h)anthracen
Kemisk form	Opløst bly	Formodentlig	Primært	Benzo(a)pyren

	Bly	Cadmium	Nikkel	Benzo(a)pyren og dibenz(a,h) anthracen
benyttet i toksikologiske undersøgelser	som fundet ved analyser	cadmium som fundet ved analyser	opløst nikkelsulfat	tilsat i opløsningsmiddel
Doseringsform benyttet i toksikologiske undersøgelser	Drikkevand	Føde	Drikkevand	Føde
Forslag til toksikologisk reference	Blynitrat, $Pb(NO_3)_2$ i vand	Cadmiumnitrat, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ tilsat hvedemel	Nikkelnitrat, $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ i vand	Benzo(a)pyren og dibenz(a,h) anthracen opløst i acetone og tilsat hvedemel

De foreslåede uorganiske referencestoffer er udvalgt som letopløselige stoffer med lav komplekseringskonstant imellem metal ion og salt ion, med høj vandopløselighed og uden væsentlig effekt på koncentrationen af nøglekomponenter i testopløsningerne.

Efter gennemførelsen af testafprøvningen er forslag til toksikologiske referencer revideret, se kapitel 5.

4 Valg af tests og testbetingelser

Udvælgelsen af testmetoder til indarbejdning af afprøvning i Danmark omfattede 4 elementer:

- udvælgelse af testbetingelser (testmetode, praktisk udførelse og kvalitetskrav)
- udpegning af eksempler på egnede analysemetoder til jord og testopløsninger og specifikation af kvalitetskrav til analyserne
- specifikation af nødvendig kvalitetskontrol for test og analyser
- specifikation af krav til forbehandling af jordprøver

4.1 Testmetode og -betingelser

I den tidligere udarbejdede gennemgang af litteraturen om human bioopløselighed af jordforureninger /24/ konkluderedes, at en testmetode skal omfatte alle jordforureningers vigtige opløsningsprocesser og -parametre i mave-tarmsystemet:

- opløsning ved stabiliseret lav pH og højt chloridindhold svarende til mavesækken (mave segment)
- opløsning ved neutral til svagt basisk pH og højt phosphatindhold svarende til tyndtarmen (tarm segment)
- aerob efterfulgt af anaerob opløsning (kun for forureninger med opløselighed, der varierer med redox tilstand)
- separat vurdering af opløsning i mave og tarm segment
- tilsætning af enzymer, galde og fødesurrogat (føde afhængig af forurening)

En række eksperimentelle detaljer medvirker til at fastlægge det absolutte testresultat, f.eks.:

- blandingsmetode for jord og testopløsning
- reaktionstider
- type og koncentration af stoffer i testopløsning
- forhold imellem jord og testopløsning

Der er 3 testmetoder med bred anvendelse (reference for seneste metodebeskrivelse angivet), som har været overvejet til anvendelse i Danmark:

- SBRC (Solubility/Bioavailability Reseach Consortium, videreudvikling af PBET (Physiologically Based Extraction Test) metoden /47/)
- DIN (Deutsches Institut für Normung) /48/
- RIVM (National Institute of Public Health and the Environment) /9;49/

SBRC metoden er også kendt som "Drexler metoden" /4/, og den forventes at opfylde kommende krav til godkendelse af testmetoder for bioopløselighed til brug i risikovurdering af forurenede jord fra US EPA. Den oprindelige PBET benyttes stadig af nogle laboratorier i Europa.

RIVM metoden er i virkeligheden to metoder: én metode svarende til fastende forhold beregnet til metaller og én metode svarende til forholdene efter måltid beregnet til PAH. Begge metoder er behandlet her.

Ingen af de 3 metoder tilfredsstillende alle de anførte ønsker til udformning, og derfor er med henblik på valg af testmetode og fastlæggelse af procedurer for de enkelte trin i testmetoden i det følgende foretaget en sammenligning af de 3 almindeligt benyttede testmetoder for bioopløselighed og givet en diskussion af nøgleparametre. I vurderingen af metoderne er foruden metodebeskrivelser og -studier inddraget direkte kommunikation med forskerne bag PBET og SBRC metoderne, Mike Ruby, Exponent Environmental Group, og John Drexler, Colorado Universitet, og bag RIVM metoderne Agnes Oomen under et besøg på RIVM /50/.

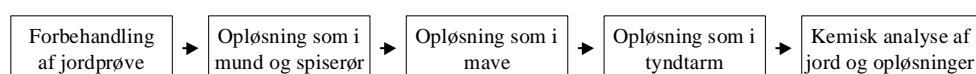
Der er derudover i afsnit 4.3 specificeret krav til kvalitetskontrol af testene, i afsnit 4.2 specificeret krav til analyser af jordprøver og testopløsninger, samt i afsnit 4.4 specificeret krav til forbehandling af jordprøver inden test.

Detaljerede procedurer ud fra seneste publicerede metodebeskrivelser, se ovenfor, og resultater fra metodestudier i relevant omfang er samlet i Bilag C.

4.1.1 Testmetode principper

De vigtigste trin i test for bioopløselighed er vist i Figur 4.1, og de tre testmetoders hovedtræk er opsummerede i Tabel 4.1.

Figur 4.1 Principskitse for test for bioopløselighed



Tabel 4.1 Hovedtræk af tre hyppigt benyttede testmetoder

	SBRC	RIVM		DIN
		Fastende	Efter måltid	
Segment mund/spiserør	Nej	Ja	Ja	Muligt tilvalg
Mave segment	Ja	Ja	Ja	Ja
Tarm segment	Muligt tilvalg	Ja	Ja	Ja
Fødetil-sætning	Nej	Nej	Ja	Muligt tilvalg

Alle 3 metoder til overvejelse i dette projekt har taget udgangspunkt i sammensætningen af menneskets fordøjelsvæsker, indbyrdes mængdeforhold under fordøjelsesprocessen og forholdet imellem føde/jord og fordøjelsvæsker. Denne sammenhæng er fastholdt i RIVM og DIN metoderne /49;51/, hvorimod SBRC metoden er forenklet med henblik på at nå den bedst mulige sammenhæng imellem bioopløselighed målt i testen og biotilgængelighed fundet i dyreforsøg, samtidig med at testen er simplificeret mest muligt /52/. I præsentationen af RIVM metoden angives en repræsentation af "realistic worst case" forhold at være målsætning for denne test /49/.

4.1.2 Fødetilsætning

Sammensætningen af mave-tarmsystemets væsker ændres, når der tilføres mad, f.eks. ved øget udskillelse af galde og højere pH. En simpel kombination af en test simulerende fastende forhold med tilsætning af fødeemner vil ikke give fysiologisk korrekte opløsningsforhold på grund af de samtidige ændringer i mave-tarmsystemets væsker /50/.

Effekten af tilsætning af føde til test for metalleres bioopløselighed fra jord er ikke afklaret, se f.eks. /11/, men normalt antages den lave pH i det fastende barns mave at fremme opløsningen af metaller som bly, se f.eks. /2/. For organiske forureninger er tilsætning af mælkepulver vist at øge opløseligheden af f.eks. PAH forbindelser fra én jord i både mave og tarm segmentet væsentligt (faktor 2-4) /53/ og fra 5 andre jorde med faktor 10 – 20 for kombineret mave- og tarm segment /54/.

Der er lavet en række undersøgelser af mulighederne for at benytte tilsætning af føde til testopløsningen for at simulere mere realistiske opløsningsbetingelser. Forsøgsteknisk har tilsætning af for eksempel madolie vist sig at være problematisk /55/. Tilsætning af en umættet fedtsyre har været foreslået for test af dioxiners bioopløselighed fra jord for at medtage dannelse af blandede miceller af galde og lipider fra føden som opløsningsvej i testen /56/, men effekten er ikke undersøgt.

Både SBRC og én af RIVM testene tilstræber i udgangspunkt at simulere bioopløsning i børns mave-tarmsystem under fastende forhold /52/, /49/. Den anden RIVM test tilstræber at simulere forholdene i børns mave-tarmsystem efter måltid /57/, mens DIN metoden tillader at sætte mælkepulver til testen som fødesurrogat uden i øvrigt at ændre på testudførelsen for at afspejle de forskelle, som fødeindtag giver i mave-tarmsystemet /48/.

RIVM testen efter måltid benytter tilsætning af babymad som føde, men har derudover justeret sammensætningen af testopløsningerne med hensyn til pH og koncentrationen af syre, galde og enzymer for at svare til forholdene efter fødeindtagelse /57/. Mængden af føde tilsat er valgt således, at yderligere fødetilsætning ikke viste øget bioopløselighed af BaP under fastlæggelsen af metoden /57/.

På den baggrund bør benyttes tests simulerende fastende forhold til metaller, da en sådan vil give worst case bioopløselighed for de fleste metaller, og test simulerende forhold efter måltid for organiske forureninger, da en sådan vil give worst case bioopløselighed for de fleste apolære, organiske forureninger.

4.1.3 Fordøjelsessegmenter

For at opnå en test, der omfatter de vigtigste elementer af menneskets fordøjelsesprocesser, se Bilag C for en detaljeret diskussion, er i første omgang peget på tests, der simulerer fysiologiske forhold og inkluderer segmenterne mund/spiserør, mave og tarm. For at begrænse testomkostningerne, og fordi testens formål er rutineundersøgelser modsat forskningsformål, er det foreslået i første omgang ikke at benytte separat analyse efter mave segment og efter tarm segment.

Der foreligger ikke oplysninger, der kan vise betydningen af at inkludere et segment, der simulerer processerne i mund og spiserør, se Bilag C. Betingelserne for segmentet mund og spiserør bør afspejle fysiologisk

relevante betingelser med lidt højere pH og amylase koncentration efter måltid end fastende.

Mave segmentet bør have en lav pH på <2 i test blandingen svarende til forholdene i et fastende barns mavesæk, henholdsvis 2-2.5 svarende til forholdene efter måltid. Test blandingen tilsættes yderligere chlorid i salte til næsten dobbelt så høj koncentration som i pH regulerende saltsyre alene med det formål at øge komplekseringen og dermed bioopløseligheden af f.eks. bly. Kombinationen af lav pH og højt chlorid indhold vil give høj opløselighed af et metal som bly. Der bør tilsættes organiske syrer, serum albumin og det protein nedbrydende enzym pepsin, hvilket vil give en højere opløselighed af jordkomponenter, forureninger og evt. tilsat føde. Test tiden for mave segmentet bør sættes til 2 timer, hvilket er højt i forhold til fysiologiske forhold og derfor kan give høj bioopløselighed.

I tarm segmentet bør sigtes efter en intermediaer pH på godt 5.5 fastende og på 6.5-7.0 efter måltid, således at metaller som bly ikke udfældes så omfattende fastende, mens organiske forureninger opløses bedre end ved valg af en lavere pH efter måltid. I tarm segmentet bør tilsættes organiske syrer, en høj koncentration af galde, pancreatin, det fedtstofnedbrydende enzym lipase og serum albumin for således at opnå en høj opløselighed af både organiske stoffer og metaller. Efter måltid bør koncentrationerne af galde og enzymer øges. Test tiden for tarm segmentet bør sættes til 2 timer, hvilket er lavt i forhold til andre metoders valg af fysiologisk realistiske opholdstider i den øverste del af tyndtarmen. Dette kan give lav bioopløselighed, men er valgt af praktiske årsager.

4.1.4 Praktisk testudførelse

Den praktiske testudførelse har først og fremmest til formål at sikre en reproducerbar og effektiv test, se Bilag C for en mere detaljeret diskussion..

Det foreslås at benytte test med "all over" opblanding i klimarum ved 37°C , f.eks. 10 rpm, hvor effektiviteten af denne opblanding skal sikres ved visuel inspektion. Justering af pH foretages lettest ved tilstrækkelig tilsætning af buffrede testopløsninger. Adskillelse af jord fra testopløsning kan foretages ved centrifugering ved omkring 2750 g i 5 minutter. Der tilstræbes dermed ikke fjernelse af kolloid bundne forureninger fra testopløsningen.

Der skal benyttes materialer og rengøring i testene, der ikke påvirker testforløbet, og fravær af både prøveforurening og -tab under testene skal dokumenteres ved test af blind- og kontrolprøver, se afsnit 4.3.

Der bør benyttes tests, der som de fleste tests benytter et samlet L/S på omkring 100 L/kg (se også Bilag C), blandt andet ud fra praktiske overvejelser vedrørende forsøgsdesign og ud fra et ønske om at nå en tilstrækkeligt lav detektionsgrænse for testen.

Tests uden forholdsregler for fastholdelse af redox forhold (aerobe eller anaerobe) kan for at bevare testene simplest muligt benyttes, så længe redox følsomme stoffer ikke testes.

4.1.5 Valg af testmetode og betingelser

Overordnet er på baggrund af en gennemgang og sammenligning af de enkelte testmetoders tekniske udformning (afsnit 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 og

Bilag C) valgt at afprøve testbetingelserne i RIVMs tests. Dette kan begrundes med, at disse tests:

- omfatter alle vigtige opløsningsprocesser for jordforureninger i mave-tarmsystemet
- kan udføres i store test serier og med rimelige omkostninger
- understøttes af et aktivt forsknings- og anvendelsesmiljø
- findes i versioner for både fastende betingelser og efter måltid

Der er taget udgangspunkt i ønsket om at benytte realistiske men forsigtige betingelser for testen, således at der for metaller benyttes alle 3 segmenter, samt betingelser svarende til fastende forhold, mens der for organiske stoffer ligeledes benyttes alle 3 segmenter, men betingelserne svarer her til efter måltid. Det er for at fastholde de enklest mulige test valgt ikke at foretage en separat analyse af bioopløselighed efter mave og tarm segment, men alene efter den samlede test.

På en række punkter kunne en modificering af RIVM's testbetingelser give en test, der er mere realistisk. Det vurderedes dog indledningsvist, at fordelene herved mere end opvejedes af ulemperne ved ikke at kunne sammenligne resultater fra danske tests med resultater opnået af RIVM og dets samarbejdspartnere.

Efter utilfredsstillende sammenhæng for bly imellem *in vitro* resultater opnået med RIVM testen med fastende betingelser og *in vivo* resultater, se afsnit 7.3.1, besluttedes supplerende at afprøve RIVM testen med fastende betingelser uden tarm segment, samt SBRC testen.

4.1.6 Krav til testkvalitet

For at sikre fornøden kvalitet af test for bioopløselighed er inden afprøvningen formuleret specifikke krav til testkvalitet, se Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Opsummering af krav til kvalitet af test for bioopløselighed af jordforureninger

Matrice	Metaller			PAH	
	Cadmium	Bly	Nikkel	Benzo(a)pyren	Dibenz(a,h)anthracen
Parameter					
<i>Test</i>					
Relativ standardafvigelse	<15%				
Detektionsgrænse (mg/kg TS)	0,5	4	3	0,01	0,01

Krav til detektionsgrænser, relativ standardafvigelse og genfinding er sat med udgangspunkt i forventet bedst opnåelige, realistiske analysekvalitet og er revurderede efter gennemførelsen af afprøvningen i denne undersøgelse. For test er som detektionsgrænsekraft valgt 1/10 af koncentrationen i opløsninger fra test af jord med indhold svarende til værdien af det tilknyttede kriterium og 100% bioopløselighed.

4.2 Analyser af jord og testopløsninger

4.2.1 Valg af analysemetoder

I Bilag C er givet en opsummering af de analysemetoder, der er benyttet for de 3 mest udbredte bioopløselighedstests.

Analyse af jord for metaller skal i Danmark udføres efter DS 259, der benytter oplukning med HNO_3 , 1:1, i autoklave (dvs. ved forhøjet temperatur og under tryk), efterfulgt af ICP¹ eller AAS² bestemmelse /58/. Denne metode er lagt til grund ved udarbejdelse af jordkvalitetskriterierne.

For at belyse den praktiske betydning af forskellig oplukning, se afsnit 2.1, er i projektet udført en sammenligning af metalindhold målt i udvalgte jordprøver efter oplukning efter DS 259 og med kongevand, idet oplukning med kongevand er én af de metoder, der benyttes udbredt internationalt, se afsnit 4.2.3.

Til analyse af jordprøver for PAH anvises i Danmark ekstraktion med toluen/vandig pyrophosphat opløsning efterfulgt af GC-MS /58/, men flere ny metoder er under udvikling for Miljøstyrelsen.

Der foreligger ikke tilstrækkeligt mange oplysninger om analysemetoder benyttet til bestemmelse af total PAH i jord i forbindelse med test for bioopløselighed til, at der kan foretages en kvantitativ vurdering af den praktiske betydning af metodeforskelle. For PAH analyse tilstræbes ved design af analysemetoderne, i modsætning til for metaller, at jordens totale indhold af PAH ekstraheres og bestemmes. Det må derfor forventes, at der ikke vil være større forskelle på analyseresultater for total PAH i jord opnået med forskellige, tilfredsstillende validerede analysemetoder.

For analyse af testopløsninger findes ikke i Danmark krævede eller anviste metoder for metaller eller PAH. For grundvand ville normalt blive benyttet metalanalyse ved AAS efter DS 2211 eller ved ICP efter ISO 11885, mens PAH analyse normalt vil blive foretaget efter ekstraktion ved GC-MS.

For at benytte samme total analysemetoder for metaller i jord som krævet i Danmark, samt udfra metoder benyttet i de 3 test metoder bør følgende fremgangsmåder for analyser af jord og testopløsninger benyttes:

- totalanalyser for metaller i jord efter DS 259 ved oplukning med HNO_3 , 1:1, efterfulgt af ICP bestemmelse
- analyser af metaller i testopløsninger ved fortynding med syre opløsning efterfulgt af ICP bestemmelse
- totalanalyser for PAH i jord ved ekstraktion efterfulgt af GC-MS bestemmelse
- analyser for PAH i testopløsninger ved væske-væske ekstraktion efterfulgt af GC-MS bestemmelse

¹ Induktivt koblet plasma, en analysemetode til multielementbestemmelse

² Atom absorptionspektrofotometri, en ældre analysemetode til enkeltvis bestemmelse af metaller og lignende stoffer

4.2.2 Krav til analysekvalitet

For at sikre fornøden kvalitet af test for bioopløselighed er inden afprøvningen formuleret specifikke krav til analyse- og testkvalitet, se Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Opsummering af krav til kvalitet af analyser ved test for bioopløselighed af jordforureninger

Matrice	Metaller			PAH	
	Cadmium	Bly	Nikkel	Benzo(a)pyren	Dibenz(a,h)anthracen
Parameter					
<i>Analyse af jord</i>					
Relativ standardafvigelse	<15%				
Genfinding	90-110%				
Detektionsgrænse (mg/kg TS)	0,5	4	3	0,01	0,01
<i>Analyse af testopløsning</i>					
Relativ standardafvigelse	<10%				
Genfinding	90-110%				
Detektionsgrænse (µg/L)	5	40	30	0,1	0,1

Kravene til detektionsgrænser for jordanalyser er sat til 1/10 af de jordkvalitets- eller afskæringskriterier, hvortil de planlagte test for bioopløselighed er knyttet. Der er ikke danske, formelle krav til kvalitet ved analyse af jord for metaller og PAH, men de i projektet benyttede krav er svarende til eller lidt svagere end kravene til kvalitetsklasse 3 i Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger mv. /59/.

4.2.3 Opnået kvalitet af analyser af jord

Analyser af jord er foretaget i 3 forskellige analyseserier i forbindelse med de 3 faser af afprøvning og dokumentation af testmetoder.

Analyser af jordprøver er gennemført med standardmetoder, hvor analysekvaliteten fra laboratoriets interne kvalitetskontrol er vist i Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Principper og analysekvalitet for jordanalyser som opgivet af analyselaboratoriet i serie 1

Parameter	Metaller			PAH	
	Cadmium	Bly	Nikkel	Benzo(a)pyren	Dibenz(a,h)anthracen
Princip	Oplukning af jordprøve med halvforyndet salpetersyre under tryk, efterfulgt af analyse ved ICP-OES. Kalibrering ved ekstern standardkurve.			Ekstraktion af jordprøve med vandig pyrophosphat opløsning og dichlormethan, efterfulgt af analyse ved GC-MS. Kalibrering ved ekstern standardkurve og brug af tilsat interne deutererede standarder.	

Parameter	Metaller			PAH	
	Cadmium	Bly	Nikkel	Benzo(a)pyren	Dibenz(a,h)anthracen
Relativ standardafvigelse (%)	10	10	10	12	12
Genfinding ³ (%)	90-110	95-105	95-105	95-105	- ⁴
Detektionsgrænse (mg/kg TS)	0,1	3	1	0,005	0,005

De opnåede detektionsgrænser er under kravforslagene (se afsnit 4.2.2). Præcision og genfinding er acceptabel for analyser af jord, men overholder som forventeligt for denne type jordanalyser ikke helt kravene til analysekvalitetsklasse 3 /59/.

Der er i forbindelse med afprøvningen for metaller foretaget analyser af de certificerede referencematerialer NIST 2710 og 2711, se Tabel 4.5.

I forbindelse med projektets 2. fase er indhentet et antal jordprøver, som tidligere er analyseret for bly, cadmium og/eller nikkel på andre analyselaboratorier med andre metoder. Nedenfor i

³ Opnået ved analyse af referencemateriale certificeret til denne metode (metaller) eller af kontrolprøver tilsat kendte mængder (PAH)

⁴ Laboratoriets kvalitetskontrol har ikke omfattet DBahA med hensyn til genfinding fra jord

Figur 4.2 er vist, i hvilket omfang de tidligere opnåede analyseresultater for jordprøverne svarer til resultater opnået i denne undersøgelse.

For bly er opnået sammenlignelige værdier i tidligere offentliggjorte undersøgelser af indhentede jordprøver, men lidt højere værdier ved certificering af referencematerialet. For nikkel og cadmium er opnået lidt højere værdier i tidligere offentliggjorte undersøgelser og ved certificering af referencematerialet end i denne undersøgelse. For cadmium er genfindingen af referencematerialet NIST 2711 i fase 3 så lav, at cadmium resultater fra denne serie ikke er benyttet i udregning af bioopløselighed i denne serie.

Tabel 4.5 Genfinding for metaller ved analyse efter DS 259 for de certificerede reference materialer NIST 2710 and 2711

NIST 2710, fase 1	Pb	Cd	Ni
Certificeret værdi (gennemsnit mg/kg \pm 95% konfidensinterval)	5532 \pm 80	21.8 \pm 0.8	14.3 \pm 1.0
DS 259 (mg/kg)	5100	20	9.7
Genfinding DS 259 (%)	92	92	68
NIST 2711, fase 3	Pb	Cd	Ni
Certificeret værdi (gennemsnit mg/kg \pm 95% konfidensinterval)	1162 \pm 31	41.7 \pm 0.25	20.6 \pm 1.0
DS 259 (mg/kg)	1100	31.0	⁵
Genfinding DS 259 (%)	95	74	-

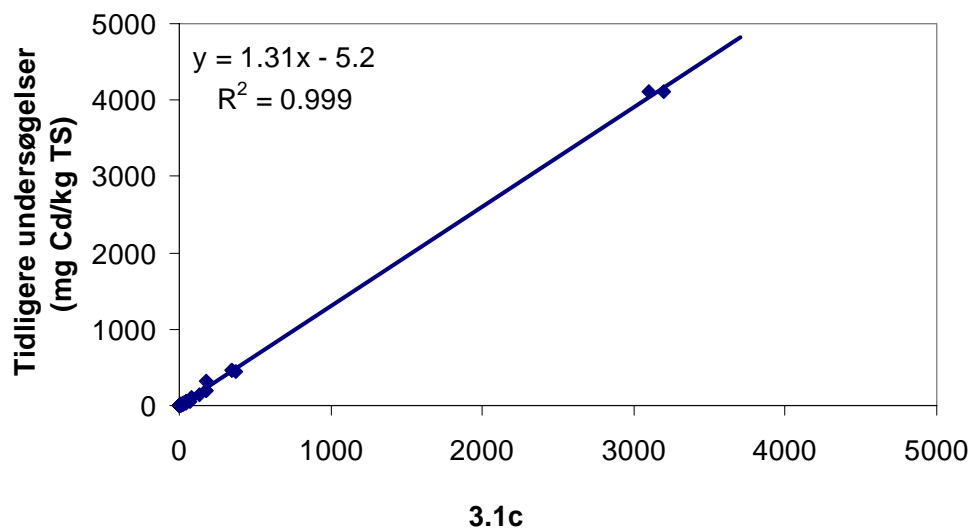
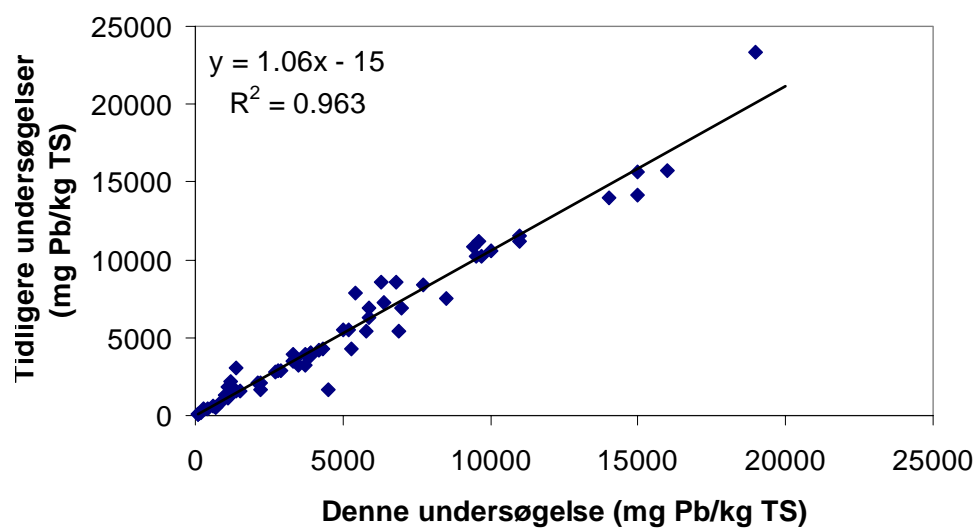
De generelt lidt lavere indhold af metaller fundet ved DS 259 sammenholdt med tidligere fundene værdier opnået med andre metoder kan skyldes en mindre effektiv oplukning af jordprøverne inden ICP-OES analyse i den danske analysemetode.

Der er bl.a. derfor gennemført sideløbende analyser af i alt 16 jordprøver for metaller efter oplukning efter DS 259 og med kongevand. Jordprøverne er udtaget fra i alt 7 lokaliteter med forskellig kilde til forureningen. I Figur 4.3 er vist resultater opnået efter oplukning med kongevand imod resultater opnået efter oplukning efter DS 259.

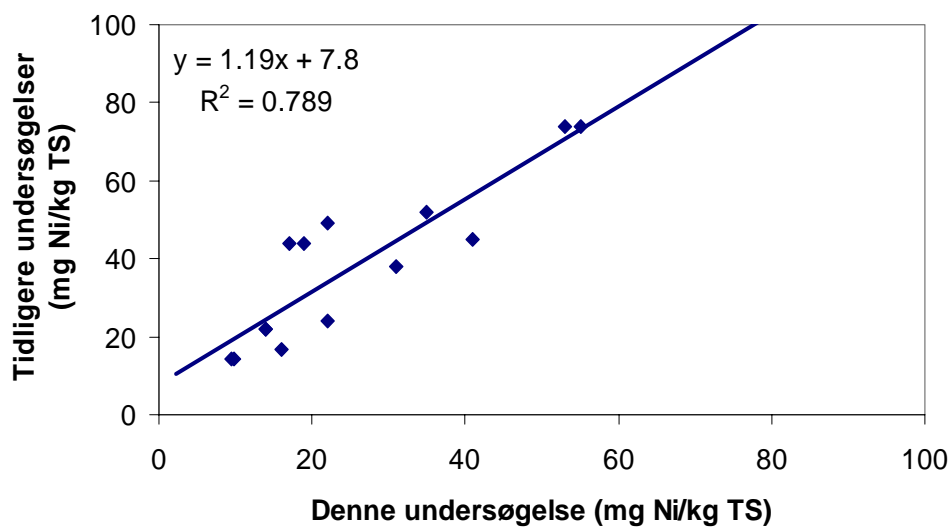
Figur 4.3 viser lineær sammenhæng imellem resultater opnået med de 2 oplukningsmetoder. I Tabel 4.6 er vist forholdet imellem resultater opnået med de 2 oplukningsmetoder beregnet for en koncentration svarende til det kvalitetskriterium, der indgår i denne undersøgelse. Inden beregning er udelukket resultater større end 10 x kriterieværdien, idet disse får uforholdsmæssig stor indflydelse på beregninger foretaget med lineær regression. For at vise forskellen på enkeltmålinger opnået med de 2 oplukningsmetoder er i Tabel 4.6 endvidere vist intervallerne for variationsbredden (dvs. forskellen på måling for samme jordprøve med de 2 metoder) og den gennemsnitlige variationsbredde.

⁵ -: not analyzed

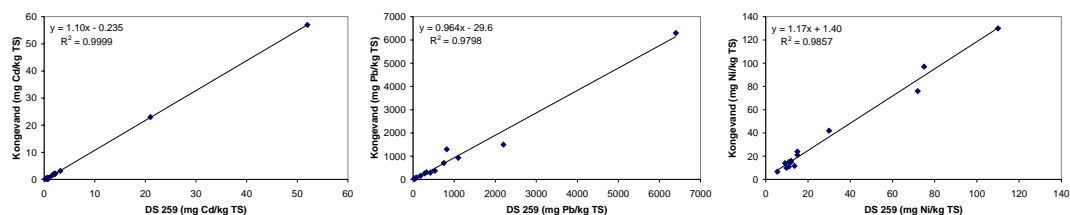
Figur 4.2 Resultater af analyser af jordprøver for metaller i tidligere undersøgelser imod resultater i denne undersøgelse



3.1c



Figur 4.3 Indhold af metaller i jord opnået efter oplukning med kongevand imod resultater opnået efter oplukning efter DS 259



Tabel 4.6 Sammenhæng mellem resultater af analyser for metaller i jord udført efter oplukning med kongevand og efter oplukning efter DS 259

	Cadmium	Bly	Nikkel
Kriterieværdi valgt til beregning (mg/kg TS)	5	40	30
Forhold kongevand/DS 259 (%)	105	122	92
Antal resultatsæt bag beregningen	13	7	14
Relativ variationsbredde (%)	3-86	0-59	0-54
Gennemsnitlig relativ variationsbredde (%)	15	16	27

Resultaterne viser ikke nogen betydende systematisk forskel imellem resultater opnået efter oplukning med kongevand og efter oplukning efter DS 259 i denne del af undersøgelsen. For enkeltmålinger kan der dog være betydelige forskel på resultater opnået med de 2 metoder (op til 54-86% med gennemsnit 15-27%), hvor denne forskel udgøres af både systematisk og tilfældig fejl.

I forbindelse med test for bioopløselighed i denne undersøgelse er foretaget analyse for metallerne i en jord, Oker 11, der tidligere er analyseret med andre metoder, Tabel 4.7. Oker 11 er en forurenede jord fra et tysk forurenede grund, der desuden har været benyttet til en række undersøgelser af bioopløselighed.

Tabel 4.7 Resultater af analyse af Oker 11 jord for metaller efter forskellige oplukningsprincipper

(mg/kg TS)	Cadmium	Bly	Nikkel
DS 259, denne undersøgelse	24	6.500	60
Kongevand /60/	27	6.100	-
Flussyre /60/	26	6.200	-
Salpetersyre og brintperoxid /61/	20	6.300	77
Salpetersyre /60/	24	5.500	-

For denne jord tyder resultaterne ikke på, at analyseresultater for metallerne cadmium, bly og nikkel efter DS 259 er systematisk væsentligt lavere eller højere end resultaterne opnået med andre oplukningsmetoder, men der kan for andre metaller og nogen metoder ses betydelige forskelle.

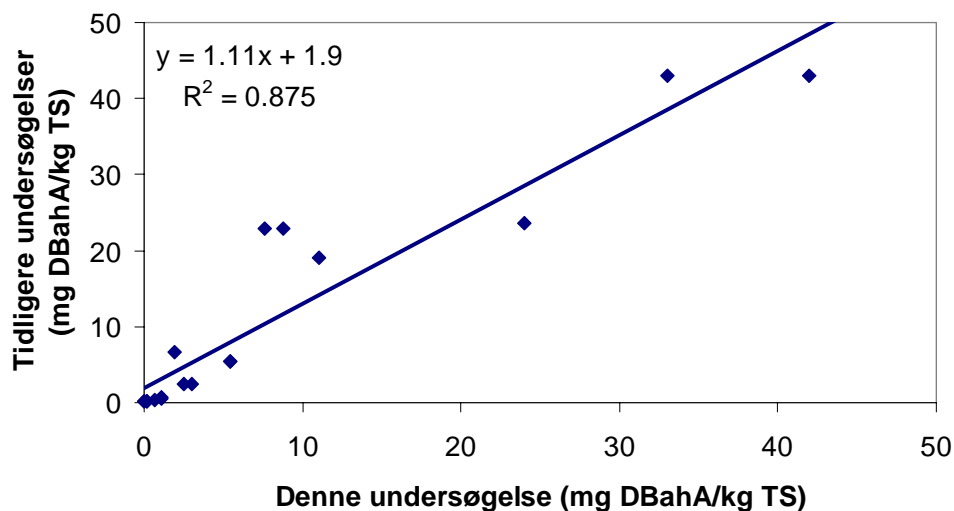
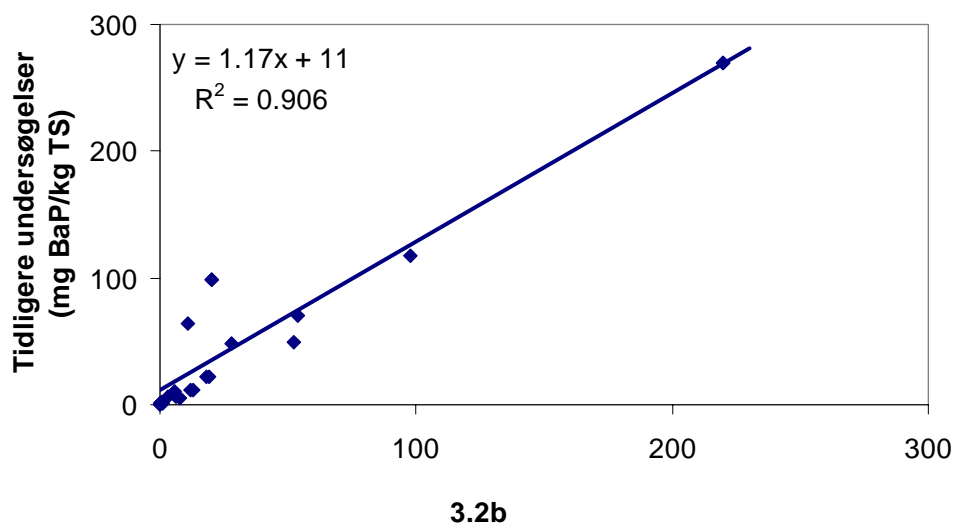
Samlet vurderes jordanalyserne for bly at have opfyldt kravet om 90-110% genfinding, mens cadmium lejlighedsvis og nikkel i de fleste tilfælde har givet lav genfinding. En systematisk afvigelse imellem resultater opnået med DS

259 sammenlignet med andre metoder for cadmium og nikkel på 20-30% (DS 259 lavest) antydes af resultaterne.

Der er ikke analyseret certificeret referencemateriale for PAH i denne undersøgelse.

I forbindelse med projektets 2. fase er som nævnt indhentet et antal jordprøver, som tidligere er analyseret på andre analyselaboratorier med andre metoder. Nedenfor i Figur 4.4 er for PAH vist, i hvilket omfang de tidligere opnåede analyseresultater for jordprøverne svarer til resultater opnået i denne undersøgelse.

Figur 4.4 Resultater af analyser af jordprøver for PAH i tidligere undersøgelser imod resultater i denne undersøgelse



De tidligere gennemførte analyser for PAH har givet lidt højere værdier end analyserne i denne undersøgelse.

Der er udført analyser på to delprøver af 12 indhentede jordprøver for metaller og de 4 prøver for PAH, og ud fra dobbeltbestemmelsernes relative forskel er beregnet (se /62/ for beskrivelse af metoden) den relative

standardafvigelse omfattende både prøveinhomogenitet og analytisk præcision (repeatabilitet), Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Relativ standardafvigelse for dobbeltbestemmelse af forureningsindhold i et udsnit af prøver

	Pb	Cd	Ni	BaP	DBahA
Antal dobbeltbestemmelser	12	12	12	4	4
Relativ standardafvigelse (%)	5.0	9.7	6.2	3.0	13

Præcisionen udtrykt som relativ standardafvigelse har opfyldt det krav (<15% relativ standardafvigelse), som tidligere er formuleret til jordanalyser ved gennemførelse af test for bioopløselighed, se afsnit 4.2.2. Samtidig viser den lave relative standardafvigelse, at prøver udvalgt til dobbeltbestemmelse i gennemsnit har været begrænset inhomogene.

4.2.4 Opnået kvalitet af analyser af testopløsninger

Analyser af testopløsninger er gennemført med metoder udviklet til formålet, hvor analysekvaliteten fra laboratoriets metodevalidering er vist i Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Principper og analysekvalitet for jordanalyser som opgivet af analyselaboratoriet i serie 1

Parameter	Metaller			PAH	
	Cadmium	Bly	Nikkel	Benzo(a)pyren	Dibenz(a,h)anthracen
Princip	Fortynding af testopløsninger med salpetersyre opløsning, efterfulgt af analyse ved ICP-OES. Kalibrering ved standardaddition.			Ekstraktion af testopløsninger med dichlormethan, oprensning på fastfasekolonne, efterfulgt af analyse ved GC-MS. Kalibrering ved ekstern standardkurve i testopløsning med brug af deutererede interne standarder.	
Relativ standardafvigelse (%)	0.58-1.1	1.2-4.5	0	3.3-3.7	2.1-4.1
Genfinding (%)	97-100	103-112	99	98-116	99-100
Detektionsgrænse (µg/L)	2	10	20	0.05	0.05

Resultaterne viser, at kravene til analysekvalitet for testopløsningerne er opfyldt, se afsnit 4.2.2, idet dog genfindingen for bly og for benzo(a)pyren er en smule for høj i forhold til kravet. Det skal bemærkes, at genfindingen er beregnet ud fra færre kontrolresultater, end det normalt ville være tilfældet ved rutinemæssig kvalitetskontrol.

I forbindelse med hver test er som standard analyseret opløsninger af rene stoffer i vand (metaller, 8 analyser) eller opløsningsmiddel (PAH, 3 analyser), se Tabel 4.10. Analyserne for metaller har for rene standardopløsninger opfyldt de krav (<15% relativ standardafvigelse, 90-110% genfinding), som er formulerede til analyser af testopløsninger ved gennemførelse af test for bioopløselighed, se afsnit 4.2.2.

Til eftervisning af genfinding fra testopløsninger blev i anden testrunde foretaget tilsætning (spikning) til test opløsninger efter klargøring til analyse

fra test af 3 forskellige prøver, heraf den ene med dobbeltbestemmelse både med og uden tilsætning. Resultaterne er vist i Tabel 4.11.

Tabel 4.10 Resultater af kontrolanalyser af rene opløsninger af metaller eller PAH

	Cd	Pb	Ni	BaP	DBahA
Genfindning (%)	108	105	108	94	104
Relativ standardafvigelse (%)	2.4	0.64	0.9	- ⁶	0.56

Tabel 4.11 Genfindning af metaller tilsat testopløsninger

Prøve	Koncentration i testopløsning			Genfindning af tilsætning		
	(mg Cd/L)	(mg Pb/L)	(mg Ni/L)	(% Cd)	(% Pb)	(% Ni)
Bruchsal	0.32	1.9	1.6	75	90	91
8-37926	3.2	17	14	98	89	90
8-122651	4.1	17	14	105	78	92

Analyserne for metaller har for testopløsninger med tilsætning ikke i alle tilfælde opfyldt det krav (90-110% genfindning), som er formuleret til analyser af testopløsninger ved gennemførelse af test for bioopløselighed, se afsnit 4.2.2. Antallet af gentagne analyser tillader ikke beregning af præcision efter tilsætning, men det ses, at genfindingen varierer, særligt for cadmium og bly. Det skal bemærkes, at der til denne delundersøgelse var udvalgt testopløsninger, hvor der på forhånd var mistanke om utilstrækkelig genfindning.

Analyser af testopløsninger for metaller er gennemført som beskrevet ved fortynding med en vandig opløsning af salpetersyre og analyse ved ICP-OES under anvendelse af standardaddition. Praksis i det laboratorium, som har udviklet testmetoden RIVM fastende tilstand, har været at analysere testopløsningerne straks efter fortynding og uden yderligere syrekonservering ("straksanalyser") /63/. I én del af fase 2 af denne undersøgelse blev denne test for bioopløselighed af metaller udført med konservering af testopløsninger med koncentreret salpetersyre og opbevaring af prøverne inden analyse. En nøjere analyse af denne fremgangsmåde, se Bilag D for en detaljeret gennemgang, viser, at denne fremgangsmåde for bioopløselighedstest for bly i en række jordprøver gav for lave resultater.

Det anbefales derfor, at analyser af testopløsninger for metaller efter RIVM fastende tilstand udføres som "straksanalyser" uden egentlig syrekonservering, for at opnå den størst mulige sikkerhed imod fejlbehæftede analyseresultater for bly. Det skal bemærkes, at tests med fejlbehæftede analyseresultater er gentaget med den anbefalede fremgangsmåde for prøvebehandling.

4.3 Kvalitetskontrol af analyser og tests

I Bilag C er givet en opsummering af de typer af kvalitetskontrol, der er benyttet for de 3 mest udbredte bioopløselighedstests.

Der skal benyttes almindelig kvalitetskontrol for de kemiske analyser af jordprøver og testopløsninger, herunder dobbeltprøver, blindprøver og kontrolprøver, samt vurdering af analysernes kvalitet (detektionsgrænse,

⁶ Standardafvigelsen kan ikke beregnes, da de 3 indgående resultater var ens

præcision og genfinding) i forhold til opstillede krav og af statistisk stabilitet ved hjælp af kontrolkort.

Det skal særligt bemærkes, at matricen for testopløsningerne har betydelig effekt på analysemetodens respons, både for metaller og for PAH. Kalibrering skal derfor udformes således, at der tages højde herfor i beregning af analyseresultaterne, f.eks. ved brug af standardaddition (metaller) eller ved brug af ekstern kalibreringskurve omfattende hele analyseproceduren kombineret med intern standard (PAH).

Der bør benyttes kvalitetskontrol i hver testserie omfattende 2 blindprøver og 2 syntetiske kontrolprøver, samt 1 dobbeltbestemmelse per lokalitet, mens muligheden for at fremstille eller anvise en stabil og homogen kontrolprøve til medtagelse i hver testserie bør overvejes. Indtil en sådan kontrolprøve foreligger, anbefales at foretage 1 test per serie af det certificerede kontrolmateriale NIST 2711.

Indhold af den aktuelle forurening i blindprøverne skal være så lavt og konstant, at den samlede test metodes detektionsgrænsekrav kan overholdes. Genfinding for syntetiske kontrolprøver skal være konstant, men afhænger af den valgte testmetode.

For SBRC metoden kan forventes at bioopløseligheden af bly fra NIST 2711 er 0.79 ± 0.13 (gennemsnit \pm standardafvigelsen) /64/, mens der for de øvrige forureninger og for RIVM metoderne endnu ikke kan angives forventelige resultater.

4.4 Forbehandling af jord

I Bilag C er vist forbehandlingsmetoder, der er benyttet for de 3 mest udbredte bioopløselighedstests.

Tørring gennemføres for at muliggøre efterfølgende knusning, sigtning eller homogenisering af jordprøverne. Tørring vil medføre tab af flygtige forbindelser og kan ændre metallers binding til jord, der i jordbunden ikke er aerob eller periodisk tørrer ud.

Knusning kan foretages for at adskille aggregater af mindre jordpartikler og gennemføres så oftest i en håndmørtel med begrænset knusningskraft eller direkte med hånden, f.eks. i en plastikpose. Formaling foretages i mekanisk knuseudstyr som kuglemølle eller mekanisk agatmørtel og knuser typisk de enkelte jord- og mineralpartikler til mindre partikler.

Sigtning til f.eks. $<250 \mu\text{m}$ partikelstørrelse benyttes ud fra en antagelse om, at de små jordpartikler hænger fast på børns hænder og derfor repræsenterer den reelle risiko for indtag. Det skal her bemærkes, at de danske jordkvalitetskriterier med hensyn til oral eksponering er baserede på egentlig spisning af jord og ikke kun på indtag af jord, der hænger fast på hænder, afgrøder mv.

Jo mere effektiv tørring, knusning, formaling, sigtning og homogenisering, jo mere præcist kan delprøver udtages til test, men samtidig foretages større indgreb i jordens integritet og i egenskaber, der testes for. Tørring, knusning og homogenisering anses for nødvendig for at opnå acceptabel præcision af test for bioopløselighed, idet der i alle metoder udtages små mængder prøve til test.

I Miljøstyrelsens vejledning vedrørende prøvetagning og analyse af jord /58/ anvises for metalanalyse:

- partikler større end 5-10 mm skal frasorteres

Der gives mulighed for:

- tørring ved 40°C
- knusning
- sigtning til < 2mm
- homogenisering

Det anføres, at for mere end 10% frasorterede sten skal mængden opgives i analyserapporten. For PAH giver vejledningen alene mulighed for frasortering af partikler større end 5-10 mm.

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for Kemiske Miljøanalyser har foretaget en indledende vurdering af forbehandling af jordprøver inden analyse /65/ med udgangspunkt i den internationale standard ISO 11464 /66/ og Miljøstyrelsens vejledning /58/. Det konkluderes, at tørring og sigtning (<2 mm) er en fordel, at frasorteret materiale skal beskrives og vejes, samt at formaling ikke kan anbefales.

På danske laboratorier vil indtil videre som regel alene blive foretaget en frasortering af partikler større end cirka 2 mm fra den våde jordprøve. Til analyse for metaller udtages normalt cirka 1 g jord, mens der til PAH analyse normalt udtages cirka 50 g jord.

For at inddrage samme fraktion af jorden for analyser og test for bioopløselighed, for at tage højde for jordkvalitetskriteriernes basis i egentlig jordspisning og for at give mulighed for tilstrækkeligt præcis udtagning af prøver til test bør følgende forbehandling af jordprøver inden test for bioopløselighed benyttes:

- tørring af mindst 250 g vejet jord i ovn ved 40° til konstant (til <5% ændring i vægttab per 24 timer) vægt (noteres)
- manuel frasortering af sten, grene m.v. over 2 mm
- forsigtig knusning af jordaggregater, evt. i håndmorter (porcelæn)
- manuel frasortering af sten over 2 mm
- sigtning til < 2mm
- eventuelt gentagelse af knusning og sigtning af sigterest, hvis jordaggregater kan ses
- homogenisering af sigtet prøve ved omrøring
- udtagning af repræsentativ delprøve til test af tør, sigtet og homogeniseret prøve
- vejning af samlede frasorterede fraktioner

Der benyttes sigter af hård plast og teflonbelagte skeer.

Det endelige resultat kan korrigeres til oprindelig tørvægt ud fra vejetal for tør total prøve og tør frasorteret fraktion. Alternativt kan størrelsen af frasorteret fraktion (% af total prøve) angives.

Denne fremgangsmåde bør ikke benyttes, såfremt flygtige stoffer (kviksølv, mange organiske forureninger herunder mindre PAH) skal testes, og ikke, såfremt den udtagne jord er vandmættet og kan være anaerob.

5 Afprøvning af RIVM testmetoder

Testmetoderne RIVM fastende og efter måltid er indarbejdet og afprøvet til test for bioopløselighed af metallerne bly, cadmium og nikkel, samt PAH forbindelserne benzo(a)pyren (BaP) og dibenz(a,h)anthracen (DBahA), henholdsvis.

5.1 Test for metalleres bioopløselighed

Test for metalleres bioopløselighed er gennemført efter RIVMs metode for fastende betingelser /8/, hvor testmetoden er detaljeret givet i bilag A, tilrettet efter den samlede undersøgelses resultater. Metoden er sat op og indledende afprøvet for kritiske parametre som blindbidrag, forudsigtelse af testdetektionsgrænse, genfindning af tilsatte metaller og praktisk håndtering af jordprøver i testen. Disse resultater er ikke vist, idet de primært tjener til justering af metoden under opsætning.

Efter opsætning er testmetoden afprøvet efter principperne for validering af kemiske analysemetoder /67/, men i et omfang der er reduceret i forhold hertil. Resultaterne af testmetodeafprøvningen er vist i Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Resultater af testafprøvning for metaller, fastende metode

	Cadmium	Bly	Nikkel
Detektionsgrænse (mg/kg TS)	0.2	2	0.8
Præcision total (% RSD)	7.2	20	8.8
Præcision imellem serier (% RSD)	6.9	19	8.4
Præcision indenfor serier (% RSD)			
Jord		5.7	7.4
Jord tilsat 1 x krav	1.8	5.0	2.5
Jord tilsat 5 x krav	2.9	7.0	1.2
Genfindning (% af tilsat)			
Jord tilsat 1 x krav	66	7.3	69
Jord tilsat 5 x krav	73	5.6	72
Linearitet (mg/kg TS)	25	(160)	130

Detektionsgrænsen for testen er for alle metallerne under kravet om højst at være 1/10 af de relevante kriterier, se afsnit 4.2.2.

Præcisionen ved testen er næsten tilfredsstillende for cadmium og bly i forhold til kravet om højst 7% total relativ standardafvigelse i kvalitetsklasse 3 /59/. For bly er præcisionen ikke tilfredsstillende, hvilket skyldes en høj variation, når testen er afprøvet over 3 dage. Gennemgang af proceduren under afprøvningen viste, at pH af testopløsningerne og dermed også pH under testen havde været faldende over de 3 testdage. Dette har formodentlig medført en stigende tendens i testresultaterne for bly over afprøvningens 3 dage og følgelig også den noget dårligere præcision imellem serierne. Den faldende pH i testopløsningerne tilskrives, at 2 opløsninger ikke blev frisk fremstillet til hver serie, og kravet herom er nu fremhævet i testforskriften. Det skal bemærkes, at testkvaliteten er svarende til eller bedre end rapporteret fra RIVM for test efter måltid /57/.

Genfindning som bioopløselig metal var under (cadmium og nikkel) eller langt under (bly) 100% af den til jorden tilsatte mængde. De tilsvarende genfindinger for testsystemet uden jord er vist i Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Resultater af test for metaller, fastende metode uden jord

	Cadmium	Bly	Nikkel
Præcision indenfor serier (% RSD)			
Test tilsat 1 x krav	1.9	5.0	2.2
Test tilsat 5 x krav	2.9	3.2	4.3
Hvedemel tilsat 5 x krav	0.6	1.9	<0.1%
Genfindning (% af tilsat)			
Test tilsat 1 x krav	99	61	99
Test tilsat 5 x krav	98	80	98
Hvedemel tilsat 5 x krav	96	74	99

Resultaterne viser, at præcisionen uden jord var sammenlignelig med præcisionen med jord i testen, samt at genfindingen undtagen for bly var tæt på 100% uden jord i testsystemet. Resultaterne tyder ikke på, at tilstedeværelse af hvedemel påvirker genfindingen af metallerne i testen. Derfor er den toksikologiske reference hvedemel efterfølgende erstattet af en doseringsreference, som blot er test tilsat en opløsning af tungmetallerne. Endelig viser en genfinding på tæt på 100% for de 2 kationiske metaller cadmium og nikkel, at kolloider i testopløsningerne ikke skilles fra testopløsningen i faseadskillelsen (centrifugering), idet dette på grund af binding af kationerne til kolloiderne ville have vist sig som genfindinger væsentligt under 100%.

Genfindingen i testen uden jord er altså tæt på 100% for cadmium og nikkel, mens den er 61-77% for bly. For metaller, der kan udfælde i tarm segmentets neutrale pH og med tilstedeværelse af f.eks. fosfat, kan ikke forventes 100% genfinding af tilsat letopløseligt metalsalt i testen. Denne tendens forstærkes, hvis testen tillige indeholder jord, idet slut pH i testen og indholdet af fældende anioner yderligere øges. Derfor kan kravet for kvalitetsklasse 3 /59/ om genfinding af et kontrolmateriales sande værdi indenfor 95-105% ikke efterprøves ved test af simple kontrolprøver.

Genfinding af tilsat bly på under 100% i testen forventedes kompenseret i den praktiske udførelse ved udregning af den relative bioopløselighed, se dog også afsnit 5.3.

Der foreligger ikke referencematerialer certificerede med hensyn til indhold af bioopløselige stoffer efter RIVM fastende, ligesom der endnu ikke gennemføres egentlige præstationsprøvninger herfor. I afprøvningen af testmetoden er her i fase 1 foretaget test af én jordprøve, Oker 11, for hvilken testresultater er opnået i andre laboratorier og med andre test- og analysemetoder, Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Resultater af test af Oker 11 jord for bioopløselighed af metaller med forskellige testmetoder/i forskellige laboratorier

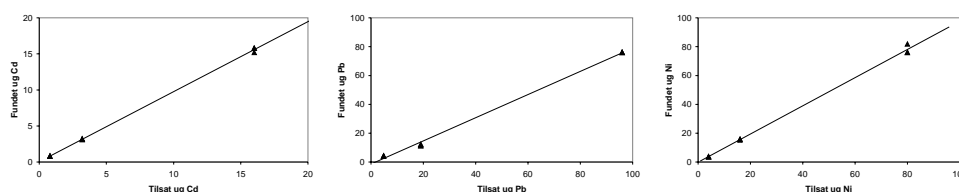
(bioopløselighed \pm 1 standard afvigelse)	Cadmium	Bly	Nikkel
Denne undersøgelse, RIVM fastende	0.48 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01
RIVM fastende på RIVM /60/	0.51 \pm 0.04	0.29 \pm 0.02	-

(bioopløselighed ± 1 standard afvigelse)	Cadmium	Bly	Nikkel
DIN uden fødetilsætning /61/	0.43±0.05	0.13±0.01	0.22±0.01

Det skal bemærkes, at resultater for bioopløselighed givet i Tabel 5.3 ikke kan sammenlignes direkte, idet bioopløseligheden her opgives relativ til total koncentrationen, og denne i et vist omfang afhænger af analysemetoden, se Tabel 4.7. Som eksempel kan anføres, at beregnes bioopløseligheden af bly som opnået i denne undersøgelse ikke relativt til denne undersøgelses total koncentration, men relativt til total koncentrationen som målt af RIVM for den samme jord, se Tabel 4.7, så bliver bioopløselighedsresultatet 0.22. Der bliver altså bedre overensstemmelse imellem bioopløselighedsresultaterne opnået på forskellige laboratorier, hvis de beregnes relativt til total koncentrationer opnået med samme metode.

Lineariteten af testen er efterprøvet op til 4-5 x den relevante kriterieværdi for det enkelte metal ved test af tilsætning uden jord. For cadmium og nikkel er vist linearitet, mens der for bly er fundet signifikant afvigelse fra linearitet (Z-test, 95% konfidensniveau /67/). Den manglende linearitet kan formodentlig forklares ved den tidligere omtalte dag til dag variation, idet lineariteten blev testet over flere dage. Resultaterne af linearitetstest er vist i Figur 5.1.

Figur 5.1 Resultater for efterprøvning af linearitet ved test for metaller uden jord



Under afprøvningen af test for metaller er løbende foretaget analyse af de stamopløsninger, som er fremstillet til og benyttet ved tilsætning af kendte mængder metal til prøverne. Resultaterne af disse analyser viser, at analyseresultater og beregnet indhold stemmer overens for alle metaller over hele afprøvningsperioden, se Tabel 5.4. De beregnede koncentrationer er benyttet i alle videre udregninger.

Tabel 5.4 Resultater af analyser af stamopløsninger igennem afprøvningsperioden for test for metaller

(mg/L)	Cadmium	Bly	Nikkel
Gennemsnit, 4 analyser	33	200	170
Standardafvigelse, 4 analyser	2.2	11	15
Beregnet koncentration	32	192	160

5.2 Test for PAH's bioopløselighed

Test for PAH forbindelsers bioopløselighed er gennemført efter RIVMs metode svarende til efter måltid /9/, hvor testmetoden er detaljeret givet i bilag B, tilrettet efter den samlede undersøgelses resultater. Metoden er sat op og indledende afprøvet for kritiske parametre som blindbidrag, forudsigelse af testdetektionsgrænse, genfindning af tilsatte PAH og praktisk håndtering af

jordprøver i testen. Disse resultater er ikke vist, idet de primært tjener til justering af metoden under opsætning.

Efter opsætning er testmetoden afprøvet efter principperne for validering af kemiske analysemetoder /67/, men tekniske vanskeligheder i forbindelse med analyserne af testopløsninger for PAH betød, at resultaterne var behæftet med for stor usikkerhed og viste en utilfredsstillende genfindning af tilsatte PAH. Efter afhjælpning af de analysetekniske vanskeligheder er foretaget en afprøvning af de vigtigste parametre for testens ydelse. Resultaterne af testmetodeafprøvningen er vist i Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Resultater af testafprøvning for PAH, efter måltid metode

	BaP	DBahA
Detektionsgrænse (mg/kg TS)	0,01	0,005
Præcision indenfor serier (% RSD)		
Jord	13	7
Jord tilsat 1 x krav	14	15
Jord tilsat 5 x krav	11	14
Genfindning (% af tilsat)		
Jord tilsat 1 x krav	84	86
Jord tilsat 5 x krav	73	78
Linearitet (mg/kg TS)	0.01-50	0.005-50

Detektionsgrænsen for PAH er opnået ved test af naturlige jordprøver, hvor detektionsgrænsen for testen for DBahA er sat op for at svare til den detektionsgrænse, som opgives for analyserne af testopløsningerne. Detektionsgrænsen for testen overholder for begge PAH målsætningen om at være højst 1/10 af den relevante kriterieværdi, se afsnit 4.2.2.

Afprøvningen er foretaget på én dag i én serie, og præcisionen imellem serier kan dermed ikke angives. Præcisionen overholder ikke kravet til højst 7% relativ total standardafvigelse for kvalitetsklasse 3 /59/. Dette er dog forventeligt, når den sædvanlige analysekvalitet for organiske forureninger i jord tages i betragtning. Det skal bemærkes, at testkvaliteten er svarende til eller bedre end rapporteret fra RIVM for samme test /57/.

Genfindingen af tilsat PAH som bioopløselig PAH er for begge stoffer noget under 100%. Den tilsvarende genfindning for testsystemet uden jord er vist i Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Resultater af test for PAH, efter måltid metode uden jord

	BaP	DBahA
Genfindning (% af tilsat)		
Test tilsat 10 x krav	78	85
Hvedemel tilsat 10 x krav	74	81

Den relative standardafvigelse lader sig ikke beregne, da der kun indgik 2 prøver af hver slags (test uden jord og test uden jord med hvedemel), men den gennemsnitlige relative variationsbredde var 3-10% og dermed væsentligt lavere end den relative standardafvigelse som målt for testen med jord tilsat.

Resultaterne viser, at genfindingen uden jord og uden jord med hvedemel er sammenlignelig med genfindingen med jord i testen. Resultaterne tyder ikke

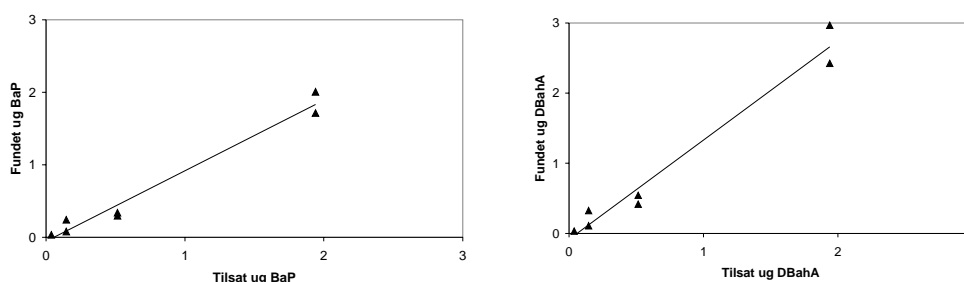
⁷ Måleresultater lavere end detektionsgrænsen for analyse af testopløsninger

på, at tilstedeværelse af hvedemel påvirker genfindingen af PAH i testen. Derfor er den toksikologiske reference hvedemel efterfølgende erstattet af en doseringsreference, som blot er test tilsat en opløsning af PAH forbindelserne. Endelig viser en genfinding ikke langt fra 100% for de 2 PAH, at kolloider i testopløsningerne ikke skilles fra testopløsningen i faseadskillelsen (centrifugering), idet dette på grund af binding af PAH til kolloiderne ville have vist sig som genfindinger væsentligt under 100%. Genfindingen i testen uden jord på samme niveau som med jord viser, at PAH i testen i et vist omfang bindes i uopløselige testkomponenter og ikke i komponenter, der tilføres med jorden. Derfor kan kravet for kvalitetsklasse 3 /59/ om genfinding af et kontrolmateriale sande værdi indenfor 95-105% ikke efterprøves ved test af simple kontrolprøver. Der er ikke i denne del af afprøvning testet jordprøver, for hvilke der foreligger pålidelige resultater af bioopløselighedstest fra andre laboratorier eller med andre tests.

Genfinding af tilsat PAH på under 100% i testen forventedes kompenseret i den praktiske udførelse ved udregning af den relative bioopløselighed.

Lineariteten af testen er efterprøvet op til 500 x den relevante kriterieværdi for den enkelte PAH ved test af tilsætning uden jord. Testen er fundet lineær over hele intervallet. Det skal bemærkes, at afprøvning af linearitet blev udført med analyser af testopløsninger med betydelig analyseusikkerhed og genfinding afvigende fra 100%, fordi ikke alle tekniske vanskeligheder med analysemetoden endnu var løst. Resultaterne af linearitetstest er vist i Figur 5.2.

Figur 5.2 Resultater for efterprøvning af linearitet ved test for PAH uden jord



Under afprøvningen af test for PAH er løbende foretaget analyse af de stamopløsninger, som er fremstillet til og benyttet ved tilsætning af kendte mængder PAH til prøverne. Resultaterne af disse analyser viser, at analyse-resultater og beregnet indhold stemte overens for begge PAH over hele afprøvningsperioden, se Tabel 5.7. De beregnede koncentrationer er benyttet i alle videre udregninger.

Tabel 5.7 Resultater af analyser af stamopløsninger igennem afprøvningsperioden for test for PAH

($\mu\text{g/L}$)	BaP	DBaH
Gennemsnit, 4 analyser	0,94	1,01
Standardafvigelse, 4 analyser	0,043	0,053
Beregnet koncentration	0,96	0,98

5.3 Variationer i test pH

Der er tidligere opstillet krav til slut pH i testopløsninger efter såvel mave- som tarm segment, både for testen svarende til fastende for hold og til efter måltid /68/. Disse krav skulle sikre bioopløselighedsforhold indenfor det fysiologisk korrekte, og således forhindre for lav opløsning af jordforureninger i både mave og tarm, samt udfældning som følge af forhøjet pH.

Under gennemførelse af tests af jordprøver fra danske forurenede grunde (se kapitel 6) er foretaget målinger af pH i testopløsningerne, og disse er i Tabel 5.8 opsummeret sammen med de tilstræbte pH intervaller for testene. Ud fra de ønskede og opnåede pH værdier i testopløsningerne, samt ud fra de i kapitel 4 diskutererede forhold vedrørende pH i de forskellige testsegmenter er i Tabel 5.8 angivet et interval for pH i testsegmenterne, som skal være opfyldt.

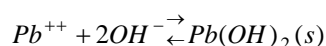
Tabel 5.8 pH i testopløsninger sammenholdt med tilstræbte pH intervaller

	Mave segment		Tarm segment	
	Fastende	Efter måltid	Fastende	Efter måltid
Tilstræbt interval	1.2	2.0-2.5	>5.5	6.5-7.0
Gennemsnit målt ± standardafvigelse	1.65±0.12	2.21±0.24	6.39±0.28	7.00±0.05
Interval målt	1.39-1.83	1.95-2.78	5.82-6.78	6.90-7.13
Krav til interval	<1.8	2.0-2.5	5.5-7.0	6.8-7.2

Kravværdierne for pH under testen er indført i analysemetoderne, Bilag A og B.

Det skal bemærkes, at endnu ikke offentliggjorte resultater af undersøgelser foretaget af RIVM viser, at med test af reduceret jordmængde (0.06 g imod standard 0.6 g) kan pH også for udvalgte danske jordprøver holdes under 1.8 efter mave segment {Oomen 2005 218 /id}.

Særligt for bly er slut pH i tarm segmentet kritisk, idet bly udfældes ved den relativt høje pH, som tilstræbes i dette segment:



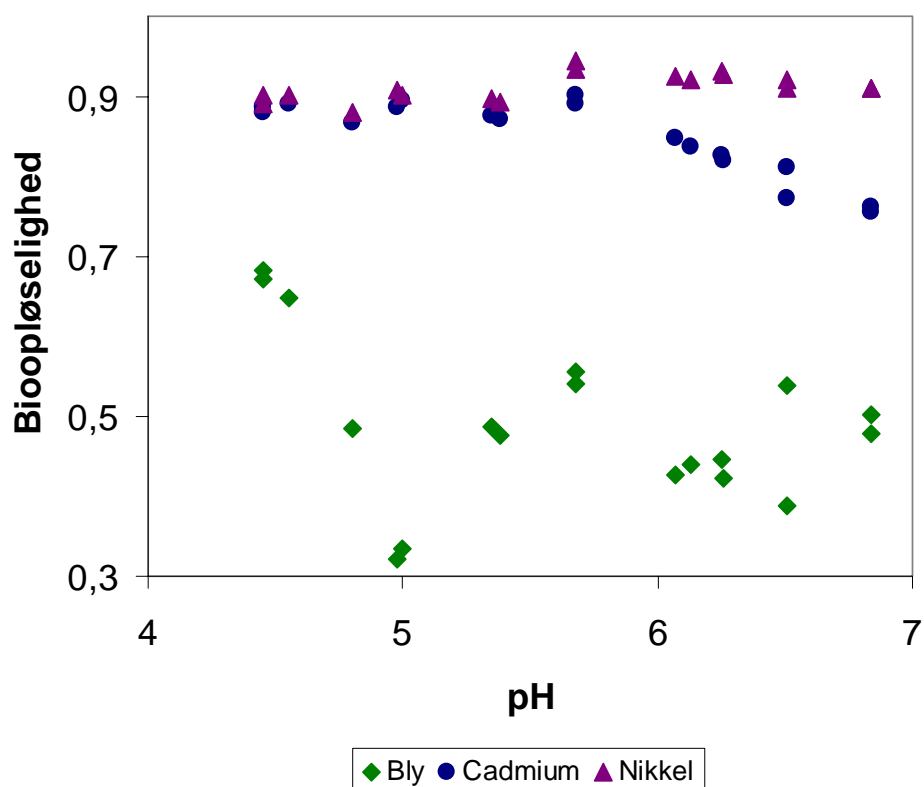
I ren vandig opløsning starter udfældningen, når pH overskrider cirka 6 ved høj koncentration af bly /69/, men pH for udfældning afhænger både af blykoncentrationen og af tilstedeværelsen af kompleksbindende stoffer i opløsningen. Det skal bemærkes, at der på nuværende tidspunkt ikke er enighed om ligevægtskonstanten (opløselighedsproduktet) for udfældning af bly fra vandig opløsning indenfor godt 4 størrelsesordener (højeste $4.2 \cdot 10^{-15}$, laveste $1.4 \cdot 10^{-20}$) /69/.

Det lader sig ikke gøre simpelt at forudsige den kritiske pH og bly koncentration for udfældning af bly i en kompliceret opløsning svarende til det, der benyttes ved test for bioopløselighed. Af den årsag er bioopløselighedstesten baseret på udførelse af referencetest, som benyttes til udregning af den relative bioopløselighed korrigeret for f.eks. udfældning af bly.

Ved første gennemførelse af RIVM fastende test for de hjemhentede jordprøver i undersøgelsens fase 2, se afsnit 7.3, sås det for en stor del af jordene, specielt for jorde forurenet med mineaffald, at kravene til slut pH ikke var opfyldt. Derfor blev der udført en delundersøgelse af sammenhængen imellem slut pH i test under fastende forhold og opløseligheden af bly. Delundersøgelsen er gennemført ved at foretage test med tilsætning af en kendt mængde af et letopløseligt bly salt, hvorefter pH i det sidste tarm segment blev justeret ved tilsætning af forud fastlagte mængder af stærk base (NaOH). For fuldstændighedens skyld gennemførtes dette også for cadmium og nikkel.

Resultaterne af denne delundersøgelse viste, se Figur 5.3, en nogenlunde konstant genfinding af nikkel over det undersøgte pH interval, en konstant genfinding af cadmium indtil pH = 5.5 og derefter et fald, samt en faldende genfinding af bly indtil cirka pH = 5 og derefter en konstant genfinding.

Figur 5.3 Sammenhæng imellem bioopløselighed af tilsatte metaller og pH i delundersøgelse af pH effekt



For at få en bedre beskrivelse af sammenhængen imellem pH og genfinding af metallerne blev de reference tests inddraget, der er blevet gennemført under hele afprøvningsforløbet. Resultatet er vist for bly i

Figur 5.4.

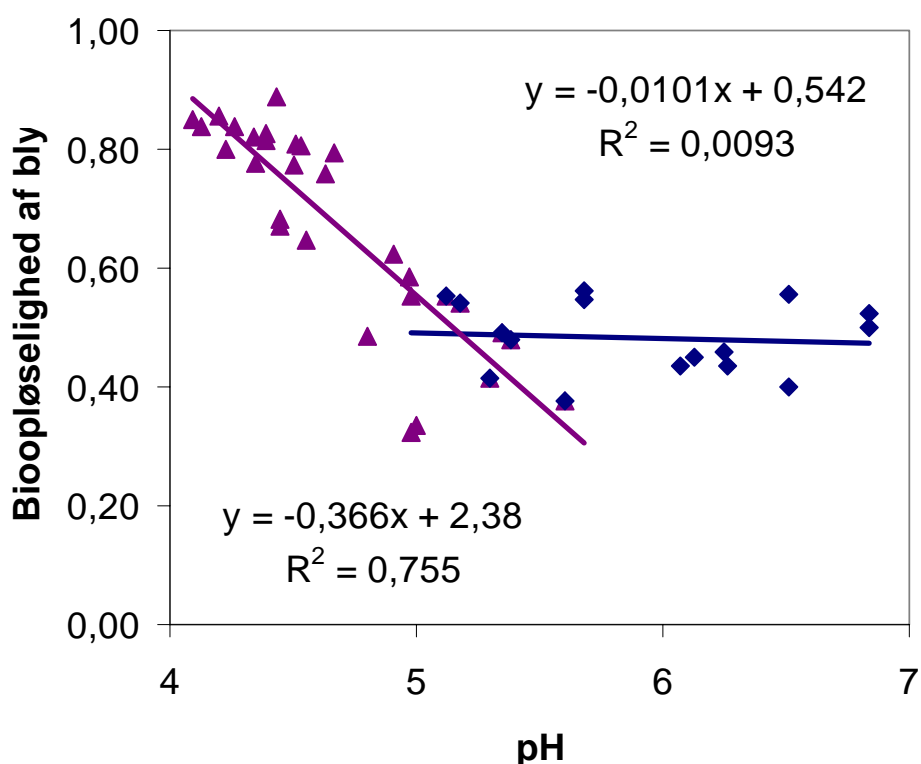
Figur 5.4 viser faldende bioopløselighed af bly i pH intervallet 4.0-5.2 og konstant bioopløselighed i pH intervallet 5.2-7.0.

Med udgangspunkt i de samlede data er opstillet funktioner til beregning af referencebioopløselighed ud fra slut pH i den enkelte test, Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Funktioner til beregning af referencebioopløselighed ud fra slut pH i testen

	pH interval I	pH interval II
Bly	$4.0 \leq \text{pH} < 5.2$ $2.38 - 0.366 * \text{pH}$	≥ 5.2 0.483
Cadmium	$4.0 \leq \text{pH} < 5.5$ 0.889	≥ 5.5 $1.46 - 0.101 * \text{pH}$
Nikkel	$4.0 \leq \text{pH} < 5.5$ 0.899	≥ 5.2 0.949

Figur 5.4 Sammenhæng mellem bioopløselighed af bly og pH i delundersøgelse af pH effekt og tidligere gennemførte referencetest



På grund af den store følsomhed af bioopløseligheden af særligt bly for slut pH i RIVM fastende testens tarm segment kan beregning af relativ bioopløselighed ud fra slut pH i den enkelte jordprøves testopløsning efter tarm segment med fordel benyttes og ikke beregning ud fra en eksperimentel toksikologisk reference, der i mange tilfælde har udvist en anden pH. Denne fremgangsmåde er benyttet i undersøgelsen af sammenhæng mellem RIVM

fastende *in vitro* test data og *in vivo* biotilgængelighedsdata, se afsnit 7.3, fase 2.

5.4 Variationer i testbetingelser for PAH

Til yderligere belysning af testbetingelsernes indflydelse på bioopløselighed af PAH er med RIVM testmetoden efter måltid gennemført undersøgelser af effekten af forøget testtid i tarm segmentet (standard 2 timer og 4 timer), undersøgelse af effekten af trinvis øgning af pH i tarm segmentet og af effekten af lavere pH i tarm segmentet. Der er i testen benyttet en dansk jord forurenet med PAH fra en porcelænsfabrik, og testene er udført i tripliket undtagen 4 timer lav pH i tarm segment, der er udført i duplikat. Resultaterne er vist i Tabel 5.10.

For begge PAH gav øget testtid i tarm segmentet væsentligt øget relativ bioopløselighed fra jordprøven. Forskellene imellem de forskellige pH forhold ved 4 timers test tid er ikke statistisk signifikante (95% konfidensniveau), men antyder en lavere relativ bioopløselighed ved den trinvis øgning af pH. Ved testen over 4 timer og lav pH i tarm segment var slut pH omkring 6, for de øvrige omkring 7.

Der er tidligere beskrevet /70/, at øget testtid i tarm segmentet havde begrænset effekt på den relative bioopløselighed af BaP i denne test (RIVM efter måltid), at øget testtid og øget koncentration af galde i tarm segmentet i nogen grad øgede bioopløseligheden, og endelig at øget pH i tarm segmentet i væsentlig grad øgede bioopløseligheden. Disse data blev opnået i tests tilsat PAH og uden "rigtig" jord.

Tabel 5.10 Relativ bioopløselighed af BaP og DBahA som funktion af testtid og pH justering i tarm segmentet for RIVM efter mål tid

	BaP	DBahA
Standard 2 timer standard pH tarm segment	0.173 ±0.0004	0.220±0.015
4 timer standard pH tarm segment	0.299±0.015	0.350±0.004
2 timer lav pH, 2 timer standard pH tarm segment	0.280±0.021	0.299±0.016
4 timer lav pH tarm segment	0.306±0.028	0.421±0.033

I udviklingen af testmetoden valgtes derfor at øge pH, idet dette blev anset for at give den højeste (mest konservative) bioopløselighed af PAH og andre organiske forureninger /70/. I denne undersøgelse er som standard benyttet den høje pH i tarm segmentet. Det må imidlertid konkluderes, at øget testtid yderligere kunne øge bioopløseligheden af PAH fra den undersøgte, "rigtige" jordprøve, mens pH i tarm segmentet i denne undersøgelse havde begrænset effekt.

6 Test af jord fra forurenede, danske lokaliteter

I forbindelse med afprøvningen af testene er medtaget 2 jordprøver, hvor der ikke er indsamlet yderligere oplysninger om prøvetagningssted, forureningskilde og -alder. Resultaterne herfra er opsummerede i Tabel 6.1. Det skal bemærkes, at metoderne benyttet til test af disse jordprøver har været under udvikling, hvorfor resultaterne alene kan betragtes som orienterende.

Tabel 6.1 Resultater af test for bioopløselighed i forbindelse med testafprøvningen (gennemsnit \pm standardafvigelsen)

Jord	Cd	Pb	Ni	BaP	DBahA
Trafikbelastet byjord					
Total indhold (mg/kg TS)	0.34	33	11	0.12	0.018
Relativ bioopløselighed	0.70 \pm 0.045	0.14 \pm 0.034	0.16 \pm 0.020	0.12 \pm 0.021	< DL ⁸
Tjæreforurennet jord					
Total indhold (mg/kg TS)	0.26	40	14	52	10
Relativ bioopløselighed	0.85 \pm 0.12	0.061 \pm 0.004	0.12 \pm 0.007	1.24 \pm 0.37	1.52 \pm 0.21

6.1 Afprøvningslokaliteter

Efter afsluttet indarbejdning og afprøvning af testene er gennemført prøvetagning til test for bioopløselighed af jordforureninger på 7 lokaliteter i Danmark.

Tabel 6.2 Beskrivelse af forurenede grunde i afprøvningen af test for human bioopløselighed af forureninger fra jord

Kildetype	Lokalitet	Testet for	
		Metaller	PAH
Generel bybelastning	Gammelt byområde i det centrale København	√	√
Trafikbelastet byjord	Ved motorvej i omegnen af København	√	√
Byjord belastet fra nærliggende industri med metaloparbejdning	Villakvarter i København	√	-
Tjæreforurennet jord	Nettjæreplads i Nordjylland	-	√
Byjord forurennet med slagge fra metaloparbejdning	Industrigrund i København	√	-
Byjord forurennet med støbesand fra metalstøberi	Nyere industriområde i København	√	-
Byjord forurennet med aske og affald fra porcelænsfabrik	Villakvarter i København	√	√

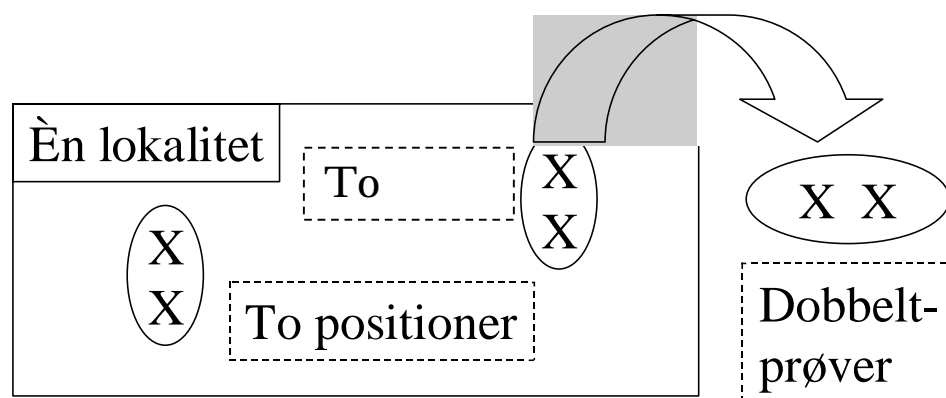
⁸ De bioopløselige koncentrationer var mindre end testens detektionsgrænse: 0.005 mg/kg TS

Hver lokalitet repræsenterer forskellige kilder til jordforurening, Tabel 6.2. Det skal bemærkes, at resultaterne for disse jordprøver er opnået med en testmetode, der for bly har vist sig i en række tilfælde at give for lav bioopløselighed, se kapitel 7 og 8.

6.2 Prøvetagning og forbehandling

Prøvetagningen er gennemført ved udtagning af prøver med håndbor i den ud fra tidligere gennemførte undersøgelser mest forurenede dybde. Der er på hver lokalitet udtaget i alt 4 jordprøver fordelt med 2 prøver på 2 positioner, og for én prøve fra én position på hver lokalitet er i laboratoriet udtaget dobbeltprøver til test, se Figur 6.1. Der testes på denne måde 5 jordprøver fra hver lokalitet.

Figur 6.1 Princip for udtagning af prøver på forurenede lokaliteter



I laboratoriet er med hver serie testet mindst 2 blindprøver og 2 doseringsreferencer. For to lokaliteter er udover selve jorden testet formodede forureningspartikler (slagge- og tjæreparkler).

Prøvetagningsdybder og afstand imellem positioner og prøver, samt karakterisering af jorden er samlet i henholdsvis Tabel 6.3 og Tabel 6.4, se Figur 6.1 for forklaring af "positioner" og "prøver".

Tabel 6.3 Beskrivelse af prøvetagning på forurenede grunde

Kildetype	Prøvetagningsdybde (m.u.t.) ⁹	Afstand i m imellem	
		positioner	prøver
Generel bybelastning	0.1-0.4	20	1.1-1.5
Trafikbelastet byjord	0.1-0.3	20	2.0-2.3
Byjord diffust belastet fra metalopbejdning	0.05-0.25	35	5.9-12
Tjæreforurenet jord fra nettjæring	0-0.05	13	2.0-5.0
Byjord slaggeforurenet fra metalopbejdning	0.1-0.3	200	2.1-8.8
Byjord forurenet fra metalstøberi	0.1-0.3	10	0.7-3.5
Byjord forurenet fra porcelænsfabrik	0.1-0.3	50	7.5-9.2

⁹ m under terræn

Området med generel bybelastning er et område med en godt 100 år gammel rækkehusbebyggelse. De to positioner er placeret i græsplænerne i to haver på hver sin side af den samme vej. Lokaliteten er tidligere fundet forurennet med bly og PAH over jordkvalitetskriterierne.

Trafikbelastet byjord, Figur 6.2, er prøvetaget langs én af de 4 vigtigste udfaldsveje fra København med en maksimal afstand til motorvejen på 20 m. Lokaliteten er tidligere fundet forurennet med bly og PAH over jordkvalitetskriterierne, men med stor variation i koncentrationer indenfor kort afstand.

Figur 6.2 Lokalitet med trafikbelastet byjord



Byjord diffust belastet fra metaloparbejdende virksomhed, se nedenfor, er udtaget fra græsplænerne i to haver i et villakvarter fra sidste halvdel af sidste århundrede. Det antages, at jorden på grund af lille afstand til den metalforarbejdende virksomhed er diffust forurennet fra virksomhedens afkast til luften, men det kan ikke afvises, at der i området også har fundet opfyld med slagge sted. Lokaliteten er tidligere fundet forurennet med cadmium og bly over jordkvalitetskriterierne. Der blev under prøvetagning fundet partikler, der kunne være slagge.

Tjæreforurennet jord fra en nettjæreplads, Figur 6.3, er udtaget fra et lyngklædt område, hvor der er foretaget tjæring af fiskenet. I området er tidligere fundet PAH over jordkvalitetskriterierne. På den ene position var jorden primært dækket af lav, mens den anden position var lyngdækket. Der blev under prøvetagning fundet partikler, der kunne være indtørret tjære.

Figur 6.3 Lokalitet med tjæreforurennet jord



Byjord forurennet med slagger fra metalforarbejdning er udtaget fra en industrigrund fra sidste århundrede, hvor der på grunden igennem en lang årrække er foregået smeltning og oparbejdning af metalaffald. Lokalt er tidligere fundet stærkt forurennet, blandt andet med bly og cadmium. Prøver til denne undersøgelse er udtaget i et delområde, der dels er oprindeligt terræn, dels kan være omplaceret jord udlagt i forbindelse med etablering af niveauforskel til en vej og af en ny indkørsel. Der er under prøveudtagning fundet fyld og metalslagger i jorden.

Byjord forurennet fra metalstøberi er prøvetaget i et nyere industriområde, hvor der på grunden i mindst 50 år er drevet metalstøberi. På lokaliteten er tidligere fundet forurening med cadmium, nikkel og bly over jordkvalitetskriterierne. Der er i forbindelse med prøvetagningen fundet lag af gråt sand, der kunne være støbesand, samt trækulslignende partikler i jorden.

Byjord forurennet med aske og affald fra en porcelænsfabrik er udtaget fra græsplænerne i to haver i et ældre villakvarter, hvor der antages tidligere at have fundet opfyldt med affald fra en porcelænsfabrik sted. Der er tidligere fundet bly, cadmium og PAH over jordkvalitetskriterierne. I forbindelse med prøvetagningen blev fundet lag med lyst sandet materiale, der kunne være aske.

I forbindelse med prøvetagning er udtaget blandede prøver for alle positioner fra hver lokalitet til analyse for de forureninger, for hvilke der påtænkes foretaget test for bioopløselighed. Inden igangsætning af test er således sikret, at de pågældende prøver var forurenede som forventet.

Jordprøverne er derefter forbehandlet som beskrevet i afsnit 4.4, og der er udtaget delp prøver til test og analyser. Fra hver lokalitet er 3 jordprøver (1 for den ene position, 2 for den anden position) analyseret for tekstur og humusindhold /71/, og jordtypen er klassificeret /72/, se Tabel 6.4.

Tabel 6.4 Karakterisering og klassificering af jord fra forurenede grunde (gennemsnit ± standardafvigelsen)

Kildetype	Grov-sand (%)	Fin-sand (%)	Silt (%)	Ler (%)	Humus (%)
Generel bybelastning	57±1.2	24±1.5	7.3±0.6	7.3±0.6	4.8±0.3
	Lerblandet sandjord				
Trafikbelastet byjord	37±2.6	36±3.2	13±1.2	13±5.2	1.8±0.4
	Sandet lerjord				
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	35±4.9	30±5.5	15±1.0	15±2.9	6.0±2.2
	Lerjord				
Tjæreforurenet jord fra netjtæring	74±6.5	14±1.0	2.0±0	2.0±0	4.1±2.3
	Sandjord				
Byjord slaggeforurenet fra metaloparbejdning	35±5.3	33±2.1	14±2.0	16±1.0	1.6±0.2
	Lerjord				
Byjord forurenet fra metalstøberi	35±3.1	29±8.1	14±2.3	11±1.7	11±0.8
	Sandet lerjord				
Byjord forurenet fra porcelænsfabrik	32±2.6	26±14	25±14	13±2.1	5.0±1.9
	Sandet lerjord				

Der er betydelig variation i tekstur og humusindhold indenfor hver lokalitet. Imellem lokaliteterne noteres særligt et højt humusindhold i prøverne af byjord forurenet fra metalstøberi, samt et højt indhold af grovsand i den tjæreforurenede jord og i nogen grad i jorden med generel bybelastning.

6.3 Total indhold af jordforureninger

Fra hver lokalitet er 4 jordprøver analyseret for indhold af forureningskomponenterne (én delprøve af hver prøve), Tabel 6.5.

Tabel 6.5 Total koncentrationer af jordforureninger i jord fra forurenede grunde (gennemsnit ± standardafvigelsen)

Kildetype	Cd (mg/kg TS)	Pb (mg/kg TS)	Ni (mg/kg TS)	BaP (mg/kg TS)	DBahA (mg/kg TS)
Jordkvalitetskriterium	0.5	40	30	0.1	0.1
Afskæringskriterium	5	400	30	1	1
Generel bybelastning	1.3±0.64	680±110	10±1.3	3.9±1.7	0.80±0.47
Trafikbelastet byjord	0.47±0.28	73±72	10±6.1	0.22±0.31	0.08±0.06 ¹⁰
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	2.2±0.60	330±110	15±2.5	-	-
"Slagge" fra lokaliteten	0.41	430	9.7	-	-
Tjæreforurenet jord fra netjtæring	-	-	-	5.4±9.1	0.99±1.7
"Tjære" fra lokaliteten	-	-	-	2.400	370

¹⁰ Kun resultater for én position, idet indholdet for begge prøver fra den anden position var under analysedetektionsgrænsen

Kildetype	Cd (mg/kg TS)	Pb (mg/kg TS)	Ni (mg/kg TS)	BaP (mg/kg TS)	DBahA (mg/kg TS)
Byjord slaggeforurenet fra metaloparbejdning	28±16	3.900±1.800	48±21	-	-
Byjord forurenet fra metalstøberi	2.2±1.2	710±410	69±36	-	-
Byjord forurenet fra porcelænsfabrik	0.71±0.54	160±170	11±3.7	1.8±1.1	0.33±0.22

Der er som tidligere nævnt endvidere analyseret en prøve af tjærelignende partikler fra lokaliteten med tjæreforurening fra nettjæring og af slaggelignende partikler fra jordprøverne fra lokaliteten med byjord diffust belastet fra metaloparbejdning. Partikler er i begge tilfælde knust og sigtede inden analyse og test.

6.4 Bioopløselighed af jordforureninger

I Tabel 6.6 er vist den relative bioopløselighed af jordforureningerne ved test svarende til fastende forhold (metaller) og efter måltid (PAH). Relativ bioopløselighed er for denne gruppe af jorde udregnet fra målt bioopløselighed af toksikologiske referenceprøver.

Det skal bemærkes, at der i forbindelse med testen for bioopløselighed af PAH i jordprøverne optrådte en prøveforurening under testen ("carry over"), formentlig forårsaget af de meget store koncentrationsforskelle prøverne imellem. Der er derfor i denne serie fortaget blindkorrektion ud fra den foregående series blindværdier.

Tabel 6.6 Relative bioopløseligheder af jordforureninger i jord fra forurenede grunde (gennemsnit ± standardafvigelsen)

Kildetype	Cd	Pb	Ni	BaP	DBahA
Generel bybelastning	0.54±0.099	0.78±0.20	0.29±0.048	0.15±0.031	0.14±0.033
Trafikbelastet byjord	0.68±0.045 ³⁰	0.29±0.17	0.19±0.024 ¹¹	0.38±0.27	0.40±0.24 ¹²
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	0.57±0.036	1.07±0.18	0.16±0.022	-	-
"Slagge" fra lokaliteten	0.57±0.035	0.68±0.10	0.11±0.019	-	-
Tjæreforurenet jord fra nettjæring	-	-	-	0.057±0.0003	0.12±0.091
"Tjære" fra lokaliteten	-	-	-	0.14±0.013	0.050±0.002
Byjord slaggeforurenet fra metaloparbejdning	0.52±0.071	0.43±0.48	0.22±0.19	-	-
Byjord forurenet fra metalstøberi	0.35±0.13	0.53±0.28	0.32±0.14	-	-
Byjord forurenet fra porcelænsfabrik	0.43±0.057	0.27±0.10	0.22±0.025	0.16±0.021	0.20±0.060

¹¹ Kun resultater for én position, idet indholdet i testopløsninger for begge prøver fra den anden position var under analysedetektionsgrænsen

¹² Kun resultater for én position, idet indholdet i jord og testopløsninger for begge prøver fra den anden position var under analysedetektionsgrænserne

For 2 positioner på lokaliteten forurennet fra metalstøberi, samt for en position på lokaliteten med slaggeforurening fra metaloparbejdning har pH efter mave segment i testen været over 2 og efter tarm segment over 7. Den målte relative bioopløselighed af bly er her fundet konsistent lavere end for andre prøver fra samme lokalitet, og antydningssvis for cadmium og nikkel. For prøve fra den slaggeforurenede lokalitet er efterfølgende ved simpel syretilsætning kontrolleret, at denne jord har en større neutraliseringsevne end andre prøver testet i samme serie. Der skal derfor i udførelsen af testen foretages kontrol af pH efter hvert segment, og hvis pH ligger udenfor det i testforskriften angivne interval, se afsnit 5.3, bør testen ikke anvendes direkte. De fejlbehæftede data er ikke taget ud af databehandlingen i denne rapport, da de bidrager til den samlede vurdering af metoderne som afprøvet. Plot af relativ bioopløselighed af metaller imod pH af mave eller tarm segment (4 lokaliteter, ikke vist) tyder dog ikke på, at der er en generel sammenhæng imellem test pH værdier og opnået relativ bioopløselighed, se dog også afsnit 5.3.

Bioopløseligheden af bly i jord formodentlig påvirket fra diffus forurening via luften fra en metaloparbejdende virksomhed blev fundet væsentligt højere (107%) end fra den jord, som er direkte påvirket med slagge og andet affald fra den samme virksomhed. Dette er i overensstemmelse med en intuitiv opfattelse af, at den luftbårne forurening må forventes at være i form af mindre partikler og dermed mere tilgængelig end slagge forureningen.

Resultaterne viser for næsten alle forureninger og alle lokaliteter relative bioopløseligheder under 100%. Særligt for nikkel og PAH var de relative bioopløseligheder væsentligt under 100%, mens variationen fra lokalitet til lokalitet var særligt stor for bly og PAH. Intervallet for gennemsnitsmålingerne på tværs af lokaliteter var bredest for bly, faktor 4, og PAH, faktor 7-8, mens intervallet var mindst for cadmium, faktor 2, og nikkel, faktor 3.

Variationen i totalkoncentration er i Tabel 6.7 sammenholdt med variationen i bioopløselig koncentration og i relativ bioopløselighed for hver lokalitet i form af variationskoefficienten (den relative standardafvigelse) på målingerne. Bemærk, at der for bioopløselig koncentration og relativ bioopløselighed kun er medtaget én af de 2 gennemførte dobbelt test på samme jordprøve for at sikre sammenlignelighed imellem de 2 datasæt.

Tabel 6.7 Variationskoefficienter for total koncentrationer, for bioopløselige koncentrationer og for relative bioopløseligheder af jordforureningerne

Kildetype Total koncentration /bioopløselig koncentration <i>/relativ bioopløselighed</i>	Cd (%)	Pb (%)	Ni (%)	BaP (%)	DBahA (%)
Generel bybelastning	50/63/13	16/33/30	12/22/16	43/48/23	60/42/27
Trafikbelastet byjord	60/100/9.2	98/76/67	60/100/18	140/93/72	68/91/64
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	28/19/6.8	33/37/11	17/21/15	-	-
Tjæreforurennet jord fra netjtjæring	-	-	-	170/200/42	170/180/68
Byjord slaggeforurennet fra metaloparbejdning	57/54/15	47/110/95	43/100/67	-	-
Byjord forurennet fra metalstøberi	53/71/37	57/55/56	52/36/35	-	-

Kildetype Total koncentration /bioopløselig koncentration <i>/relativ bioopløselighed</i>	Cd (%)	Pb (%)	Ni (%)	BaP (%)	DBahA (%)
Byjord forurennet fra porcelænsfabrik	76/80/16	100/89/42	33/40/13	61/60/15	68/79/23

Det fremgår af Tabel 6.7, at variationen i relativ bioopløselighed i næsten alle tilfælde var lavere eller meget lavere end variationen i forureningsindholdet. Dette er i overensstemmelse med en intuitiv forståelse af, at forureningskoncentration let varierer som følge af forskellig påvirkning fra kilden, mens forureningsens egenskab er mindre variabel ved at komme fra samme kilde og have samme "historie". Højere variabilitet for relativ bioopløselighed end for total koncentration kan ses for bly og nikkel fra generel bybelastning og fra den slaggeforurenede industrigrund. I begge tilfælde vurderedes jorden at indeholde forurening af forskellig art, f.eks. slagge, affaldsstumper m.v., altså reelt at være påvirket fra forskellige "kilder".

Oprindelsen til variationen i relativ bioopløselighed er søgt vurderet ud fra den relative standardafvigelse beregnet ud fra test af dobbeltprøver (laboratorieusikkerhed), prøver fra samme position (variation på positionen) og prøver fra to positioner fra samme lokalitet (variation på lokaliteten), Tabel 6.8.

Variationen er som ventet større på selve den forurenede grund, både på positionen og på lokaliteten, end ved delprøveudtagning og test i laboratoriet. Det skal bemærkes, at variabiliteten på lokaliteten i denne undersøgelse kan være overvurderet, idet der i design af prøvetagning er søgt en stor variabilitet imellem positionerne på hver lokalitet.

Tabel 6.8 Opdeling af variabilitet som gennemsnitlig relativ standardafvigelse for relative bioopløseligheder af jordforureningerne

Gennemsnitlig relativ standardafvigelse	Cd (%)	Pb (%)	Ni (%)	BaP (%)	DBahA (%)
Laboratorieusikkerhed	12	14	11	9.5	24
Variation på positionen	11	50	35	41	52
Variation på lokaliteten	32	66	32	21	48

Lineær regression af relativ bioopløselighed imod tekstur (ler og humus) viste ingen generel sammenhæng. Antydningssvis kunne ses på en stigende bioopløselighed af BaP med lerindholdet ($R^2=0.52$), samt en faldende bioopløselighed af cadmium med humusindholdet ($R^2=0.32$). Oplysninger om tekstur synes dermed ikke i sig selv at kunne indikere den relative bioopløselighed.

De målte total koncentrationer, C_j , og relative bioopløseligheder (RAF) er benyttet til at beregne jordens indhold af bioopløselig forurening, C_{bo} , efter formlen:

$$C_{bo} = C_j \times RAF$$

og de gennemsnitlige værdier af bioopløselig forurening er vist i Tabel 6.9 sammen med usikkerheden beregnet som 1 x standardafvigelsen. Til

sammenligning er i tabellen også vist gennemsnitlige resultater og usikkerhed for måling af totalindhold.

Beregning af bioopløselig koncentration af jordforureninger gav for alle parametre og lokaliteter værdier under total koncentrationen, undtagen for bly på lokaliteten med diffus belastning fra metaloparbejdende industri. Usikkerheden angivet som standardafvigelsen på den bioopløselige koncentration er følgelig for alle parametre og lokaliteter lavere end for total koncentrationerne, undtagen for bly på lokaliteterne med generel bymæssig belastning, diffus belastning fra metaloparbejdende industri og slaggeforurening fra metaloparbejdende industri.

Det skal bemærkes, at såvel total som bioopløselige koncentrationer for hver lokalitet må forventes at være højere end gennemsnitligt på lokaliteten, idet der ved udvælgelse af positioner til prøvetagning er søgt delområder med kendt eller forventet høje koncentrationer.

I Tabel 6.7 er vist variabiliteten som variationskoefficienten for bioopløselige koncentrationer sammen med variabiliteten af totale koncentrationer. Som forventet for en størrelse beregnet ud fra flere målte værdier er den relative usikkerhed på den bioopløselige koncentration som hovedregel lidt større end på den totale koncentration, men de to usikkerheder er af samme størrelsesorden.

Tabel 6.9 Bioopløselige og totale koncentrationer af jordforureninger i jord fra forurenede grunde (gennemsnit ± standardafvigelsen)

Kildetype	Cd (mg/kg TS)	Pb (mg/kg TS)	Ni (mg/kg TS)	BaP (mg/kg TS)	DBaH (mg/kg TS)
Jordkvalitetskriterium	0.5	40	30	0.1	0.1
Afskæringskriterium	5	400	30	1	1
Generel bybelastning					
Bioopløselig	0.67±0.42	500±170	3.0±0.66	0.53± 0.26	0.10± 0.04
Total	1.3±0.64	680±110	10±1.3	3.9±1.7	0.80± 0.47
Trafikbelastet byjord					
Bioopløselig	0.22±0.22	24±19	1.6±1.6	0.08± 0.07	0.02± 0.02
Total	0.47±0.28	73±72	10±6.1	0.22± 0.31	0.08± 0.06 ¹³
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning					
Bioopløselig	1.2±0.23	360±130	2.4±0.65	-	-
Total	2.2±0.60	330±110	15±2.5	-	-
Tjæreforurenet jord fra netjtjæring					
Bioopløselig	±	±	±	0.40± 0.81	0.07± 0.12
Total	-	-	-	5.4± 9.1	0.99± 1.7

¹³ Kun resultater for én position, idet indholdet for begge prøver fra den anden position var under analysedetektionsgrænsen

Kildetype	Cd (mg/kg TS)	Pb (mg/kg TS)	Ni (mg/kg TS)	BaP (mg/kg TS)	DBaH (mg/kg TS)
Byjord slaggeforurenet fra metaloparbejdning					
Bioopløselig	17±9.2	1.900± 2.200	12±12	-	-
Total	28±16	3.900± 1.800	48±21	-	-
Byjord forurenet fra metalstøberi					
Bioopløselig	0.84±0.60	460± 260	21±7.5	-	-
Total	2.2±1.2	710± 410	69±36	-	-
Byjord forurenet fra porcelænsfabrik					
Bioopløselig	0.25±0.20	59±52	2.4±0.98	0.33± 0.20	0.08± 0.06
Total	0.71±0.54	160±170	11±3.7	1.8±1.1	0.33± 0.22

7 Test af prøver med *in vivo* målt biotilgængelighed efter RIVM

For at belyse sammenhængen imellem bioopløselighed målt *in vitro* med testmetoderne er indhentet så mange jordprøver som muligt, hvor der i anden sammenhæng er foretaget *in vivo* undersøgelser af biotilgængelighed af de forureninger, der er udvalgt som mål i dette projekt. De indhentede jordprøver er efterfølgende testet *in vitro*, i første omgang med RIVM fastende og efter måltid metoderne for henholdsvis metaller og PAH.

Kriteriet for en test, der er velegnet til vurdering af jordforureningers bioopløselighed, er, at testen viser en *in vitro* bioopløselighed svarende til (dvs. lineært korreleret til) og i gennemsnit lig eller lidt højere end forureningernes *in vivo* biotilgængelighed fra samme jordprøver. I dette kapitel er benyttet begrebet sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, når dette dobbelte kriterium er vurderet, med mindre andet er anført.

7.1 Identifikation og hjemhentning af jordprøver

Kilder til jordprøver med data for *in vivo* biotilgængelighed af bly (Pb), cadmium (Cd), nikkel (Ni), benzo(a)pyren (BaP) eller dibenz(a,h)anthracen (DBahA) er identificeret dels ved kontakt til medlemmerne af BARGE gruppen, dels ved en litteratursøgning.

I den internationale BioAvailability Research Group Europe (BARGE) deltager de fleste af de forskergrupper, også udenfor Europa, som i dag udfører test for bioopløselighed. Fra denne gruppe er modtaget en række jordprøver, som i forbindelse med medlemmernes arbejde er blevet undersøgt for *in vivo* biotilgængelighed. I forbindelse med gruppens møder identificeredes desuden én undersøgelse, hvor jordprøver var blevet underkastet både *in vitro* test for bioopløselighed og *in vivo* undersøgelser af biotilgængelighed for nikkel. Kontakt til rekvirenten for dette arbejde resulterede i, at jordprøver ikke kunne stilles til rådighed for projektet.

Litteratursøgningen er udført af Danmarks Tekniske Videnscenter (DTV) med søgeprofil:

(bioavailability or uptake or oral or absorption)

and

soil

and

(polycyclic aromatic hydrocarbons or PAH or 50-32-8 or 53-70-3 or 7440-43-9 or 7439-92-1 or 7440-02-0)

and

(vivo or human or infant# or animal# or pig# or swine# or rat# or mice or mouse or sheep# or rabbit# or primate# or monkey# or hamster#)

i on line litteraturbaserne:

MEDLINE, BIOSIS og CAPPLUS

med afgrænsning:

>1995

not (vegetable# or crop# or plant# or translocation# or phyto# or dermal)

Søgningen var dermed rettet imod den nyere kemiske, biologiske og medicinske litteratur om de angivne forureningers (beskrevet ved navn eller ved Chemical Abstract nummer) orale optag i mennesker eller dyr fra jord, men med udelukkelse af planteoptag og optag igennem huden (dermalt).

Udfra søgningen hentedes i alt 356 titler på artikler og rapporter, hvoraf 82 blev bestilt hjem, enten som abstract eller som fuld tekst artikler. De hjemkomne artikler blev gennemgået for at identificere undersøgelser, hvor jordprøver var blevet udtaget og benyttet i *in vivo* forsøg til fastlæggelse af relativ biotilgængelighed.

Der blev identificeret i alt 15 forskergrupper med offentliggjorte data for *in vivo* biotilgængelighed af de udvalgte forureninger fra jord, samt 3 myndigheder med denne type aktiviteter. Alle blev kontaktet mindst 3 gange med henblik på muligheden for at få delprøver af den jord, der var blevet benyttet i de tidligere gennemførte undersøgelser af biotilgængelighed.

Der blev hjemhentes i alt 66 jordprøver, i nogle tilfælde samme jordprøve fra flere kilder, fordelt med *in vivo* biotilgængelighedsdata for de forskellige forureningsstoffer som følger (nogle prøver havde data fra mere end ét stof):

44 prøver til bly
17 prøver til PAH
13 prøver til cadmium
2 prøver til nikkel

Der er hos leverandørerne af jordprøver søgt oplysninger om benyttede metoder og dyr til bestemmelse af *in vivo* biotilgængelighed, evt. data for *in vitro* bioopløselighed og metode benyttet hertil, type og alder af forurening, samt total koncentrationer af forureninger i jordene. For metaller er de fleste data for biotilgængelighed bestemt med EPA/svin metoden, men det fremgår for en række prøver ikke, hvordan resultaterne er beregnet (valgt dosis eller plateau koncentrationer, enkeltmålepunkt eller samlet, vægtet relativ biotilgængelighed), se afsnit 2.2.

Jordprøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata er testet *in vitro* efter de først udvalgte metoder RIVM fasted state (metaller, fase 2, testserie 2a og 2b) og RIVM fed state (PAH, fase 2, testserie 2), samt efterfølgende efter RIVM fasted state uden tarm segment og efter SBRC (metallerne bly og cadmium, fase 3, testserie 3, kapitel 8).

7.2 Ensartethed af indhentede prøver

I fase 2 er så vidt muligt benyttet jordprøver opnået fra samme kilde (Stan Casteel, kilde 1 i Tabel 7.1 og Tabel 7.2), mens dette i fase 3 ikke var muligt,

fordi mængden af jordprøve i en del tilfælde var opbrugt i fase 2. I disse tilfælde blev benyttet de samme jorde, men opnået fra andre kilder.

For at kontrollere ensartethed af samme jord indhentet fra forskellige kilder blev en række jordprøver analyseret/genanalyseret for metallerne bly og cadmium i fase 3. Resultaterne i Tabel 7.1 viser at jordprøver fra de forskellige kilder udviser nogenlunde samme homogenitet (udtrykt som den relative standardafvigelse/ spredning for indhold af bly og cadmium), ligesom der ikke var nogen klar forskel på indholdet af bly og cadmium for forskellige kilder til samme jord, Tabel 7.2, sammenlign også med tidligere fundet homogenitet Tabel 4.8.

Tabel 7.1 Homogenitet og metal indhold i jordprøver fra forskellige kilder i fase 2 og 3

	Kilde 1	Kilde 2	Kilde 3	Kilde 4
Bly homogenitet (relativ standard afvigelse)	3.6% (5) ¹⁴	3.3% (3)	3.4% (4)	4.2% (2)
Cadmium homogenitet (relativ standard afvigelse)	2.9% ¹⁵ (4)	0% (3)	6.0% (4)	5.5% (2)

Tabel 7.2 Forskel i metal indhold i jordprøver fra forskellige kilder imellem fase 2 og 3

	Kilde 1	Kilde 2	Kilde 3	Kilde 4
Bly koncentration (gennemsnitlig forskel relativ til koncentration for kilde 1, fase 2)	-7.9% (3)	1.3% (1)	-12% (2)	-6.2% (5)
Cadmium koncentration (gennemsnitlig forskel relativ til koncentration for kilde 1, fase 2)	-8.7% ¹⁶ (2)	0% (1)	-8.1% (2)	-7.4% (5)

7.3 Test af hjemhentede prøver med RIVM *in vitro* metoder

Alle data i dette afsnit (undersøgelsens fase 2) er opgivet som relativ *in vitro* bioopløselighed eller *in vivo* biotilgængelighed, med mindre andet er anført. Den pH korrigerede referencebioopløselighed, se afsnit 5.3, er benyttet til udregning af den relative bioopløselighed.

Der er udført tests på to delprøver af 9-10 prøver for metaller og 4 prøver for PAH, og ud fra dobbeltbestemmelsernes relative forskel er den relative standardafvigelse beregnet (se /62/ for beskrivelse af metoden) omfattende både prøveinhomogenitet og analytisk/test præcision (repetitbarhed), Tabel 7.3.

Præcisionen udtrykt som relativ standardafvigelse har opfyldt det krav (<15% relativ standardafvigelse), som tidligere er formuleret til test for bioopløselighed /68/, med undtagelse af testens resultat for DBahA. Ved sammenligning af test præcisionen i Tabel 7.3 med præcisionen for analyse af jordprøver i Tabel 4.8 ses, at selve testen ikke har bidraget væsentligt til datavariabiliteten, undtagen for BaP. Ligeledes ses, at test præcisionen svarer til det, der blev opnået under afprøvningen af de 2 RIVM test metoder, Tabel 5.1 og Tabel 5.5.

¹⁴ (n): antal dobbeltprøver analyseret

¹⁵ Et afvigende resultat udelukket, med afvigende resultat var den relative standardafvigelse 17%

¹⁶ Et afvigende resultat udelukker, med afvigende resultat 103%

Tabel 7.3 Relativ standardafvigelse for dobbelttest af *in vitro* bioopløselighed i et udsnit af prøver

	Pb	Cd	Ni	BaP	DBahA
Antal dobbeltbestemmelser	10	10	9	4	4
Relativ standardafvigelse (%)	6.4	5.0	4.9	13	17

7.3.1 Bly

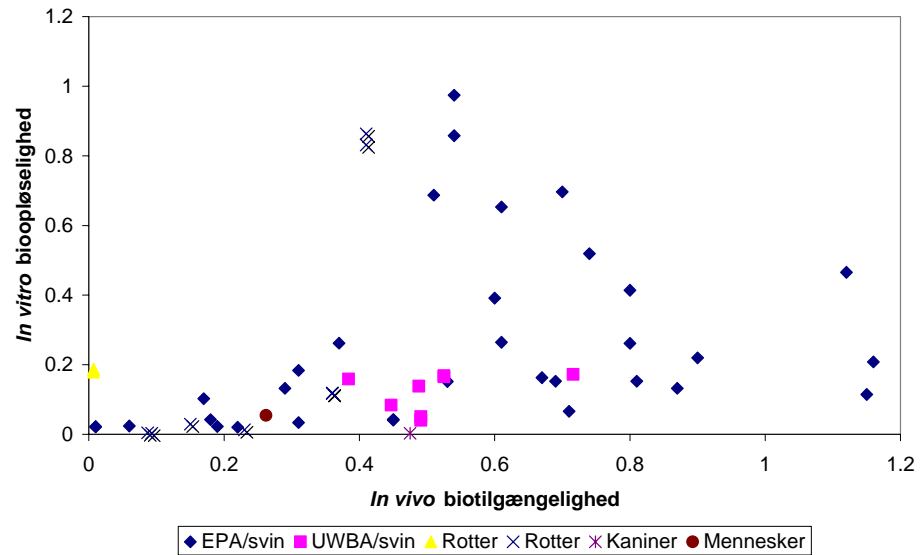
For bly er indhentet og testet i alt 44 jorde med data for *in vivo* biotilgængelighed bestemt ved 2 forskellige metoder i svin, rotter, kaniner og mennesker. Der er foretaget dobbelttest af 10 prøver.

I Figur 7.1 er vist opnået *in vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af bly for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder. Der ses ingen klar sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, heller ikke hvis hver enkelt *in vivo* metode betragtes særskilt. Det gælder endvidere, at *in vitro* bioopløselighed af bly blev fundet lavere eller væsentligt lavere end *in vivo* biotilgængeligheden for en meget stor andel af de testede jordprøver. Dermed er hverken delkriteriet om en lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* resultater eller kriteriet om i hovedsagen tilsvarende eller højere *in vitro* end *in vivo* data opfyldt.

Det skal bemærkes, at den konstaterede forskel i resultater af total analyse af jordprøverne, afsnit 4.2.3, ikke kan forklare den manglende sammenhæng. Der skal endvidere gøres opmærksom på, sammenhængene alene bør vurderes opdelt i sammenlignelige metoder, og hverken *in vitro* eller *in vivo* resultater kan betragtes som "sande", se afsnit 2.2. I

Figur 7.6 er sammenhængen vurderet alene for *in vivo* data opnået med EPA/svin metoden, for hvilken der er testet flest jordprøver, men dette giver ikke en mere tilfredsstillende sammenhæng *in vitro* til *in vivo*.

Figur 7.1 *In vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af bly for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder

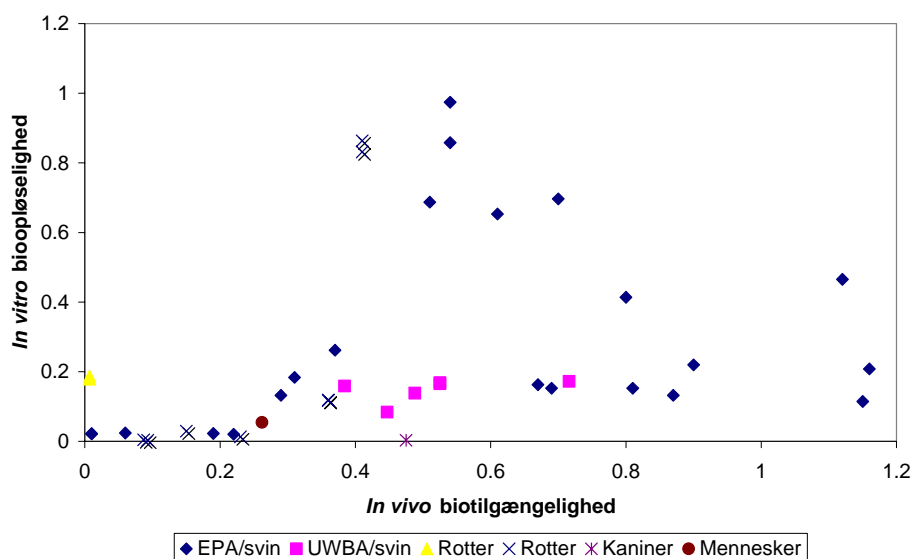


Testresultaterne (*in vitro*) er korrigerede for slut pH efter tarm segmentet, men en række prøver havde i mave segmentet højere pH end foreskrevet. Udelukkelse af alle testresultater med for høj pH (>1.8) i mave segmentet giver ikke en bedre sammenhæng,

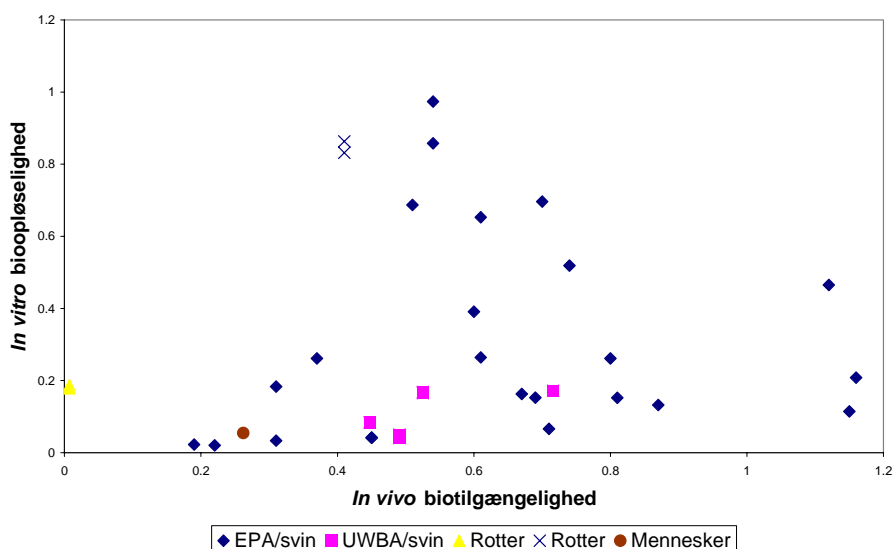
Figur 7.2.

RIVM metoden er udviklet til test af forurenings bioopløselighed fra jord. Udelukkelse af alle testresultater, som ikke er bestemt med forurenede jord (f.eks. i stedet med mineaffald eller syntetiske prøver), viser ikke en forbedret sammenhæng, Figur 7.3. Det skal dog bemærkes, at for en række jordprøver karakteriserede som jord er forureningskilden mineaffald. Overgangen imellem f.eks. mineaffald og jord er altså ikke altid veldefineret

Figur 7.2 *In vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af bly for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder, pH i *in vitro* testens mave segment <1.8



Figur 7.3 *In vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af bly for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder, kun prøver af jord medtaget

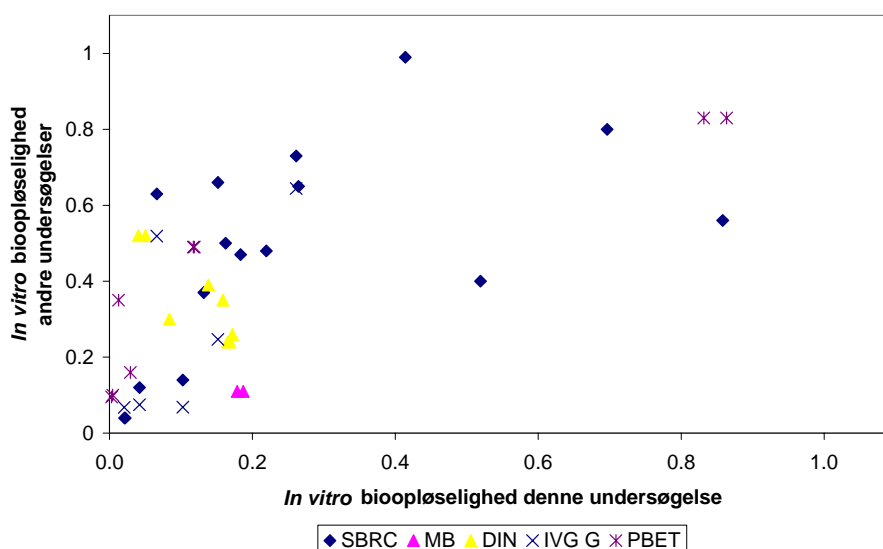


En gennemgang af data viste ingen klar sammenhæng imellem tidspunkt for prøvetagning (prøvens alder) og en dårlig korrelation imellem *in vitro* og *in vivo* data, idet der foreligger samhørende data for bioopløselighed, biotilgængelighed og prøvetagningstidspunkt for 29 prøver, alle undersøgt for *in vivo* biotilgængelighed efter EPA/svin metoden. Ændringer i bindingen af bly i jordprøverne imellem *in vitro* testningen og *in vivo* undersøgelserne kan således ikke forklare den dårlige sammenhæng.

Sammenholdes testresultater for *in vitro* bioopløselighed med RIVM metoden i denne undersøgelse med resultater bestemt ved andre metoder og i andre undersøgelser, Figur 7.4, ses for de fleste metoder en sammenhæng imellem RIVM resultater og øvrige resultater, undtagen for DIN metoden og undtagen nogle høje værdier. Med de fleste metoder er for de fleste jordprøver fundet

højere bioopløselighed i andre undersøgelser end med RIVM fastende metoden i denne undersøgelse. I denne sammenligning er indgået testresultater bestemt ved den version af metoden, som anbefales for de enkelte metoder: test med mave segment (SBRC, PBET, IVG G, MB) eller test med mave og tarm segment med fødetilsætning (DIN), se afsnit 2.1 for beskrivelse af metoderne.

Figur 7.4 *In vitro* bioopløselighed af bly i andre undersøgelser og med andre testmetoder som funktion af *in vitro* bioopløselighed bestemt ved RIVM metoden i denne undersøgelse for samme jordprøve

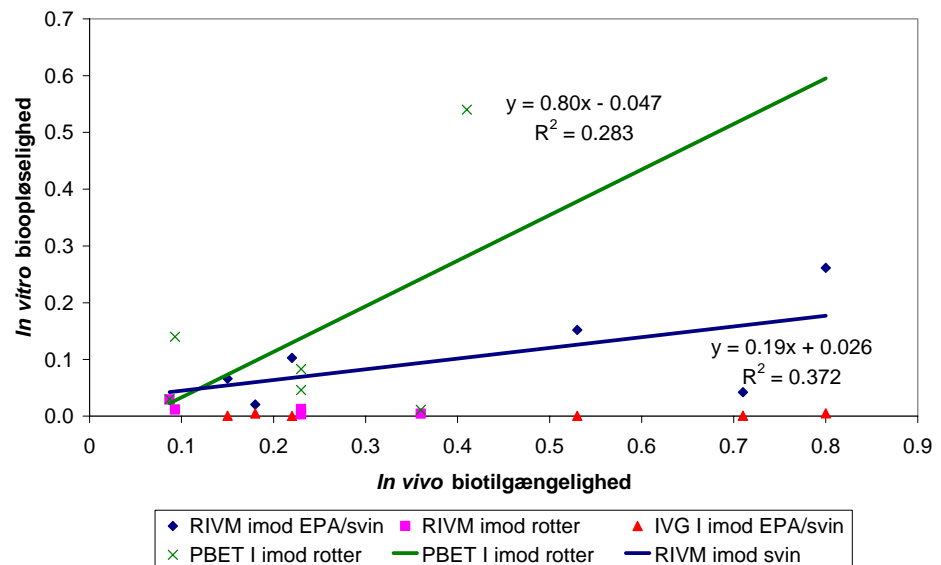


Der ses endvidere ikke en lineær sammenhæng imellem *in vitro* data bestemt ved RIVM metoden og data bestemt ved andre *in vitro* testmetoder med både mave og tarm segment (PBET I, IVG I, MB, DIN), figur ikke vist. For de jordprøver, hvor der foreligger *in vitro* data efter en metode med mave og tarm segment ses, Figur 7.5, at RIVM metoden i denne undersøgelse har givet den bedste sammenhæng med *in vivo* data bestemt ved EPA/svin metoden, men med højere *in vivo* data end *in vitro* data. For de øvrige *in vitro* metoder er der ikke en sammenhæng (den til syneladende sammenhæng for PBET I imod rotter skyldes én høj værdi), ligesom der for RIVM ikke er en sammenhæng imellem *in vitro* data og *in vivo* data bestemt ved rotter. *In vitro* data bestemt ved DIN metoderne er ikke medtaget, idet disse viser en omvendt lineær sammengæng med *in vivo* data bestemt ved UWBA/svin metoden. Bemærk, at i IVG I metoden indgår ikke bly, der kan opløses i mave segmentet.

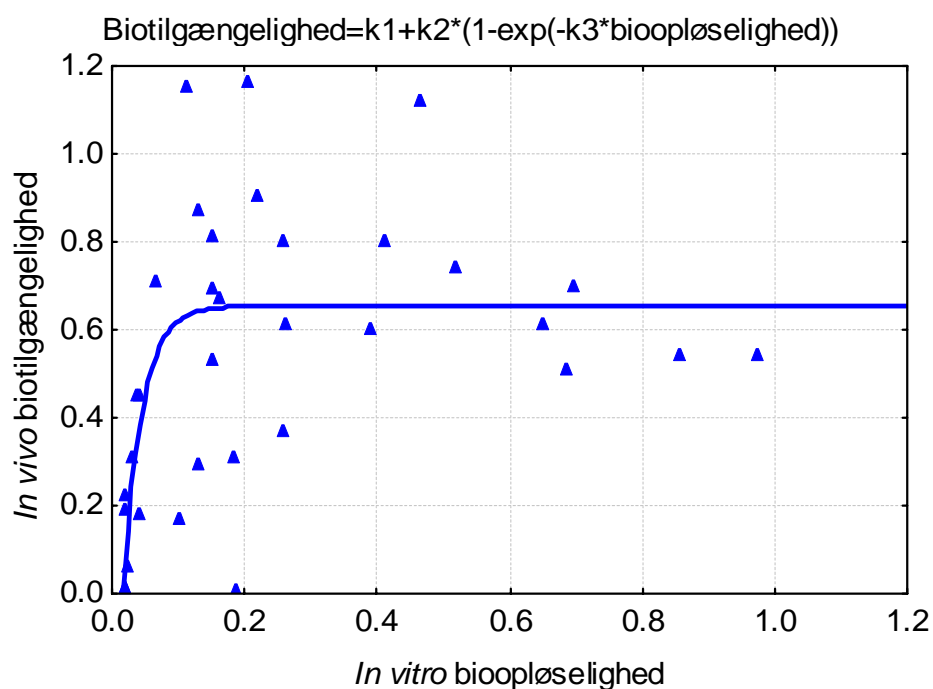
Analyseres sammenhængen imellem *in vivo* biotilgængelighed og *in vitro* bioopløselighed for de jordprøver (34),

Figur 7.6, hvor der foreligger *in vivo* data med EPA/svin metoden, fås ved regressionsanalyse efter mindste kvadraters metode en regressionskoefficient (R^2) på 0.402 baseret på den sammenhæng, der er foreslået til at beskrive blodbly som funktion af dosis i dyreforsøg, se afsnit 2.2. Med andre ord giver en model for sammenhæng imellem *in vivo* biotilgængelighed og *in vitro* bioopløselighed baseret på non-lineært optag i dyrene en bedre forklaringsgrad end en lineær model. Dette stiller væsentligt spørgsmålstejn ved anvendeligheden af *in vivo* biotilgængelighedsundersøgelser efter EPA/svin metoden.

Figur 7.5 *In vitro* bioopløselighed af bly som funktion af *in vivo* biotilgængelighed for jordprøver med *in vitro* data bestemt ved tarm segment



Figur 7.6 *In vivo* biotilgængelighed af bly efter EPA/svin metoden afbildet imod *in vitro* bioopløselighed efter RIVM metoden i denne undersøgelse med regressionskurve



Sammenfattende må det vurderes, at selvom optag af bly i dyr antages at finde sted i tyndtarmen /8/, har *in vitro* test for bioopløselighed af bly fra jord med RIVM fastende metoden omfattende både et mave og et tarm segment vist dårlig sammenhæng med *in vivo* data for biotilgængelighed. Den dårlige sammenhæng kunne ikke på dette tidspunkt umiddelbart forklares med forskelle i forureningstype, forskellig alder af jordprøver, forskellig pH i testens mave segment eller andre identificerbare faktorer, men forskellige *in vivo* dyr og/eller metoder påvirker sammenhængen, og en effekt af biotilgængelighedens non-lineære dosis-respons kurve i EPA/svin metoden kan have betydning.

For en enkelt jordprøve foreligger *in vitro* test med RIVM metoden med data for både mave segment og kombineret mave og tarm segment, samt *in vivo* data fra optag i mennesker, Tabel 7.4. Test med RIVM metoden gav højest bioopløselighed efter mave segmentet, men også efter tarm segmentet højere *in vitro* bioopløselighed end *in vivo* biotilgængelighed i mennesker, hvilket er i modsætning til resultaterne af denne undersøgelse.

Tabel 7.4 *In vitro* absolut bioopløselighed af bly efter RIVM metoden med og uden tarm segment /11/, samt *in vivo* absolut biotilgængelighed i mennesker /17/, gennemsnit±standard afvigelse

Jordprøve	<i>In vitro</i> RIVM mave	<i>In vitro</i> RIVM mave og tarm	<i>In vitro</i> RIVM mave og tarm, denne undersøgelse	<i>In vivo</i> mennesker
Bunker Hill	0.71±0.01	0.32±0.03	0.031	0.26±0.081

Tilsvarende er tidligere fundet højere *in vitro* bioopløselighed af bly efter mave segment end efter kombineret eller sekventielt mave og tarm segment, se afsnit 2.3. Endvidere har der kunnet vises en lineær sammenhæng imellem *in vitro*

bioopløselighed med mave segment tests og *in vivo* biotilgængelighed, når data bestemt ved én *in vitro* og én *in vivo* metode er sammenlignet, se afsnit 2.3.

Fra Tabel 7.4 skal endvidere bemærkes, at der i denne undersøgelse er opnået væsentligt lavere *in vitro* bioopløselighed for jord fra Bunker Hill end tidligere opnået hos RIVM, der har udviklet testen. Det har ikke været muligt at identificere forskelle i testudførelse hos RIVM og på DHI. Der er ikke tegn på så betydende inhomogenitet for denne prøve, at variationerne kan forklares hermed. I Tabel 7.5 er derfor vist bioopløselighedsdata for udvalgte jordprøver, der er testet flere gange på DHI i forbindelse med denne undersøgelses 2 første faser (testrunder).

Tabel 7.5 *In vitro* bioopløselighed af bly efter RIVM opnået i denne undersøgelses 2 første faser, gennemsnit±standard afvigelse

Prøve	Fase 1	Fase 2, serie 1	Fase 2, serie 2
Oker 11	0.40±0.02	0.19±0.01	0.17±0.003
Bunker Hill	It ¹⁷	0.063±0.004	0.055
Byjord slaggeforurenede fra metalopbehandling	0.054	it	0.13
Trafikbelastet byjord	0.11	it	0.18
Byjord forurenede fra metalstøberi	0.15	it	0.11
Byjord forurenede fra porcelænsfabrik	0.13	it	0.36

Mens variationen indenfor én testserie og imellem testserier i samme fase af undersøgelsen i Tabel 7.5 er begrænset, er variationen imellem faser, altså med længere tidsrum imellem testene, betydelig. Der er ikke imellem de 2 faser foretaget ændringer i udførelsen af testen på DHI, og der kan ikke identificeres parametre, som f.eks. slut pH efter tarm segment, der har varieret imellem de 2 faser. Det skal bemærkes, at prøve Oker 11 i fase 1 og i fase 2 er testet med delprøver modtaget fra forskellige kilder, samt at inhomogenitet i prøverne fra de danske grunde kan have påvirket resultaterne.

Sammenfattende vurderes, at RIVM metoden til bestemmelse af *in vitro* bioopløselighed af bly i den afprøvede udformning med både mave og tarm segment ikke giver en tilstrækkeligt robust sammenhæng til *in vivo* biotilgængelighedsdata. Tidligere offentliggjorte data tyder på, at en sådan robust sammenhæng kan opnås, hvis der benyttes test efter mave segment. Vælges en test med alene mave segment, vil resultaterne ikke direkte reflektere fysiologisk bestemte opløselighedsforhold i menneskers eller dyrs mave-tarm system.

7.3.2 Cadmium

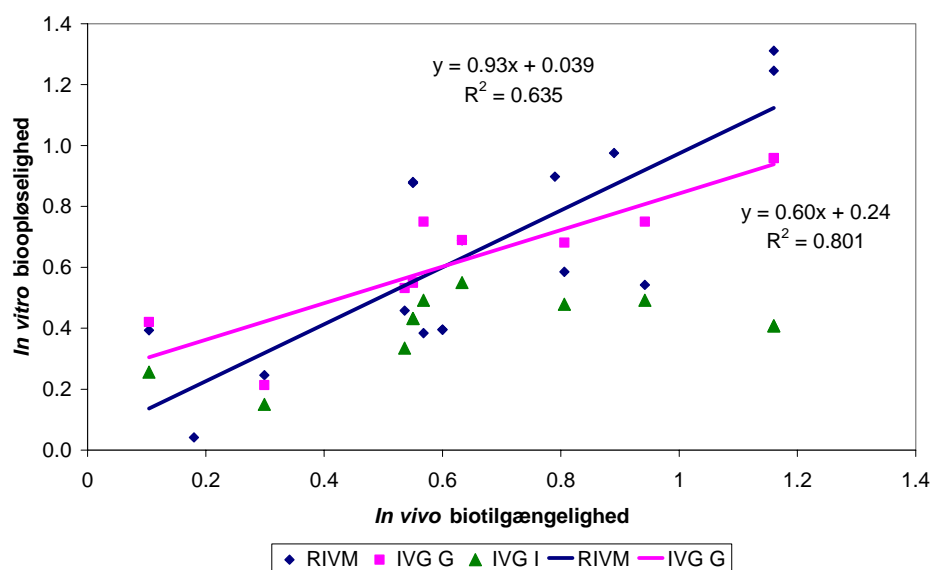
For cadmium er kun identificeret og indhentet 13 jordprøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata opnået efter EPA's undersøgelsesmetode i svin. Der er yderligere udført undersøgelser af optag med UWBA/svin /14/, men relative, sammenlignelige bioopløseligheder lader sig ikke beregne, idet der ikke har

¹⁷ it: ikke testet

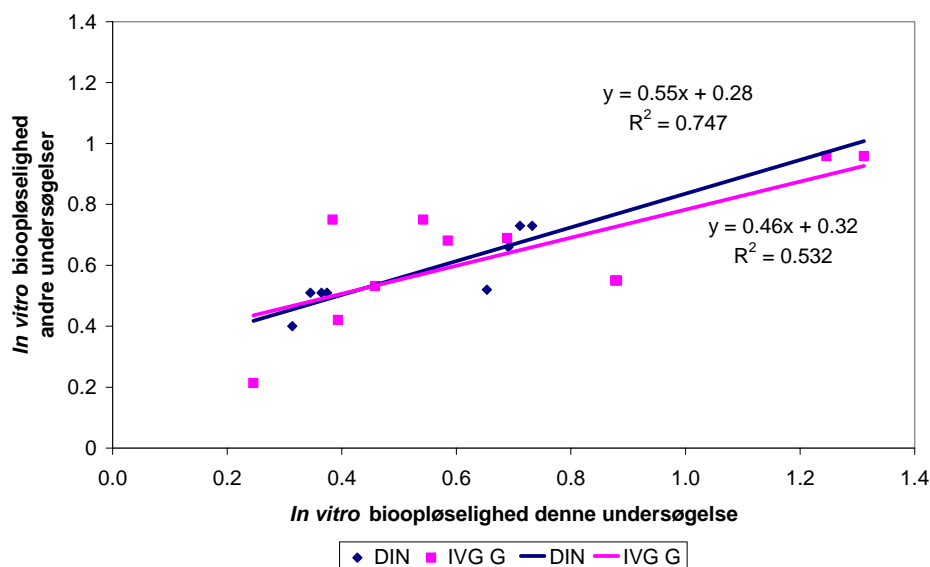
været inkluderet en cadmium reference. I Figur 7.7 er vist resultaterne for de 13 jorde, hvor *in vivo* data forelå.

Både RIVM metoden i denne undersøgelse og den for nyligt publicerede IVG G metode /6/ viser rimeligt lineær sammenhæng og som hovedregel højere *in vitro* bioopløselighed af cadmium end *in vivo* biotilgængelighed Figur 7.8. Den lineære sammenhæng er bedst for IVG G, men sikkerheden for højere *in vitro* end *in vivo* resultat er for højere bioopløseligheder større for RIVM metoden. IVG I metoden /6/ viser ikke lineær sammenhæng til *in vivo* data og giver lavere værdier end *in vivo* undersøgelserne.

Figur 7.7 *In vitro* bioopløselighed af cadmium (denne undersøgelse og /6/) som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af cadmium for alle jordprøver



Figur 7.8 *In vitro* bioopløselighed af cadmium i andre undersøgelser /6//14/ og med andre testmetoder som funktion af *in vitro* bioopløselighed bestemt ved RIVM metoden i denne undersøgelse



Der er lineær sammenhæng imellem *in vitro* data for cadmium bioopløselighed opnået i denne undersøgelse med RIVM metoden og med de to andre

metoder: IVG G /6/ og DIN /14/, se Figur 7.8. RIVM metoden gav højeste værdier for høje bioopløseligheder, mens IVG G og DIN metoderne gav højeste værdier ved lave bioopløseligheder.

I Tabel 7.6 er vist bioopløselighedsdata for udvalgte jordprøver, der er testet flere gange på DHI i forbindelse med denne undersøgelses første 2 faser (test runder) /68/.

Tabel 7.6 *In vitro* bioopløselighed af cadmium efter RIVM opnået i denne undersøgelses 2 første faser, gennemsnit±standard afvigelse

Prøve	Fase 1	Fase 2, serie 1	Fase 2, serie 2
Oker 11	0.54±0.006	0.75±0.007	0.72±0.01
Bunker Hill	it ¹⁸	0.71±0.01	0.72
Byjord slaggeforurennet fra metaloparbejdning	0.69	it	0.56
Byjord forurennet fra metalstøberi	0.26	it	0.38
Byjord forurennet fra porcelænsfabrik	0.45	it	0.52

Variationen indenfor én testserie og imellem testserier i samme fase i Tabel 7.6 er begrænset og ikke systematisk, og variationen imellem faser, altså med længere tidsrum imellem testene, er mindre end set for bly (Tabel 7.5). For prøve Oker 11 er igen større forskel på resultatet i fase 1 og i fase 2, hvilket underbygger, at der kan have været forskel på delprøver modtaget fra forskellige kilder.

Sammenfattende vurderes, at RIVM metoden til bestemmelse af *in vitro* bioopløselighed af cadmium i den afprøvede udformning med både mave og tarm segment giver en tilstrækkeligt robust sammenhæng til *in vivo* biotilgængelighedsdata. Tidligere offentliggjorte data tyder på, at en sådan robust sammenhæng også vil kunne opnås, hvis der benyttes test efter mave segment, men denne sammenhæng vil i givet fald ikke kunne sættes i sammenhæng med fysiologisk bestemte opløselighedsforhold i menneskers eller dyrs mave-tarm system.

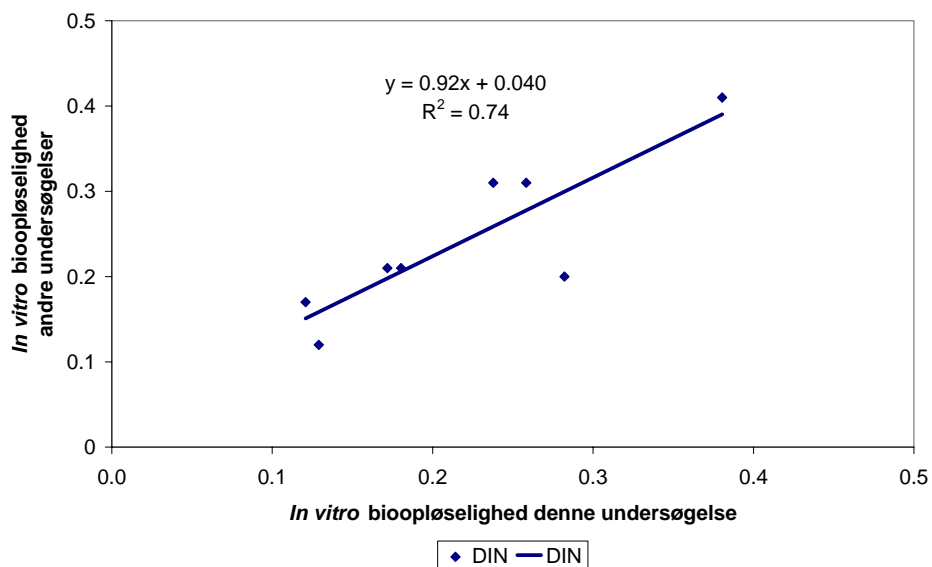
7.3.3 Nikkel

For nikkel er ikke identificeret og indhentet jordprøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata. Der er udført undersøgelser af optag med UWBA/svin /14/, men relative, sammenlignelige bioopløseligheder lader sig ikke beregne, idet der ikke har været inkluderet en nikkel reference. Der er gennemført *in vivo* biotilgængelighedsundersøgelser af en nikkelforurennet jord fra Canada, men kontakt til rekvirenten for dette arbejde resulterede som tidligere nævnt i, at jordprøver ikke kunne stilles til rådighed for projektet.

Der er lineær sammenhæng imellem *in vitro* data for nikkel bioopløselighed opnået i denne undersøgelse med RIVM metoden og med den anden metode: DIN /14/, se Figur 7.9. RIVM metoden gav generelt de højeste værdier.

¹⁸ it: ikke testet

Figur 7.9 *In vitro* bioopløselighed af nikkel i en anden undersøgelse og med en anden testmetode som funktion af *in vitro* bioopløselighed bestemt ved RIVM metoden i denne undersøgelse



Tabel 7.7 *In vitro* bioopløselighed af nikkel efter RIVM opnået i denne undersøgelses 2 faser, gennemsnit±standard afvigelse

Prøve	Fase 1	Fase 2, serie 1	Fase 2, serie 2
Oker 11	0.23±0.01	0.26±0.007	0.25±0.01
Byjord slaggeforurennet fra metaloparbejdning	0.24	it	0.22
Byjord forurennet fra metalstøberi	0.47	it	0.37
Byjord forurennet fra porcelænsfabrik	0.26	it	0.23

I Tabel 7.7 er vist bioopløselighedsdata for udvalgte jordprøver, der er testet flere gange på DHI i forbindelse med denne undersøgelses 2 faser (test runder). Variationen indenfor en testserie og imellem testserier i samme fase i Tabel 7.7 er begrænset og ikke systematisk, og variationen imellem faser, altså med længere tidsrum imellem testene, er mindre end set for bly (Tabel 7.5) og cadmium (Tabel 7.6). For prøve Oker 11 er her ikke større forskel på resultatet i fase 1 og i fase2, hvilket ikke underbygger, at der kan have været forskel på delprøver modtaget fra forskellige kilder.

Sammenfattende vurderes, at RIVM metoden til bestemmelse af *in vitro* bioopløselighed af nikkel i den afprøvede udformning med både mave og tarm segment er tilstrækkeligt robust, men sammenhæng til *in vivo* biotilgængelighedsdata kan ikke vurderes på grund af mangel på *in vivo* data.

7.3.4 PAH

For PAH er identificeret og indhentet 4 jordprøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata bestemt ved UWBA/svin /14/. Kun for BaP lader relativ bioopløselighed sig beregne, idet DBaH ikke har været inkluderet som reference. Derudover er indhentet 13 jordprøver, hvor der foreligger *in vivo* biotilgængelighedsdata baseret på udskillelse af en metabolit med urinen fra

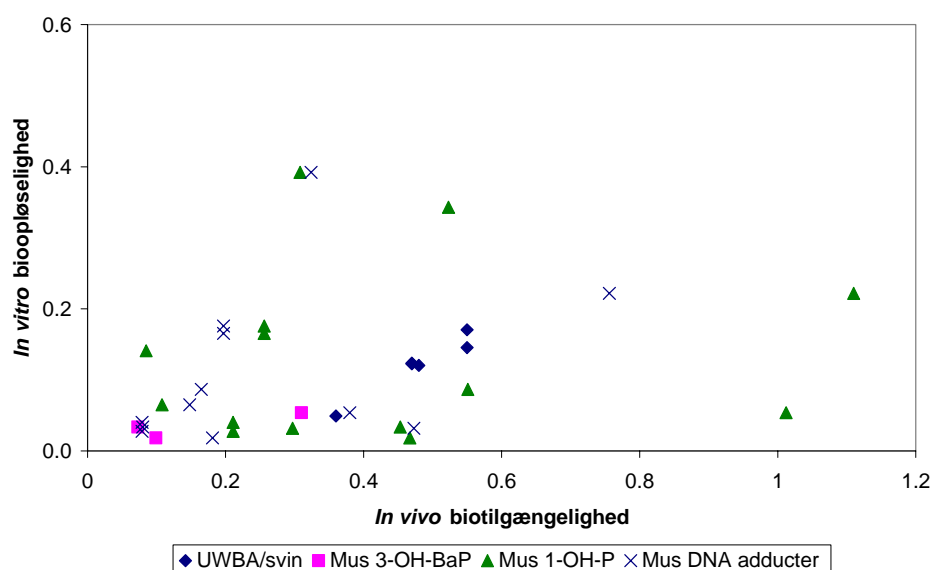
mus for BaP for de 3. Derudover foreligger for 10 af disse prøver *in vivo* biotilgængelighedsmål i form af DNA adduct dannelse i mus, samt *in vivo* biotilgængelighedsdata baseret på udskillelse af en metabolit med urinen fra mus for pyren (P, alle 13 prøver).

Der skal erindres om, at der for PAH ikke findes en anerkendt metode til *in vivo* undersøgelse af stoffernes biotilgængelighed for dyr fra jord.

I Figur 7.10 er vist BaP resultaterne for de 17 jorde, hvor *in vivo* data foreligger. For de 4 prøver med *in vivo* biotilgængelighedsdata opnået i UWBA/svin ses antydningssvis en lineær *in vitro* sammenhæng med *in vivo* data, men datamaterialet er for lille til at muliggøre en egentlig regressionsberegning.

In vitro resultaterne er lavere end *in vivo* resultaterne, men her skal erindres om, at den relative *in vivo* biotilgængelighed i UWBA/svin metoden beregnes ud fra den del af PAH, der udskilles intakt med fæces. Der er således tale om en overgrænse for PAH forbindelsernes *in vivo* biotilgængelighed, da f.eks. PAH metaboliseret i mave-tarm systemet og udskilt uden optagelse vil blive beregnet som en del af den biotilgængelige fraktion.

Figur 7.10 *In vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af BaP for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder



Der ses ingen sammenhæng imellem *in vitro* BaP bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra udskillelse af pyren metabolitten 1-hydroxypyren (1-OH-P). Det er tidligere vist, afsnit 2.6, at udskillelse af BaP i fæces og udskillelse af 1-OH-P i urin hos grise ikke viser samme relative biotilgængelighed.

For *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra udskillelse af benzo(a)pyren metabolitten 3-hydroxybenzo(a)pyren (3-OH-BaP) er der for få data til at vurdere en evt. sammenhæng.

Der ses ingen sammenhæng imellem *in vitro* BaP bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra dannelse af DNA adducter i mus.

For dibenz(a,h)anthracen (DBahA) findes som nævnt ikke data for relativ biotilgængelighed, men antages biotilgængeligheden af reference DBahA som for BaP at være tæt på 100% i denne metode, kan den relative *in vivo* biotilgængelighed anslås svarende til den absolutte biotilgængelighed.

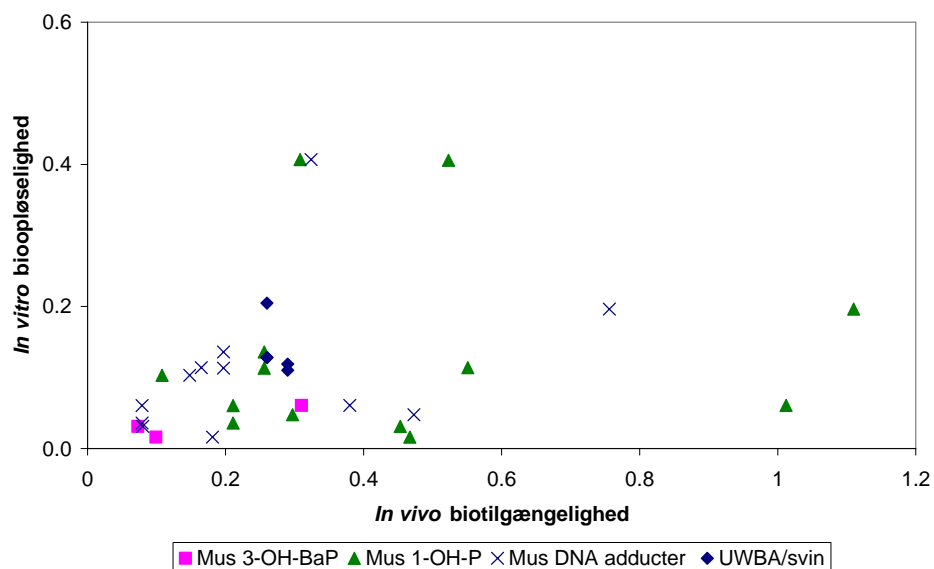
I Figur 7.11 er vist DBahA resultaterne for de 17 jorde, hvor *in vivo* data foreligger. For de 3 prøver med anslåede *in vivo* biotilgængelighedsdata opnået i UWBA/svin ses *in vitro* resultater af samme størrelsesorden som *in vivo* resultaterne, men igen skal erindres om, at den relative *in vivo* biotilgængelighed efter UWBA/svin metoden er en overgrænse for PAH forbindelsernes *in vivo* biotilgængelighed.

Der ses som ovenfor ingen sammenhæng imellem *in vitro* DBahA bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra udskillelse af pyren metabolitten 1-hydroxypyren (1-OH-P).

For *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra udskillelse af benzo(a)pyren metabolitten 3-hydroxybenzo(a)pyren (3-OH-BaP) er der få data til at vurdere en evt. sammenhæng.

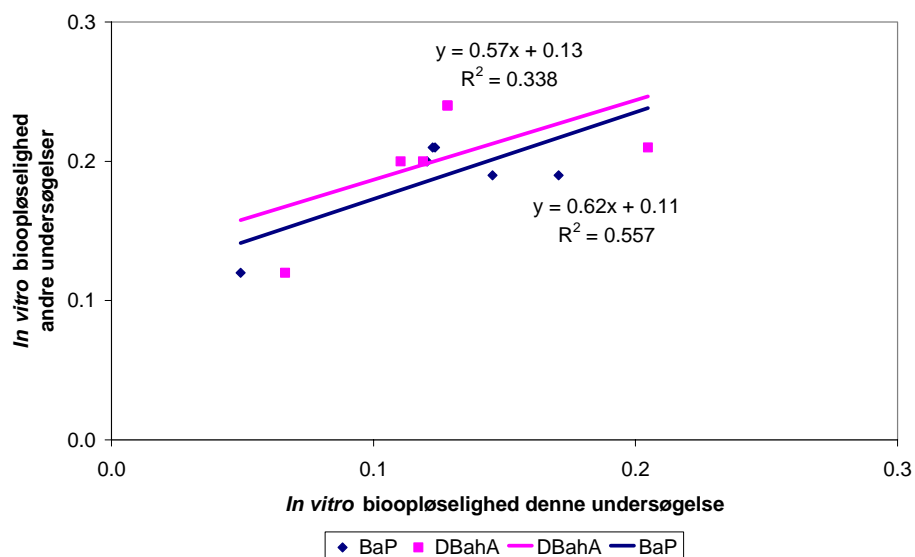
Der ses ingen sammenhæng imellem *in vitro* DBahA bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed beregnet ud fra dannelse af DNA adducter i mus.

Figur 7.11 *In vitro* bioopløselighed som funktion af *in vivo* biotilgængelighed af DBahA for alle jordprøver og alle *in vivo* undersøgelsesmetoder



Der foreligger ikke tilstrækkeligt mange data og oplysninger om de enkelte jordprøvers forureningshistorie og egenskaber til at give mulighed for en nærmere analyse af årsagerne til den manglende sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed for PAH.

Figur 7.12 *In vitro* bioopløselighed af PAH i anden undersøgelse og med anden testmetode som funktion af *in vitro* bioopløselighed bestemt ved RIVM metoden i denne undersøgelse



Der er antydningvis lineær sammenhæng imellem *in vitro* data for BaP og DBaH bioopløselighed opnået i denne undersøgelse med RIVM efter måltid metoden og med den anden metode, DIN /14/, hvor der foreligger *in vitro* data, se Figur 7.12. RIVM metoden gav højeste værdier for høje bioopløseligheder, mens DIN metoden gav højeste værdier ved lave bioopløseligheder.

Selvom længere testtid vil medføre højere *in vitro* bioopløselighed af PAH i RIVM testen, se afsnit 5.4, understøtter sammenligningen af RIVM bioopløseligheder med DIN metodens bioopløseligheder, Figur 7.12, ikke, at der skulle være behov herfor. Det skal dog understreges, at datamaterialet bag Figur 7.12 er begrænset, og at en endelig konklusion kræver adgang til *in vivo* biotilgængelighedsdata bestemt ved en accepteret og afprøvet metode.

Der har ikke i denne undersøgelses 2 faser (test runder) været medtaget samme jordprøve, hvorfor RIVM metodens robusthed over længere tidsrum ikke kan vurderes.

Sammenfattende vurderes, at RIVM metoden til bestemmelse af *in vitro* bioopløselighed af PAH i den afprøvede udformning med både mave og tarm segment samt fødetilsætning giver *in vitro* bioopløselighedsdata svarende til de eneste andre tilgængelige *in vitro* data for jordprøver, men sammenhæng til *in vivo* biotilgængelighedsdata kan ikke vurderes på grund af mangel på *in vivo* data.

8 Test af prøver med *in vivo* biotilgængelighed efter andre metoder

To andre test metoder, RIVM fastende uden tarm segment og SBRC, blev i undersøgelsens fase 3 afprøvet med henblik på at identificere metoder med en mere tilfredsstillende sammenhæng *in vitro* til *in vivo* end RIVM fastende metoden til test af bly bioopløselighed fra indhentede jordprøver, se afsnit 7.3.1.

RIVM test metoden uden tarm segment blev udvalgt til denne afprøvning af andre metoder, fordi forhøjet pH i tarm segmentet af RIVM fastende tidligere var identificeret som én årsag til dårlig sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* resultater, se afsnit 5.3 og 7.3.1.

SBRC metoden /64/ som offentliggjort af John Drexler /4/ blev udvalgt, fordi den er udviklet med henblik på at være en robust metode med kun et surt mave segment, fordi acceptable *in vitro* til *in vivo* sammenhænge er offentliggjort for bly med metoden /4;64/, og fordi metoden svarer til de krav, som den amerikanske miljøstyrelse (US EPA) forventes at opstille for en bioopløselighedstest til brug i risikovurdering af forurenede jord.

Til afprøvningen udvalgte 26 jordprøver med bly og/eller cadmium biotilgængelighed undersøgt *in vivo* i EPA/svin, samt 1 jordprøve undersøgt i UWBA/svin. Derudover blev medtaget 6 jordprøver fra danske forurenede grunde, der var blevet testet tidligere efter RIVM fastende metoden.

For at vurdere, om de benyttede danske jordprøver havde ændret sig som følge af opbevaring fra fase 1/2 til fase 3 blev de 6 danske jordprøver genanalyseret for metallerne bly og cadmium i fase 3.

Resultaterne i

Tabel 8.1 viser at jordprøver i fase 3 udviser nogenlunde samme homogenitet (udtrykt som den relative standardafvigelse/spredning for indhold af bly og cadmium) som tidligere fundet ved dobbelt test af jordprøverne (bly 14% og cadmium 12% relative standardafvigelse, se Tabel 6.8), ligesom der ikke var nogen klar forskel på indholdet af bly fundet i fase 1 og fase 3. For cadmium var analyseresultatet i fase 3 gennemsnitlig 21% under resultatet i fase 1. For de hjemhentede prøver sås generelt lavere resultater af jordanalyser i fase 3 end i fase 2 for både bly og cadmium, se Tabel 7.2.

Tabel 8.1 Homogenitet og metal indhold i danske jordprøver i fase 1 og 3

Homogenitet som relativ standard afvigelse	
Bly	15% (6) ¹⁹
Cadmium	5.4% (6)
Gennemsnitlig forskel relativ til koncentration i fase 1	
Bly	1.8% (6)
Cadmium	-21% (6)

Analyse i fase 3 af det certificerede referencemateriale NIST 2711 for cadmium gav et resultat omkring 20% under det forventede, men for bly et resultat svarende til det forventelige, se Tabel 4.5. På den baggrund er det valgt i fase 3 at benytte resultater af jordanalyser for bly som fundet i denne fase, men at forkaste resultaterne af jordanalyser for cadmium. I stedet er resultaterne fra tidligere faser for samme jordprøver benyttet.

8.1 Test af hjemhentede prøver med RIVM fastende uden tarm segment

RIVM fastende blev gennemført som beskrevet /8/, se også afsnit 2.1 og Bilag A for beskrivelse af metoden, men uden at gennemføre testens trin med tarm segment. Testen blev dog afprøvet med reduceret jordmængde (0.3 g imod foreskrevet 0.6 g) på grund af de små mængder af jordprøver til rådighed, men testens oprindelige, samlede væske til fast stof forhold (liquid to solid ratio, L/S) på 22.5 for mund/spiserør og mave segment blev opretholdt ved ligeledes at benytte mindre tilsætninger af fordøjelsesvæskerne.

Relativ bioopløselighed er i denne fase beregnet ud fra målt bioopløselighed af referenceprøver.

Der er udført test på 2 delprøver af 10 prøver, samt på 5 delprøver af 1 prøve, og ud fra dobbeltbestemmelser og replikater er den relative standardafvigelse beregnet (se /62/ for beskrivelse af metoden) for både prøveinhomogenitet og analytisk/test præcision (repetérbarhed). Testmetoden har netop overholdt kravet til en samlet test præcision bedre end 15% for både bly og cadmium, men præcision er klart dårligst for bly, Tabel 8.2.

Tabel 8.2 Relativ standardafvigelse for dobbelttest og replikat test af in vitro bioopløselighed i et udsnit af prøver, RIVM fastende uden tarm segment

	Dobbeltest	Replikat (5) test
Bly	15%	5.6%
Cadmium	3.6%	3.5%

8.1.1 Bly

I alt 18 prøver med *in vivo* biotilgængelighed målt i EPA/svin blev test efter RIVM fastende uden tarm segment, Figur 8.1.

Der var ikke lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data. For 6 af de testede prøver var pH efter mave segmentet over den anbefalede værdi på 1.8, se afsnit 5.3. Medtages kun de resterende 12 prøver med pH værdi i testens mave segment under den anbefalede værdi på 1.8, opnåedes en lineær

¹⁹ (): antal prøver i beregning

sammenhæng med *in vivo* data,

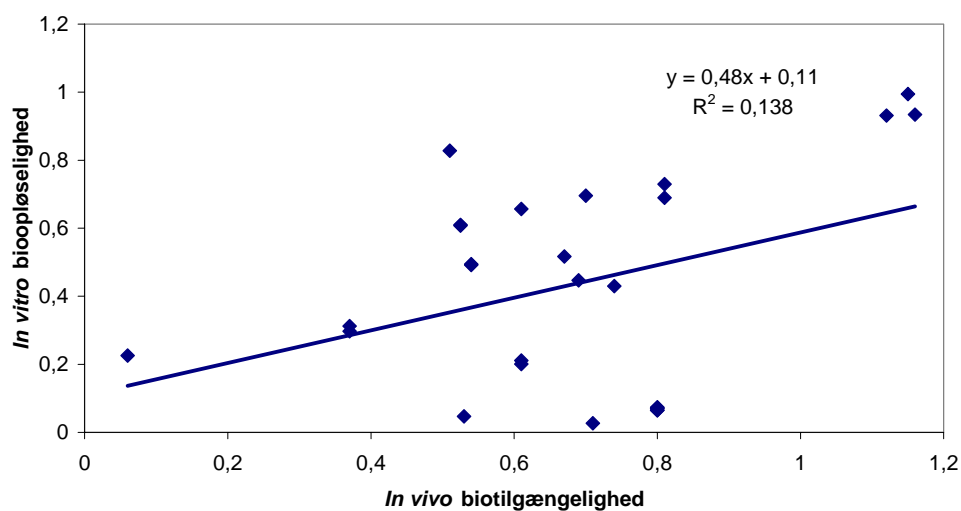
Figur 8.2.

Den gode lineære sammenhæng *in vitro* til *in vivo*, når prøver med for høj test pH udelukkes,

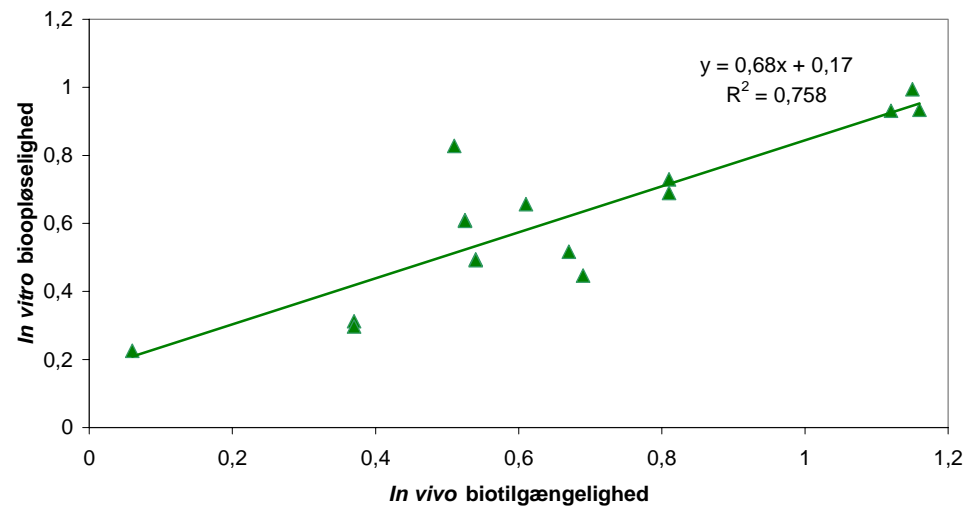
Figur 8.2, peger på, at en tilfredsstillende sammenhæng kunne opnås for alle prøver, såfremt pH i mave segmentet kunne holdes som anbefalet på under 1.8.

En del af de her testede jorde er tidligere testet for blys bioopløselighed efter andre metoder (IVG /5/, DIN /14/, SBRC /22/), men der var ikke lineær sammenhæng imellem disse data og data opnået med RIVM fastende uden tarm segment metoden. Der var ikke tilstrækkeligt mange data med både pH < 1.8 og test resultater til rådighed opnået med andre metoder til at tillade en analyse af den lineære sammenhæng.

Figur 8.1 *In vitro* bioopløselighed af bly efter RIVM fastende uden tarm segment imod *in vivo* biotilgængelighed fundet i EPA/svin



Figur 8.2 *In vitro* bioopløselighed af bly efter RIVM fastende uden tarm segment imod *in vivo* biotilgængelighed fundet i EPA/svin, pH efter mave segment <1.8



Denne test metode er ikke benyttet i andre faser af denne undersøgelse, hvorfor variationen imellem test serier ikke kan belyses.

8.1.2 Cadmium

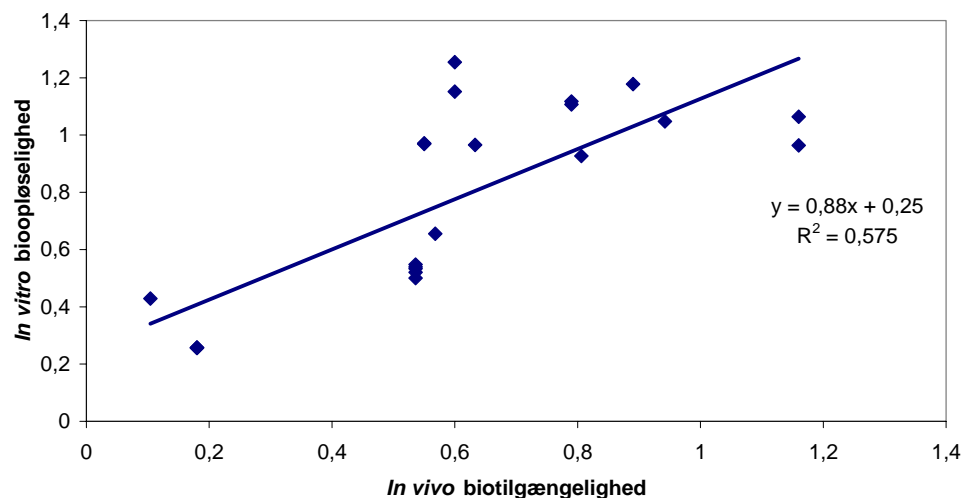
I alt 13 prøver med *in vivo* biotilgængelighed målt i EPA/svin blev testet efter RIVM fastende uden tarm segment,

Figur 8.3.

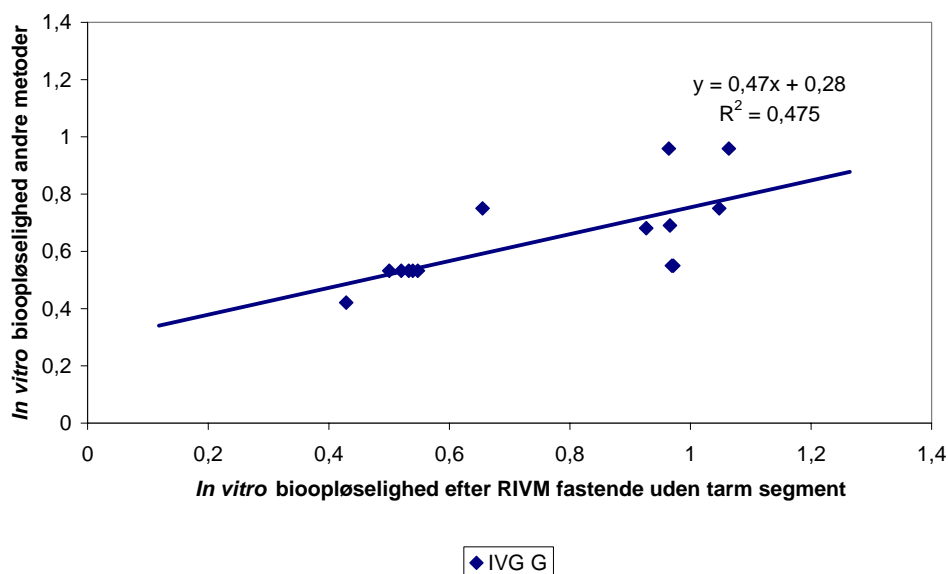
Der var lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, og *in vitro* data var generelt noget højere end *in vivo* data.

En del af de her testede jorde er tidligere testet for cadmiums bioopløselighed efter en anden metode (IVG G /6/), men resultaterne opnået med de 2 metoder udviser netop ikke lineær sammenhæng, Figur 8.4.

Figur 8.3 *In vitro* bioopløselighed af cadmium efter RIVM fastende uden tarm segment imod *in vivo* biotilgængelighed fundet i EPA/svin



Figur 8.4 *In vitro* bioopløselighed af cadmium opnået med en anden metode (IVG /6/) afbildet imod bioopløselighed opnået med RIVM fastende uden tarm segment



IVG G metoden giver højest bioopløselighed for lave værdier, mens RIVM fastende uden tarm segment giver højest bioopløselighed for høje værdier.

Denne test metode er ikke benyttet i andre faser af denne undersøgelse, hvorfor variationen imellem test serier ikke kan belyses.

8.2 Test af hjemhentede prøver med SBRC

SBRC metoden blev gennemført som beskrevet /4/, se også afsnit 2.1 og Bilag C for beskrivelser af metoden, men testen blev dog afprøvet med reduceret jordmængde (0.5 g imod foreskrevet 1.0 g) på grund af de små mængder af jordprøver til rådighed. Testens oprindelige væske til fast stof forhold (liquid to solid ratio, L/S) på 100 blev opretholdt ved at benytte mindre tilsætninger af fordøjelsesvæskerne.

Relativ bioopløselighed er i denne fase beregnet ud fra målt bioopløselighed af referenceprøver.

Inden test af jordprøver blev indkøbt filtre af den type, der angives i testforskriften /4/, og såvel filtre som procedure blev gennemført med henblik på sikring af tilstrækkeligt lave blindresultater (blindprøver) og tilstrækkeligt god genfindning af metaller tilsat som en opløsning af metalsalte (syntetiske kontrolprøver). Der var ikke tegn på prøveforurening med eller -tab af bly og cadmium i test proceduren, Tabel 8.3.

Tabel 8.3 Kontrol af blindbidrag og genfindning af kontrol i SBRC test

	Opløsning til test	Ufiltreret testopløsning	Filtreret testopløsning
<i>Bly</i>			
Blind, koncentration	<0.01 mg/L	<0.01 mg/L	<0.01 mg/L
Kontrol, genfindning	100%	101%	101%
<i>Cadmium</i>			
Blind, koncentration	<0.002 mg/L	<0.002 mg/L	<0.002 mg/L
Kontrol, genfindning	98%	99%	101%

Der er udført test på 2 delprøver af 10 prøver, samt på 4 delprøver af 1 prøve og ud fra dobbeltbestemmelser og replikater er den relative standardafvigelse beregnet (se /62/ for beskrivelse af metoden) for både prøveinhomogenitet og analytisk/test præcision (repetérbarhed). Testmetoden har overholdt kravet til en samlet test præcision bedre end 15% for både bly og cadmium, men præcision er dårligst for bly, Tabel 8.4.

Tabel 8.4 Relativ standardafvigelse for dobbelttest og replikat test af in vitro bioopløselighed i et udsnit af prøver, SBRC

	Dobbeltest	Replikat (4) test
Bly	5.9%	8.9%
Cadmium	3.2%	1.4%

8.2.1 Bly

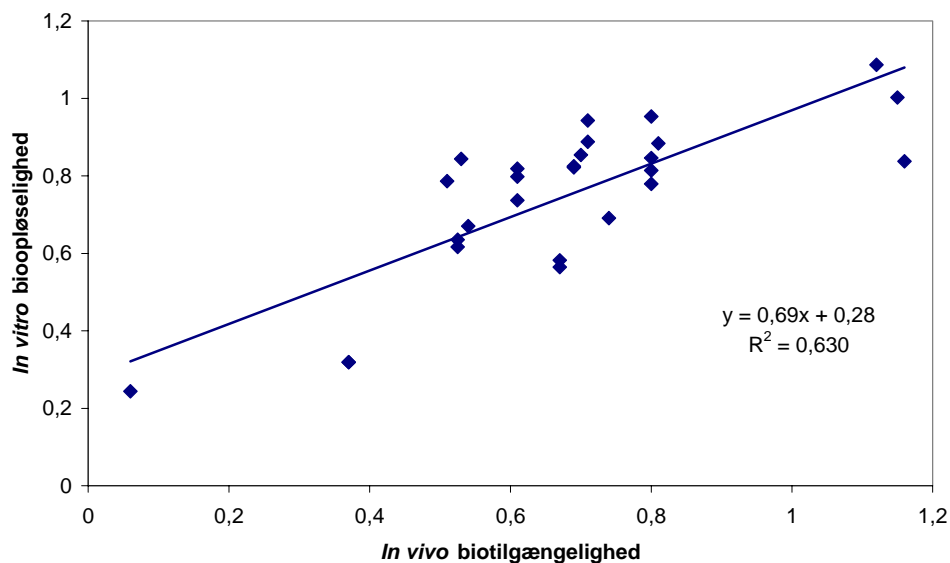
I alt 18 prøver med *in vivo* biotilgængelighed målt i EPA/svin blev test efter SBRC metoden,

Figur 8.5.

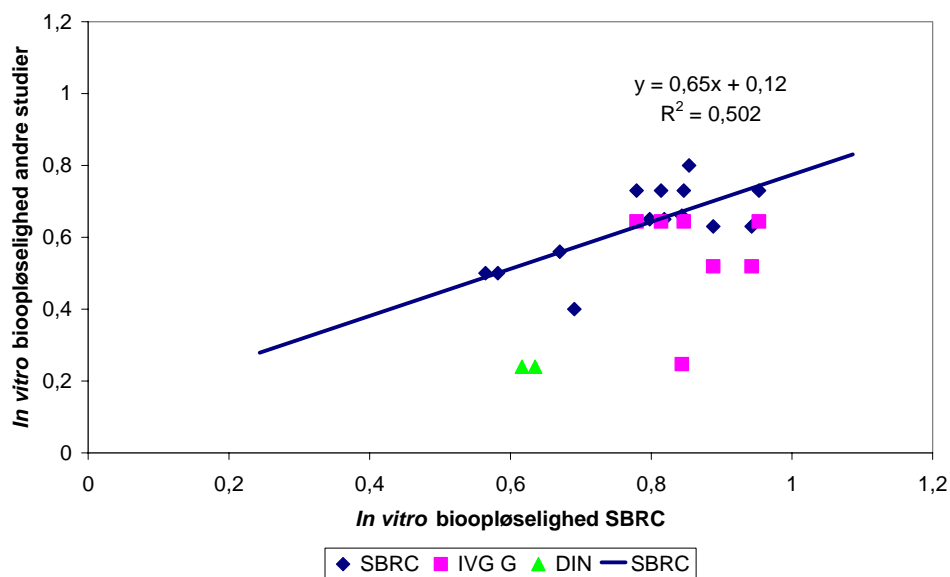
Der var lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, og generelt var *in vitro* bioopløseligheder højere end *in vivo* biotilgængeligheder.

En del af de her testede jorde er tidligere testet for bly bioopløselighed efter andre metoder (IVG G /5/, DIN /14/) eller med samme metode i andre studier (SBRC /22/). Der var netop lineær sammenhæng imellem data opnået med SBRC metoden i denne undersøgelse og i andre studier, Figur 8.6, med data fra denne undersøgelse generelt højere end tidligere rapporteret for samme jorde med samme metode /22/. Der var ikke lineær sammenhæng imellem data opnået med SBRVC og med IVG G, som kun omfatter et mave segment, og for DIN metoden var der ikke tilstrækkeligt mange data til at muliggøre en vurdering af en eventuel lineær sammenhæng.

Figur 8.5 *In vitro* bioopløselighed af bly efter SBRC imod *in vivo* biotilgængelighed fundet i EPA/svin



Figur 8.6 *In vitro* bioopløselighed af bly opnået med andre metoder (IVG /5/, DIN /14/) eller med samme metode i andre studier (SBRC /22/) afbildet imod bioopløselighed opnået med SBRC i denne undersøgelse



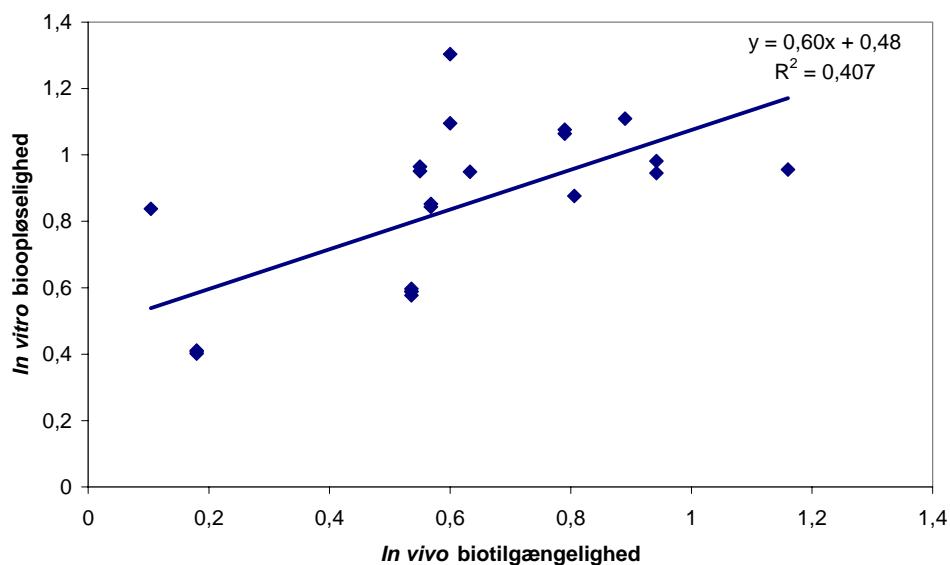
For SBRC metoden er tidligere specificeret, at det certificerede referencemateriale NIST 2711 skal anvendes til intern kvalitetskontrol, hvor resultatet skal være indenfor $9,22 \pm 1,50$ mg bly/L testopløsning. I denne undersøgelse blev fundet 9,7 mg/L ved dobbelt test af NIST 2711, hvilket er indenfor det foreskrevne interval.

Denne test metode er ikke benyttet i andre faser af denne undersøgelse, hvorfor variationen imellem test serier ikke kan belyses.

8.2.2 Cadmium

I alt 13 prøver med *in vivo* biotilgængelighed målt i EPA/svin blev test efter RIVM fastende uden tarm segment, Figur 8.7.

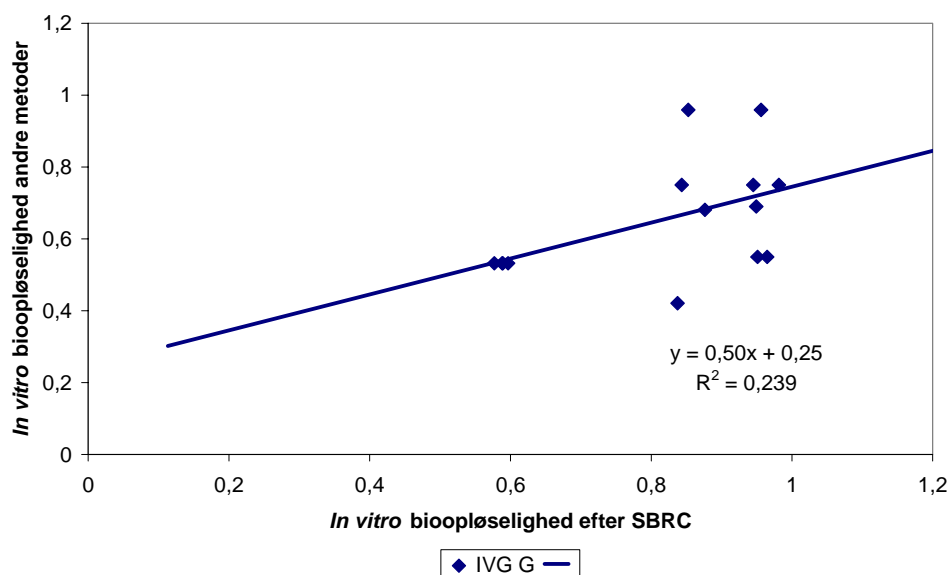
Figur 8.7 *In vitro* bioopløselighed af cadmium efter SBRC imod *in vivo* biotilgængelighed fundet i EPA/svin



Der var ikke lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, og *in vitro* data var generelt højere end *in vivo* data. Hovedparten af test resultaterne faldt i området 0.8-1.2, også for jordprøver med *in vivo* biotilgængelighed 0.6 eller derunder.

En del af de her testede jorde er tidligere testet for cadmiums bioopløselighed efter en anden metode (IVG G /6/), men resultaterne opnået med de 2 metoder udviser ligeledes ikke lineær sammenhæng, Figur 8.8. SBRC test resultaterne er alle, på nær for én jordprøve, i intervallet 0.8-1.0.

Figur 8.8 *In vitro* bioopløselighed af cadmium opnået med en anden



metode (IVG /6/) afbildet imod bioopløselighed opnået med SBRC. Denne test metode er ikke benyttet i andre faser af denne undersøgelse, hvorfor variationen imellem test serier ikke kan belyses.

8.3 Sammenligning af bioopløselighedsdata opnået med forskellige testmetoder for de hjemhentede prøver

Repetitbarheden opnået ved test af dobbeltprøver viser, Tabel 8.5, at kun RIVM fastende uden tarm segment har en væsentligt afvigende repetitbarhed (dårligere) for bly, formodentlig på grund af den utilstrækkelige fastholdelse af pH i testen.

Tabel 8.5 Relativ standardafvigelse for dobbelttest sammenfattet for forskellige test metoder for bioopløselighed af metaller fra jord

	Pb	Cd	Ni
RIVM fastende	6.4% (10) ²⁰	5.0% (10)	4.9 (9)
RIVM fastende uden tarm segment	15% (10)	3.6% (10)	- ²¹
SBRC	5.9% (10)	3.2% (10)	-

For de testmetoder og metaller, hvor der er fundet lineær sammenhæng imellem *in vitro* og *in vivo* data, er i Tabel 8.6 vist relativ bioopløselighed beregnet ud fra valgte værdier af biotilgængelighed under anvendelse af de opnåede lineære regressionsligninger, se Figur 8.10 og Figur 8.11. De beregnede relative bioopløseligheder kan betragtes som et overslag på de resultater, der vil blive fundet ved test af jordprøver med de valgte værdier af relative biotilgængeligheder.

Tabel 8.6 Relativ bioopløselighed beregnet ud fra valgte værdier af biotilgængelighed baseret på lineær sammenhæng

Metal	Valgt biotilgængelighed	RIVM fastende	RIVM fastende uden tarm segment, pH < 1.8	SBRC
<i>Bly</i>				
	0.10	- ²²	0.24	0.30
	0.50	-	0.51	0.58
	0.90	-	0.78	0.85
<i>Cadmium</i>				
	0.10	0.083	0.34	-
	0.50	0.47	0.69	-
	0.90	0.85	1.03	-

For bly er de beregnede relative bioopløseligheder for både RIVM fastende uden tarm segment og SBRC høje ved lave biotilgængeligheder og lave ved høje biotilgængeligheder, men RIVM metoden er mest retvisende.

For cadmium er RIVM fastende mest retvisende, mens relative bioopløseligheder med RIVM fastende uden tarm segment er meget høje sammenholdt med relative biotilgængeligheder.

8.3.1 Bly

Kun for SBRC metoden viser Figur 8.9 en lineær sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed af bly fra jordprøver fundet i andre undersøgelser.

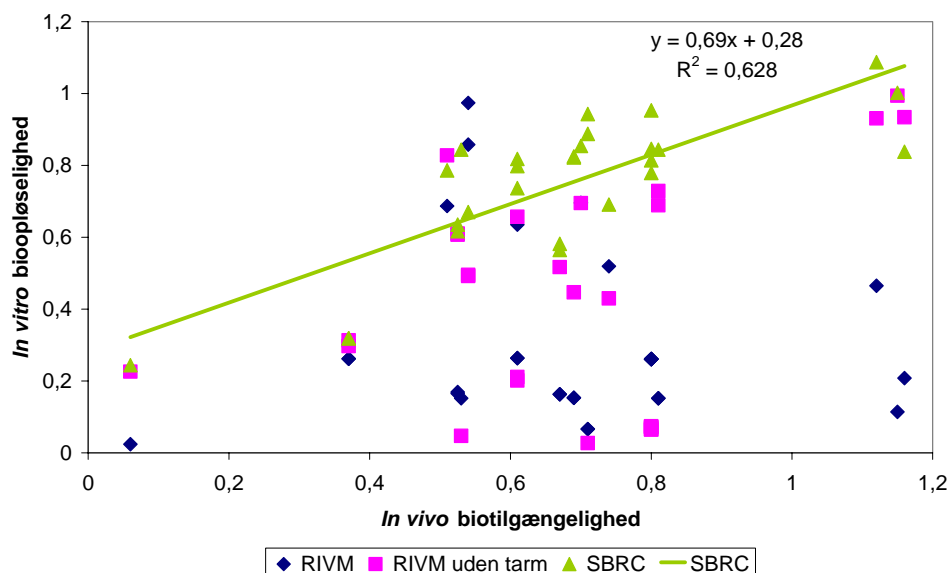
²⁰ (): antal dobbelttest i beregning

²¹ -: ikke testet for Ni med denne metode

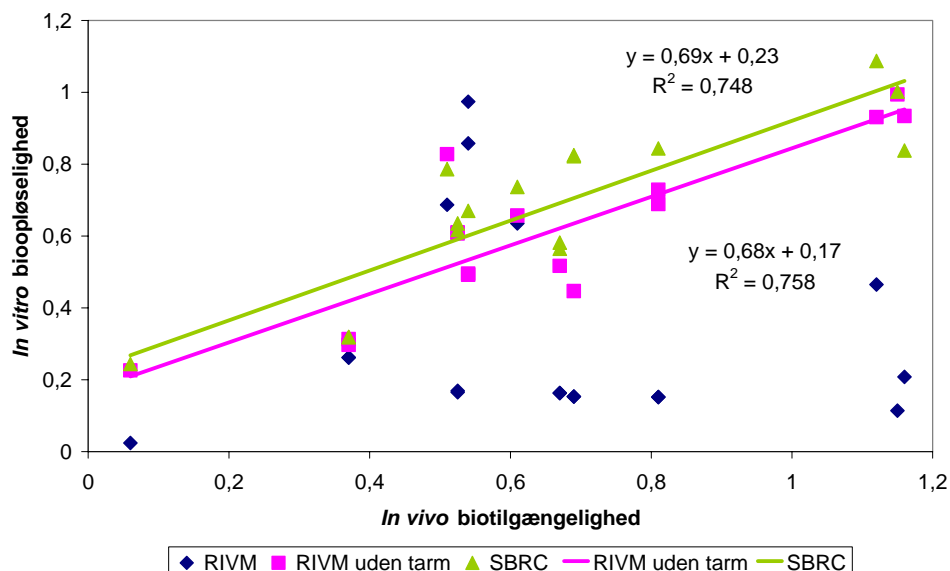
²² -: ikke lineær sammenhæng *in vitro* til *in vivo*

Hvis kun testresultater opnået med RIVM fastende uden tarm segment med pH i testopløsningen under den specificerede maksimum værdi på 1.8 medtages, Figur 8.10, viser både disse data og SBRC linear sammenhæng med omtrent samme korrelationskoefficienter (R^2), hvor RIVM fastende uden tarm segment her giver den bedste overensstemmelse med *in vivo* data.

Figur 8.9 *In vitro* bioopløselighed af bly opnået med de 3 afprøvede test metoder imod *in vivo* biotilgængelighed opnået i EPA/svin



Figur 8.10 *In vitro* bioopløselighed af bly opnået med de 3 afprøvede test metoder imod *in vivo* biotilgængelighed opnået i EPA/svin, RIVM fastende uden tarm segment kun prøver med test pH under 1.8



Selv med udelukkelse af prøver med for høj pH i mave segmentet viste RIVM fastende uoverensstemmelse imellem *in vitro* og *in vivo* data, Figur 8.10. I denne fremstilling skulle desuden effekten af høj pH i tarm segmentet på bly bioopløselighed være kompenseret i udregningen af den relative bioopløselighed, se afsnit 5.3. Det må derfor konkluderes, at andre faktorer end pH giver afvigende bioopløselighed med RIVM fastende metoden. Samtidig er konstateret, at genfindning af tilsat bly i testen reduceredes

væsentligt med jord i testen, se afsnit 5.1. På den baggrund er det sandsynligt, at andre komponenter tilsat med jorden, f.eks. fosfat, har bidraget til de i flere tilfælde meget lave bioopløseligheder med denne metode.

På den baggrund og udfra den tidligere opnåede tilfredsstillende *in vitro* til *in vivo* korrelation for det samlede datasæt for RIVM fastende, Figur 7.1, vurderes denne metode for bly ikke at give en tilfredsstillende *in vitro* bioopløselighed og overensstemmelse med biotilgængelighed som målt *in vivo* i dyr.

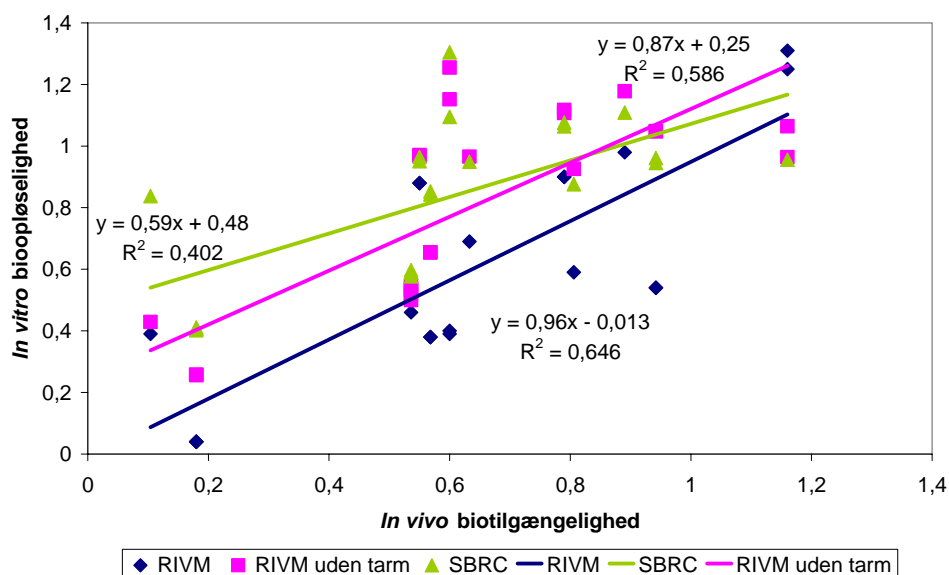
Metoderne SBRC og RIVM fastende uden tarm segment vurderes begge for bly at give tilfredsstillende bioopløselighed og overensstemmelse med biotilgængelighed som målt *in vivo* i dyr, hvor RIVM fastende uden tarm segment har givet resultater med bedst overensstemmelse. Denne vurdering er dog betinget, at RIVM fastende uden tarm segment kan modificeres, således at pH i mave segmentet fastholdes under 1.8 for alle relevante jorde, uden at metodens resultater i øvrigt påvirkes.

8.3.2 Cadmium

For cadmium viser Figur 8.11 den bedste lineære sammenhæng imellem RIVM fastende *in vitro* data og EPA/svin *in vivo* data og også den bedste generelle overensstemmelse *in vitro* til *in vivo*. RIVM fastende uden tarm segment viser også en lineær sammenhæng med *in vivo* data, mens dette ikke er tilfældet for SBRC. Både for RIVM fastende uden tarm segment og for SBRC, der begge simulerer opløsning alene i maven, viste alle prøver med biotilgængelighed over cirka 0.6 værdier for bioopløselighed omkring 1, dvs. fuldstændig opløsning af cadmium fra disse jordprøver. Samtidig var *in vitro* data for disse 2 metoder højere eller meget højere end *in vivo* data.

På den baggrund og udfra den tidligere opnåede tilfredsstillende *in vitro* til *in vivo* korrelation for det samlede datasæt for RIVM fastende, Figur 7.7, vurderes denne metode at give en tilfredsstillende *in vitro* bioopløselighed og den bedste overensstemmelse med biotilgængelighed som målt *in vivo* i dyr.

Figur 8.11 *In vitro* bioopløselighed af cadmium opnået med de 3 afprøvede test metoder imod *in vivo* biotilgængelighed opnået i



8.4 Test af danske jordprøver med RIVM fastende uden tarm segment og SBRC

Én jordprøve fra hver af de 6 danske forurenede grunde, der tidligere var testet for metallers bioopløselighed, blev testet som dobbeltbestemmelser efter metoderne RIVM fastende uden tarm segment og SBRC, Tabel 8.7 og Tabel 8.8 for henholdsvis bly og cadmium.

Tabel 8.7 Relativ bioopløselighed og gennemsnitlig præcision for test af jordprøver fra 6 danske, forurenede grunde, bly

	RIVM fastende	RIVM fastende uden tarm segment	SBRC
Generel bybelastning	0.88	0.65	0.90
Trafikbelastet byjord	0.18	0.64	0.62
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	1.08	0.87	0.90
Byjord slaggeforurenede fra metaloparbejdning	0.13	0.24 ²³	0.76
Byjord forurenede fra metalstøberi	0.11	0.25 ²⁴	0.75
Byjord forurenede fra porcelænsfabrik	0.36	0.51	0.72
Gennemsnitlig præcision (relativ standardafvigelse)	14%	10%	2.2%

For bly vurderes relative bioopløseligheder opnået med RIVM fastende metoden uden tarm segment at give det bedste estimat af relative biotilgængelighed for de 4 jorde med pH i mave segmentet under den maksimale værdi på 1.8, se afsnit 8.3. De relative bioopløseligheder for de 2 jorde med høj pH i mave segmentet er formodentlig for lave med denne metode. Det skal bemærkes, at test af de samme danske jorde med RIVM fastende uden tarm segment og en mindre mængde jord (0.06 g imod standard 0.6 g) har vist pH under den specificerede maksimum værdi og relative bioopløseligheder nogenlunde svarende til de her opnåede for SBRC metoden, se Tabel 8.7 (ikke offentliggjorte resultater fra {Oomen 2005 218 /id}).

De relative bioopløseligheder opnået med SBRC metoden er formodentlig rimelige men relativt høje estimer af den faktiske biotilgængelighed af bly fra disse 6 jorde.

De relative bioopløseligheder opnået med RIVM fastende metoden er for 4 jorde væsentligt under resultaterne opnået med de andre metoder, og samlet har denne metode formodentlig givet for lave estimer af den faktiske relative biotilgængelighed.

Præcisionen ved test for bly af de danske jorde var sammenlignelig for de to RIVM metoder, men væsentlig bedre for SBRC, se også Tabel 6.8.

²³ pH efter mave segment over den maksimale værdi på 1.8

²⁴ pH efter mave segment over den maksimale værdi på 1.8

For cadmium vurderes relative bioopløseligheder opnået med RIVM fastende metoden at give det bedste estimat af relative biotilgængelighed, se afsnit 8.3. I overensstemmelse med diskussionen i afsnit 8.3 gav de danske jorde højere bioopløseligheder med RIVM fastende uden tarm segment og SBRC, og værdierne opnået med disse to metoder er formodentlig ikke gode bud på over den faktiske biotilgængelighed af cadmium fra disse jorde.

Tabel 8.8 Relativ bioopløselighed og gennemsnitlig præcision for test af jordprøver fra 6 danske, forurenede grunde, cadmium

	RIVM fastende	RIVM fastende uden tarm segment	SBRC
Generel bybelastning	0.50	1.22	1.16
Trafikbelastet byjord	< ²⁵	1.02	1.17
Byjord diffust belastet fra metaloparbejdning	0.64	0.92	0.89
Byjord slaggeforurenede fra metaloparbejdning	0.56	0.83	0.95
Byjord forurenede fra metalstøberi	0.38	0.85	0.91
Byjord forurenede fra porcelænsfabrik	0.52	1.11	1.09
Gennemsnitlig præcision (relativ standardafvigelse)	13%	7.2%	12%

Præcisionen ved test for cadmium af de danske jorde var sammenlignelig for RIVM fastende og SBRC, men bedre for RIVM fastende uden tarm segment, se også Tabel 6.8.

²⁵ -: test for bioopløselighed gav resultat under testens detektionsgrænse

9 Vurdering og anbefalinger

De danske jordkvalitetskriterier (2005) for metallerne bly (Pb) og nikkel (Ni), samt de polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH forbindelserne) benzo(a)pyren (BaP) og dibenzo(a,h)anthracen (DbahA) er helt eller delvist baserede på risikoen ved oralt optag i mennesker. Det samme gælder afskæringskriteriet for cadmium (Cd). En gennemgang af den videnskabelige og tekniske litteratur samt konsultationer med internationalt førende forskere på området har tidligere vist, at i nogen tilfælde er kun en del af jordens totale indhold af forureninger tilgængelig for optag i menneskets mave-tarmsystem /24/. Tilsvarende er det velkendt, at jordforureningers biotilgængelighed for og toksicitet overfor mikroorganismer, planter og dyr varierer /73-76/.

9.1 *In vivo* og *in vitro* metoder

Måling af en jordforurenings optag med direkte relevans for vurdering af risiko ved humant, oralt optag foretages optimalt ved forsøg med dyr (eller mennesker): ***in vivo*** undersøgelse af forureningens biotilgængelighed. Der benyttes en række forskellige ***in vivo*** metoder til at måle stoffers orale biotilgængelighed (se f.eks. oversigten i /1/), men i praksis er primært anvendt, dokumenteret og anerkendt en metode med måling af optag af bly i unge svin, som er udviklet for den amerikanske Miljøstyrelse (US EPA). Metoden er også benyttet for cadmium, og bør i princippet på tilsvarende vis kunne benyttes for nikkel. For PAH findes ikke en dokumenteret og anerkendt metode til måling af biotilgængelighed, først og fremmest på grund af PAHs nedbrydning og omdannelse i forsøgsdyrene.

In vivo metoder til måling af jordforureningers biotilgængelighed er behæftede med betydelig variabilitet og resultaterne afhænger af forsøgsdyr, målepunkter (blod, organer), doseringer og beregningsmåde. Anvendes samme forsøgsdyr, målepunkter og doseringer, er f.eks. fundet en variabilitet (relativ standardafvigelse) på 8-53% for ***in vivo*** relativ biotilgængelighed af bly fra 6 forurenede jorde /14/. Det må forventes, at samme variabilitet vil findes for dyreforsøg til fastlæggelse af toksicitet af forureninger.

Fordi ***in vivo*** undersøgelser er omkostningstunge, tidskrævende og etisk ikke uproblematisk, benyttes i stedet måling af den fraktion af en jordforurening, der kan opløses i menneskets mave-tarmsystem som et mål for stoffernes højst mulige orale biotilgængelighed: ***in vitro*** test for den humane bioopløselighed. Bioopløseligheden af jordforureninger afhænger af forureningers kemiske egenskaber, jordtype og -egenskaber og forholdene i mave-tarmsystemet.

Der benyttes en række forskellige ***in vitro*** metoder til at måle stoffers bioopløselighed i det humane mave-tarm system, se f.eks. oversigten i /1/. Metoderne er primært anvendt til måling af bioopløselighed af bly og cadmium fra jord, men også i enkelte tilfælde for nikkel og PAH.

In vitro metoderne er ligeledes behæftede med betydelig variabilitet, og resultaterne afhænger af test betingelser (primært pH) og segmenter (mave, tarm) medtaget. Anvendes samme metode, er f.eks. fundet en variabilitet (relativ

standardafvigelse) på 0.2-7% for *in vitro* relativ bioopløselighed af bly fra de samme 6 forurenede jorde /14/, som er nævnt ovenfor, altså betydeligt mindre end for *in vivo* biotilgængelighedsresultaterne.

Valget af *in vitro* metoder til bestemmelse af jordforurenings bioopløselighed med henblik på brug i risikovurdering baseres på ønsket om, at testmetoderne skal være:

- forklarlige (dvs. simulere opløsningsprocesserne i menneskets mave-tarmsystem)
- robuste (dvs. kunne gentages med "samme" resultat)
- relevante (dvs. give resultater svarende til resultaterne af optagsforsøg i dyr eller mennesker)

Ingen test metoder opfylder de angivne ønsker fuldstændigt, men en række metoder opfylder de vigtigste af ønskerne eller kan bringes dertil relativt simpelt: PBET (flere versioner, fysiologisk baseret), RIVM (fastende og efter måltid versioner, fysiologiske betingelser tilstræbt) og DIN (fysiologiske betingelser tilstræbt). Dertil kommer den simple SBRC test, som anvendes udbredt i USA uden at være fysiologisk baseret.

Der foreligger på nuværende tidspunkt ikke rapporter om egentlige metodeafprøvninger med flere laboratoriers deltagelse med samme testmetode, ligesom der ikke foreligger rapporter om præstationsprøvninger for bioopløselighed af jordforurenninger. Da litteraturen om testmetoder for bioopløselighed tillige først og fremmest er rettet imod udvikling af metoder og kobling til biotilgængelighedsdata (se nedenfor), kan metodernes generelle robusthed ikke vurderes endnu. Det skal dog bemærkes, at test for bioopløselighed er metodeafhængig (sammenlign f.eks. med analyse for biokemisk iltforbrug, BOD₅ af spildevand, der ligeledes er metodeafhængig, men benyttes udbredt), og forskellige metoder vil derfor ikke automatisk give samme resultat. Det er derfor afgørende nødvendigt for retvisende brug af bioopløselighed i risikovurdering af forurenede jord, at der vælges én eller nogle få test metoder.

For bly og cadmium er i tidligere undersøgelser fundet god sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed. Sammenhængen afhænger både af *in vitro* metode og *in vivo* metode og er specielt for bly bedst for metoder med kun et mave segment. For nikkel og PAH er ikke fundet tilstrækkeligt datamateriale til at foretage en endelig vurdering.

Det skal bemærkes, at en god sammenhæng *in vitro* til *in vivo* ikke i sig selv er et tilstrækkeligt kriterium for en testmetode for bioopløselighed af jordforurenninger, der er velegnet til brug i risikovurdering. Testmetoden skal dels tillige være forklarlig og robust, som beskrevet ovenfor, dels er *in vivo* metoder som nævnt fejlbehæftede på samme måde som andre undersøgelsesmetoder, se afsnit 2.7.

9.2 Doseringsreference

Grænserne for jords indhold af forurenninger er oftest sat ud fra giftighed overfor dyr eller optag i mennesker fundet med forurenninger tilført i ren form (den toksikologiske reference) og dermed uden begrænsninger i tilgængelighed. Derfor er der behov for at inddrage jordforurenings tilgængelighed ved formulering og/eller håndhævelse af grænseværdier baseret på risiko ved oralt optag.

Formålet med test for human bioopløselighed er at måle forskellen i opløselighed af en jordforurening relativt til opløseligheden af det samme stof i den toksikologiske reference. Med henblik på at give et relativt mål for jordforureningernes bioopløselighed, sammenholdt med bioopløseligheden af stofferne i de biologiske undersøgelser, som ligger bag kriterierne, er identificeret de doseringsformer, som er benyttet her, se kapitel 3. For Pb og Ni er på den baggrund i denne undersøgelse benyttet opløsning af letopløselige salte i vand som toksikologisk reference, mens der for Cd (vandig opløsning af letopløseligt salt) og PAH (opløsning i organisk opløsningsmiddel) er benyttet tilsætning til hvedemel svarende til dosering med føde i de toksikologiske undersøgelser. Da der hverken for Cd eller PAH er fundet væsentlig forskel på genfindingen fra vandig/organisk opløsning og fra hvedemel (se kapitel 5), anbefales i fremtiden kun at benytte opløsninger i vandig/organisk opløsning som doseringsreferencer.

9.3 Valg af tests og testbetingelser

I kapitel 4 er opsummeret testtekniske krav for *in vitro* metoder med henblik på anvendelse i risikovurdering for jordforureninger. Der er med udgangspunkt i disse krav og i den ovennævnte rapport /24/ i første omgang valgt at afprøve testmetoderne RIVM fastende og efter måltid med henblik på bioopløselighed af de udvalgte jordforureninger, metallerne Cd, Ni og Pb, henholdsvis PAH forbindelserne BaP og DBahA. Begge RIVM metoderne omfatter de 3 segmenter: mund/spiserør, mave og tarm og tilstræber at simulere fysiologiske forhold i menneskets mave-tarmsystem.

RIVM fastende metoden simulerer forholdene i et fastende barns mave og er valgt som test metode for metaller bioopløselighed. Denne test anføres i litteraturen at give et realistisk, men forsigtigt mål for metaller bioopløselighed, særligt fordi metoden anvender en lav pH ved simulering af opløsning i mavesækken og en relativt lav pH ved simulering af opløsning i tyndtarmen. For de organiske PAH forureninger er valgt en anden version af samme test, RIVM efter måltid, der simulerer forholdene i barnets mave efter indtagelse af et måltid. Denne test anføres i litteraturen at give et realistisk, men forsigtigt mål for opløsningen af apolære organiske forureninger som PAH, fordi metoden anvender noget højere pH i alle trin, øget tilsætning af galde, samt tilsætning af fødesurrogat. Afprøvningen af testene viste tillige, at kolloid bundne metaller og PAH i testresultaterne medtages som bioopløselige.

På grund af utilfredsstillende sammenhæng imellem *in vitro* bioopløselighed og *in vivo* biotilgængelighed for bly fra en række jordprøver med *in vivo* data opnået i andre undersøgelser valgtes at foretage en supplerende vurdering af to alternative test metoder for bioopløselighed af bly og cadmium fra jord: RIVM fastende uden tarm segment og SBRC.

9.4 Afprøvning af RIVM testmetoder

Afprøvningen af RIVM testmetoderne viste, at testen for metaller kan benyttes med detektionsgrænser under 1/10 af kriterieværdierne med præcision svarende til kvalitetsklasse 3, eller for bly af forsøgstekniske årsager noget dårligere, lineært til 4–5 x kriterieværdien (kapitel 5). Kravet til genfindning af tilsatte mængder metal i testen kan ikke afprøves, men bioopløseligheden fundet i denne afprøvning for et kontrolmateriale var af samme størrelsesorden som fundet af andre laboratorier med sammenlignelige

testmetoder, undtagen for bly. Testen for PAH kan benyttes lineært fra eller under 1/10 af kriterieværdierne til 500 x kriterieværdierne. Præcisionen er noget dårligere end gældende for kvalitetsklasse 3, men dette er forventeligt for en analyse for organiske stoffer i jord (kapitel 5).

Testkvaliteten skal kontrolleres i hver testserie med mindst 2 blindprøver og 2 syntetiske kontrolprøver (benyttes også som doseringsreferencer), 1 dobbeltbestemmelse per lokalitet, samt 1 stabil og homogen kontrolprøve.

For de analysemetoder, der benyttes til analyse af testopløsningerne og jord, gælder, at der skal stilles krav til dokumentation af overholdelse af specificerede krav til præcision, genfinding og detektionsgrænse, hvis den krævede testkvalitet skal kunne overholdes. Endvidere skal for jord benyttes samme metoder, som benyttes ved analyse af totalkoncentrationer til kontrol af kvalitetskriterier. Analyse kvaliteten skal dokumenteres ved validering af de benyttede metoder inden test, samt ved løbende kvalitetskontrol ifølge de metoder og anvisninger, der normalt benyttes for analysemetoder. Realistiske krav til test- og analysekvalitet er opsummeret i Tabel 4.3, idet det tillige skal gælde, at målte bioopløselige koncentrationer skal være indenfor det dokumenteret lineære område for testene.

Det har vist sig nødvendigt at gennemføre metal analyser af testopløsninger fra RIVM fastende som "straksanalyser" af ukonserverede men syrefortyndede prøver, samt at foretage en beregning af relativ bioopløselighed, der inkluderer slut pH i tarm segmentet. Endvidere har denne test særligt for bly udvist en ikke tilfredsstillende høj variabilitet med længere tid imellem test serierne og imellem forskellige laboratorier (manglende robusthed).

9.5 Test af jord for forurenede danske grunde med RIVM metoderne

Ved afprøvning af RIVM testene på jordprøver fra 7 danske lokaliteter med forskellige forureningskilder er fundet bioopløselige koncentrationer af forureninger i jordprøverne, der var under eller væsentligt under de totale koncentrationer (Tabel 6.9). Variabiliteten af målte bioopløselige koncentrationer var lidt større end, men af samme størrelsesorden som variabiliteten for totalkoncentrationer (Tabel 6.7). I Tabel 9.1 er givet det spænd, indenfor hvilket man ud fra denne begrænsede undersøgelses datamateriale kan anslå, at test for human bioopløselige jordforureninger vil være relevant for fastlæggelsen af den reelle risiko ved oralt optag.

Tabel 9.1 Spænd for relevant anvendelse af test for human bioopløselighed af jordforureninger som opnået med RIVM metoderne for danske jorde

(anført som multiplum af det relevante kriterium)	Cd	Pb	Ni	BaP	DBahA
Spænd for relevant anvendelse af test for human bioopløselighed	1-3	(1-4) ²⁶	1-10	1-20	1-20

²⁶ For bly er spændet formodentlig overvurderet med RIVM fastende test metoden, se teksten, korrekt spænd er formodentlig 1-2 for de danske jordprøver, der er test her

Test af jordprøver fra de danske forurenede grunde med andre test metoder, se kapitel 8, tyder på, at resultaterne opnået med RIVM fastende metoden for bly har givet for lave bioopløseligheder for prøver fra 4 af de 6 grunde i undersøgelsen.

9.6 RIVM test af prøver med *in vivo* målt biotilgængelighed

Der er i denne undersøgelse foretaget ***in vitro*** test af i alt 66 jordprøver med ***in vivo*** biotilgængelighedsdata fra tidligere undersøgelser. Heraf er 49 prøver testet med metoden RIVM fastende for metaller og 17 prøver med RIVM metoden efter måltid for PAH, som tidligere beskrevet, se også Bilag A og B for metodebeskrivelser.

For bly er ikke fundet en tilfredsstillende sammenhæng imellem ***in vitro*** bioopløselighed og ***in vivo*** biotilgængelighed (non-lineær og ***in vitro*** resultater lavere end ***in vivo***). Det kan ikke afvises, at fejl i ***in vivo*** målinger (dosis afhængighed ved høj bioopløselighed) har medvirket til den ikke tilfredsstillende ***in vitro*** til ***in vivo*** sammenhæng.

For cadmium er fundet tilfredsstillende sammenhæng imellem ***in vitro*** bioopløselighed og ***in vivo*** biotilgængelighed (lineær og ***in vitro*** resultater af samme størrelsesorden som ***in vivo***).

For nikkel og PAH er ikke fundet tilstrækkeligt mange ***in vivo*** data til endeligt at vurdere ***in vitro*** til ***in vivo*** sammenhængen.

For alle undersøgelsens forureningsstoffer undtagen bly er fundet tilfredsstillende sammenhæng imellem de her benyttede ***in vitro*** metoders resultater og andre ***in vitro*** metoders resultater (lineær og ***in vitro*** resultater af samme størrelsesorden som andre metoders). For bly er fundet en lineær sammenhæng med resultater bestemt ved de fleste andre metoder, men lavere resultater med RIVM metoden i denne undersøgelse. RIVM metoden har dog givet højere ***in vitro*** resultater end andre metoder med både mave og tarm segment.

9.7 Test med andre metoder af prøver med *in vivo* målt biotilgængelighed

De 2 alternative test metoder, RIVM fastende uden tarm segment og SBRC, viste ikke forbedret lineær sammenhæng imellem ***in vitro*** resultater og ***in vivo*** resultater for cadmium. For bly viste SBRC lineær sammenhæng men med relativt høje ***in vitro*** resultater, sammenholdt med ***in vivo*** resultaterne. RIVM fastende uden tarm segment viste lineær sammenhæng og mere realistiske ***in vitro*** værdier, når resultaterne for test af jordprøver med for høj pH i testopløsningerne blev udelukket. Sikring af pH under testen kan for afvigende prøver indtil videre udføres ved at benytte en reduceret prøvemængde, men der arbejdes på at justere sammensætningen (bufferkapaciteten) af fordøjelsesvæskerne, således at dette på længere sigt ikke bliver nødvendigt. RIVM fastende uden tarm segment viste lineær sammenhæng med andre ***in vitro*** testmetoder for cadmium, men ikke for bly (kun det komplette datasæt inklusive pH afvigende prøver kunne vurderes), mens SBRC metoden netop opfyldte kravet til lineær sammenhæng for bly, men ikke for cadmium.

9.8 Anvendelse af test for bioopløselighed i risikovurdering

I Tabel 9.2 er sammenfattet den overordnede vurdering af de forskellige, afprøvede testmetoders anvendelighed til måling af de udvalgte jordforureningers bioopløselighed med henblik på anvendelse i risikovurdering på forurenede grunde. Kvantitativt anvendelige metoder er fysiologisk relevante, har udvist tilfredsstillende robusthed og lineær sammenhæng imellem testresultater og *in vivo* data for de jordprøver, der har været til rådighed for test. Kvalitativt anvendelige metoder er fysiologisk relevante, har udvist tilfredsstillende robusthed, men jordprøver med *in vivo* data har ikke været til rådighed i tilstrækkeligt omfang til at vurdere *in vitro* til *in vivo* sammenhæng. For RIVM fastende uden tarm segment gælder, at metodens anvendelighed forudsætter pH under den krævede værdi på 1.8 i testopløsningen i mave segmentet. Er dette ikke opfyldt, skal testen gentages med mindre mængde (1/10) jord. Det anførte "forbehold" betyder for SBRC, at denne test ikke er fysiologisk baseret, samt at den opnåede *in vitro* til *in vivo* tyder på en overvurdering af bly bioopløselighed fra jordprøver med denne test.

Tabel 9.2 Sammenfatning af anvendeligheden af de afprøvede testmetoder for jordforureningers bioopløselighed

	Cd	Pb	Ni	BaP	DBahA
RIVM fastende	Kvantitativt anvendelig	Ikke anvendelig	Kvalitativt anvendelig	Ikke afprøvet	
RIVM efter måltid	Ikke afprøvet	Ikke afprøvet	Ikke afprøvet	Kvalitativt anvendelig	
RIVM fastende uden tarm	Ikke anvendelig	Kvantitativt anvendelig	Ikke afprøvet	Ikke afprøvet	
SBRC	Ikke anvendelig	Kvantitativt anvendelig med forbehold	Ikke afprøvet	Ikke afprøvet	

Det vurderes dermed, at test for bioopløselighed kan udføres kvantitativt med RIVM fastende uden tarm segment for bly og med RIVM fastende for cadmium. Det skal bemærkes, at den samlede test for bioopløselighed af bly og cadmium dermed kan udføres i én samlet procedure, blot med udtag af testopløsning til kemisk analyse på forskelligt trin i testen. Det skal endvidere bemærkes, at der internationalt i regi af BARGE arbejdes med en justering af RIVM test metoden til at opfylde det anførte pH krav for et bredere udsnit af prøver, samt efterfølgende at dokumentere kvaliteten af den justerede test metode.

Det vurderes desuden, at test for bioopløselighed kun kan udføres kvalitativt for nikkel og PAH, indtil til flere jordprøver med *in vivo* data for biotilgængelighed foreligger. Bioopløseligheden af PAH i en jordprøve kan således indtil videre kun tolkes relativt, dvs. til at sige at PAH i en testet jordprøve er mere eller mindre biotilgængelig end i en anden jordprøve eller i en toksikologisk reference, men dokumentationen er ikke tilstrækkelig til at tillade en beregning af en bioopløselig koncentration til at holde op imod en kriterieværdi.

Selve bioopløseligheden, AF, beregnes som forholdet imellem mængde af stof opløst under en test, M_t , og mængden i jorden, M_j , eller doseringsreferencen, M_r , vist for beregning i en jordprøve:

$$AF_j = \frac{M_t}{M_j}$$

Den relative bioopløselighed, RAF, beregnes ud fra bioopløseligheden af forureningen i jorden, AF_j , og bioopløseligheden af forureningen i doseringsreferencen, AF_r :

$$RAF = \frac{AF_j}{AF_r}$$

De målte totalconcentrationer, C_j , og relative bioopløseligheder (RAF) benyttes til at beregne jordens indhold af bioopløselig forurening, C_{bo} , efter formlen:

$$C_{bo} = C_j \times RAF$$

På denne måde beregnes en forurenings koncentration af bioopløselig forurening baseret på den relative bioopløselighed fra jorden.

Det foreslås, at bioopløselige koncentrationer benyttes på samme måde i forhold til kriterieværdier, som totalconcentrationer benyttes i dag, fordi størrelsesordenen af usikkerheden er den samme ved de to bestemmelser.

Det vurderes, at det nu opnåede datamateriale udviser så stor variation i den relative bioopløselighed for de undersøgte forureninger, at en generel justering af kriterieværdierne ikke kan underbygges. Det anbefales derfor indtil videre at fastholde en test af jord fra den enkelte forurenede lokalitet som forudsætning for anvendelse af human bioopløselighed til vurdering i forhold til kriterieværdier. For undersøgelser på forurenede grunde benyttes i dag at sammenholde gennemsnittet af jordconcentrationer med kriteriet for forureninger med kroniske effekter, kombineret med et krav til frekvens af overskridelser og maksimal overskridelse for forureninger med akutte effekter.

Anvendelsen af test for bioopløselighed bør understøttes på 3 konkrete punkter:

- En konkret vejledning i anvendelsen af test for bioopløselighed i risikovurdering på forurenede grunde udarbejdes med udgangspunkt i dette projekts resultater og omfattende mindst forudsætninger for testanvendelse, metodeanvisning, beregninger, nødvendigt antal testede prøver og kvalitetskontrol af tests
- Anvisning af et homogent og stabilt kontrolmateriale, der skal benyttes i kvalitetskontrol af tests
- Opsamling og vurdering af testdata og kontrolldata efter 1 års anvendelse

De enkelte punkters indhold er opridset nedenfor.

I en **vejledning** bør indgå, at der med henblik på at sikre et tilstrækkeligt grundlag for beregning af den bioopløselige koncentration indtil videre mindst bør foretages test af 5 jordprøver fra hver grund eller klynge af grunde, svarende til prøvetagningen benyttet i denne afprøvning. For disse jordprøver bør den bioopløselige koncentration af forureningerne i hver enkelt jordprøve, C_{bo} , beregnes og benyttes til vurdering i forhold til kriterieværdien. Stilles der krav om analyse af flere jordprøver, kan den gennemsnitlige, relative bioopløselighed fra test af de 5 jordprøver benyttes til at omregne fra total koncentration til bioopløselig koncentration for de øvrige prøver, forudsat at forureningens karakter ikke varierer indenfor undersøgelsesområdet. I forbindelse med anvendelsen af testene foreslås det at tilvejebringe et tilstrækkeligt datamateriale til at definere, hvornår "forureningens karakter ikke varierer indenfor undersøgelsesområdet".

For at give mulighed for løbende kvalitetssikring og sammenlignelig anvendelse af testene på danske laboratorier foreslås at identificere et stabilt og homogent **kontrolmateriale**. Ved indkøb af et stabilt og homogent kontrolmateriale i stor mængde vil danske laboratorier som nævnt dels kunne medtage dette under test for at sikre sammenlignelige resultater, dels vil materialet kunne deles med internationale laboratorier, således at der kan etableres sammenlignelighed med disses testresultater og evt. kobling til resultaterne af biotilgængelighedsundersøgelser med forurennet jord i dyr.

Det foreslås tillige, at testresultater opnået i Danmark over den første periode **opsamles og vurderes** samlet, således at muligheden for implementering af generelle faktorer for bioopløselighed af udvalgte jordforureninger kan vurderes ud fra et mere omfattende datagrundlag. I den forbindelse kan ligeledes foretages en vurdering af variationen i bioopløselighed på grunde med varierende forureningskilde. Ligesom det kan afgrænses for hvilke typer af grunde og for hvilke forureninger, test for bioopløselighed vil forbedre grundlaget for risikovurderingen.

Opmærksomheden henledes på, at der er behov for forbedrede og bedre afprøvede metoder til **in vivo** undersøgelse af jordforureningers biotilgængelighed. Endvidere henledes opmærksomheden på, at forureninger med en risiko ved hudkontakt kan denne blive betydende i den samlede risikovurdering, såfremt en meget lav, målt bioopløselighed lægges til grund for vurderingen af risiko ved oralt optag. Endeligt skal bemærkes, at grundlaget for dette projekt har været kvalitets- og afskæringskriterierne, som de forelå inden implementering af Kriteriegruppens arbejde, se afsnit 3.1.

Samlet vurderes det, at den i øjeblikket bedst mulige test- og analysekvalitet er opnået, og at dette er tilstrækkeligt til anvendelsen af testmetoderne som beskrevet, kvantitativt for bly og cadmium, kvalitativt for nikkel og PAH. Det skal bemærkes, at testene ikke er afprøvede overfor flygtige stoffer (nogle kviksølvforbindelser og organiske stoffer), og ikke overfor stoffer, der påvirkes af mikroorganismerne i mave-tarmsystemet (potentielt krom- og arsenforbindelser, letnedbrydelige organiske stoffer).

10 Referencer

- /1/ Grøn, C. and Andersen, L. Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. 2003. Miljøstyrelsen.
- /2/ Ruby,MV, Davis,A, Schoof,R, Eberle,S, Sellstone,CM: Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. ***Environmental Science & Technology*** 30:422-430, 1996
- /3/ Kelley,NE, Brauning,SE, Schoof,RA, Ruby,MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. ***Journal of Hazardous Materials*** 95:331-334, 2002
- /4/ Drexler, J. The In-Vitro Method. 26-4-2005.
- /5/ Schroeder,JL, Basta,NT, Casteel,SW, Evans,T, Payton,M, Si,J: Validation of the In Vitro Gastrointestinal (IVG) Method to Estimate Relative Bioavailable Lead in Contaminated Soils. ***Journal of Environmental Quality*** 33:513-521, 2004
- /6/ Schroeder,JL, Basta,NT, Si,J, Casteel,SW, Evans,T, Payton,M: In Vitro Gastrointestinal Method to Estimate Relative Bioavailable Cadmium in Contaminated Soil. ***Environmental Science & Technology*** 37:1365-1370, 2003
- /7/ Ellickson,KM, Meeker,RJ, Gallo,MA, Buckley,B, Lioy,PJ: Oral Bioavailability of Lead and Arsenic from a NIST Standard Reference Soil Material. ***Archives of Environmental Contamination and Toxicology*** 40:128-135, 2001
- /8/ Oomen, A. G., Rompelberg, C J M, Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., and Sips, A. J. A. M. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 281-287. 2003.
- /9/ Versantvoort,CHM, Oomen,AG, van de Kamp,E, Rompelberg,CJM, Sips,AJAM: Application of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins in food. ***Food and Chemistry Toxicology*** 43:31-40, 2005
- /10/ Deutsches Institut für Normung. Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminierten Bodenmaterial. (DIN 19738). 2000. Berlin, DIN.
- /11/ van de Wiele, T., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M. R., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rompelberg, C J M, Zwart, L. de, Klinck, B. A., Wijnen, J. van, Verstraete, W., and Sips, A. J. A. M. Comparison of five *in vitro* digestion models with *in vivo* data: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. Draft manuscript . 2004.

- /12/ Oomen,AG, Hack,A, Minekus,M, Zeijdner,E, Cornelis,C, Schoeters,G, Verstraete,W, van de Wiele,T, Wragg,J, Rempelberg,CJM, Sips,AJAM, van Wijnen,JH: Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Science & Technology* 36:3326-3334, 2002
- /13/ Casteel,SW, Cowart,RP, Weis,CP, Henningsen,GM, Hoffman,E, Brattin,WJ, Guzman,RE, Starost,MF, Payne,JT, Stockham,WJ, Becker,SV, Drexler,JW, Turk, JR: Bioavailability of Lead to Juvenile Swine Dosed with Soil from the Smuggler Mountain NPL Site of Aspen, Colorado. *Fundamental and Applied Toxicology* 36:177-187, 1997
- /14/ Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., and Wilhelm, M. Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein). 2002. Bochum, Ruhr-Universität Bochums.
- /15/ Hettiarachchi,GM, Pierzynski,GM, Oehme,FW, Ryan,JA: Treatment of contaminated soil with phosphorous and manganese oxide reduces lead absorption by Sprague-Dawley rats. *Journal of Environmental Quality* 32:1335-1345, 2003
- /16/ Ruby,MV, Davis,A, Link,TE, Schoof,R, Chaney,RL, Freeman,GB, Bergstrom,PD: Development of an in Vitro Screening Test to Evaluate the in Vivo Bioaccessibility of Ingested Mine-Waste Lead. *Environmental Science & Technology* 27:2870-2877, 1993
- /17/ Maddaloni,M, Lolocono,N, Manton,W, Blum,C, Drexler,J, Graziano,J: Bioavailability of Soilborne Lead in Adults, by Stable Isotope Dilution. *Environmental Health Perspectives* 106, supplement 6:1589-1594, 1998
- /18/ Koganti,A, Spina,DA, Rozett,K, Ma,B-L, Weyand,EH, Taylor,BB, Mauro,DM: Studies on the Applicability of Biomarkers in Estimating the Systemic Bioavailability of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons from Manufactured Gas Plant Tar-Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology* 32:3104-3112, 1998
- /19/ Magee,B, Dolan,DG, Paley,DA, Weyand,EH: Benzo(a)pyrene bioavailability from residential soils. *Toxicological Sciences* 48:11, 1999
- /20/ Ruby,MV, Schoof,R, Brattin,WJ, Coldade,M, Post,G, Harnois,M, Mosby,DE, Casteel,SW, Berti,W, Carpenter,M, Edwards,D, Cragin,D, Chappell,W: Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science & Technology* 33:3697-3705, 1999
- /21/ Ryan,JA, Scheckel,KG, Berti,W, Brown,SL, Casteel,SW, Chaney,RL, Hallfrisch,J, Doolan,M, Grevatt,P, Maddaloni,M, Mosby,DE: Reducing Children's Risk from Lead in Soil. *Environmental Science & Technology* 38:18A-24A, 2004
- /22/ Henningsen, G. M., Weis, Chr. P., Casteel, S. W., Brown, S. L., Hoffman, E., Brattin, W. J., Drexler, J., and Christensen, S. Differential absorption of lead in 20 soils from superfund mine-waste sites. 15-4-1999.

- /23/ Polák, J., O'Flaherty, E. J., Freeman, G., Johnson, J. D., Liao, S. C., and Bergstrom, P. D. Evaluating Lead Bioavailability Data by Means of a Physiologically Based Lead Kinetic Model. *Fundamental and Applied Toxicology* 29, 63-70. 1996.
- /24/ Grøn, C. and Andersen, L. Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. 2003. Miljøstyrelsen.
- /25/ Miljøstyrelsen. Afskæringskriterier for forurennet jord. 425. 1998. København, Miljøstyrelsen. Miljøprojekt.
- /26/ Miljøstyrelsen. Toksikologiske kvalitetskriterier for jord og drikkevand. 12, 91. 1995. Miljøstyrelsen. Projekt om jord og grundvand.
- /27/ Miljøstyrelsen. Rådgivning af beboere i lettere forurenede områder. 2000.
- /28/ Miljøstyrelsen. Datablad vedrørende jordkvalitetskriterium for PAH forbindelser. 1999.
- /29/ Nielsen, E., Østergaard, G., Larsen, J. C., and Ladefoged, O. Principper for sundhedsmæssig vurdering af kemiske stoffer med henblik på fastsættelse af kvalitetskriterier for luft, jord og vand. 974. 2004. Miljøstyrelsen. Miljøprojekt.
- /30/ Kriteriegruppen. Særlig vurdering af bly og PAH. 2004. Miljøstyrelsen.
- /31/ Ruy,JE, Ziegler,EE, Nelson,SE, Fomon,SJ: Dietary intake of lead and blood lead concentration in early infancy. *Am.J.Dis.Child.* 137:886-891, 1983
- /32/ Sherlock,JC, Quinn,MJ: Relationship between blood lead concentrations and dietary lead intake in infants; The Glasgow Duplicate Diet Study 1979-1980. *Food Additives and Contaminants* 3:167-176, 1986
- /33/ WHO. Cadmium. In Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. 33rd meeting. World Health Organisation. WHO food additive series. 1989. Geneve.
- /34/ ECB. Risk Assessment Cadmium Oxide. <http://ecb.jrc.it/php-bin/searchv6.php#> Draft. 2003.
- /35/ Rahola T, Aran RK, Miettinen JK: Half-time studies of mercury and cadmium by whole-body counting. In Assessment of radioactive contamination in man. New York, 1972,
- /36/ Kitamura, M. Absorption and deposition of cadmium, especially in human subjects. 11, 420-445. 1972. Tokyo, Japan Public Health Association.
- /37/ Yamagata, H., Iwashima, K., and Nagai, T. Gastro-intestinal absorption of cadmium in normal humans. Japan Public Health Association. Kankyo Hoken Report No. 31 (in Japanese), 84-85. 1974.

- /38/ Flanagan,PR, McLellan,JS, Haist,J, Cherian,MF, Chamberlain,MJ, & Valberg,LS: Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74:841-846, 1978
- /39/ Shaikh ZA, Smith JC: Metabolism of orally ingested cadmium in humans. In Mechanisms of toxicity and hazard evaluation. Elsevier/North Holland, Ed. Amsterdam, 1980, p. 569-574
- /40/ Larsen, P. B. Evaluation of health hazards by exposure to nickel and estimation of quality criterion in soil. Miljøstyrelsen. 1997.
- /41/ WHO. Nickel. 108, 383. 1991. Geneve, World Health Organisation. Environmental Health Criteria.
- /42/ Sunderman, F.W.Jr., Hopfer, S. M., Sweeney, K. C., Marcus, A. H., Most, B. M., and Creason, J. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. 191(Proc. Soc. exp. Biol. Med.), 5-11. 1989.
- /43/ Solomons,MW, Vieteri,F, Shuler,TR, Nielsen,FH: Bioavailability of nickel in man: Effects of foods and chemically-defined constituents on the absorption of inorganic nickel. *Nutr.* 112:39-50, 1982
- /44/ WHO. Guidelines for drinking-water quality. Vol 2 Health criteria and other supporting information. World Health Organisation. International Programme on Chemical Safety, Geneve, 973. 1996.
- /45/ Neal, J. and Rigdon, R. H. Gastric tumours in mice fed benzo(a)pyrene: a quantitative study. Texas reports on biology and medicine. 25, 553-557. 1967.
- /46/ Neal, J. and Rigdon, R. H. Absorption and excretion of benzpyrene when fed to mice. Texas reports on biology and medicine. 22, 156-164. 1964.
- /47/ Kelley,NE, Brauning,SE, Schoof,RA, Ruby,MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. *Journal of Hazardous Materials* 95:331-334, 2002
- /48/ Deutsches Institut für Normung. Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminierten Bodenmaterial. (DIN 19738). 2000. Berlin, DIN.
- /49/ Oomen, A. G., Rempelberg, C J M, Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., and Sips, A. J. A. M. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 44, 281-287. 2003.
- /50/ Oomen, A. G. RIVM. 2003.
- /51/ Wittsiepe,J, Schrey,P, Hack,A, Selenka,F, Wilhelm,M: Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dipenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag "Kieselrot". *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203:263-273, 2001

- /52/ Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. 2002,
- /53/ Hack,A, Selenka,F: Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters* 88:199-210, 1996
- /54/ Hack,A, Selenka,F, Wilhelm,M: Mobilisierung von PAK durch synthetische Verdauungssäfte aus dem kontaminierten Bodenmaterial einer Altlastenfläche. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 3:275-280, 1998
- /55/ Rotard, W., Christmann, W., Knoth, W, and Mailahn, W. Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. UWSF-Z Umweltchem Ökotox 7, 3-9. 1995.
- /56/ Ruby,MV, Fehling,KA, Paustenbach,DJ, Landenberger,BD, Holsapple,MP: Oral Bioaccessibility of Dioxins/Furans at Low Concentrations (50-350 ppt Toxicity Equivalent) in Soil. *Environmental Science & Technology* 36:4905-4911, 2002
- /57/ Versantvoort, C. H. M., van de Kamp, E., and Rompelberg, C. J. M. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. 320102002. 2004. Bilthoven, The Netherlands, RIVM. RIVM report.
- /58/ Miljøstyrelsen. Prøvetagning og analyse af jord. 13. 1998. København, Miljøstyrelsen. Vejledninger.
- /59/ Miljø- og Energiministeriet. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v. Bekendtgørelse 637. 30-6-1997.
- /60/ Oomen,AG, Hack,A, Minekus,M, Zeijdner,E, Cornelis,C, Schoeters,G, Verstraete,W, van de Wiele,T, Wragg,J, Rompelberg,CJM, Sips,AJAM, van Wijnen,JH: Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Science & Technology* 36:3326-3334, 2002
- /61/ Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., and Wilhelm, M. Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein). 2002. Bochum, Ruhr-Universität Bochums.
- /62/ Stuckert, K. and Grøn, C. Håndbog i analysekvalitet for laboratoriebrugere. 2001-4. 2001. København, Denmark, Amternes Videncenter for Jordforurening. Teknik og Administration.
- /63/ Oomen, A. G. RIVM. 2003.
- /64/ Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. 2002,
- /65/ Green-Pedersen, H. and Andersen, K. J. Homogenisering og delprøvetagning af jordprøver til sporelementanalyse. 2002. Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for Miljøkemiske Analyser.

- /66/ ISO. Soil Quality - Pretreatment of Samples for Physico - Chemical Analysis. ISO 11464.
- /67/ Lund, U. O., Andersen, K. J., and Sørensen, P. S. Håndbog i metodevalidering for miljølaboratorier. 29-12-1994.
- /68/ Grøn, C., Asmussen, O. W., and Samsøe-Petersen, L. Human bioopløselighed af jordforureninger. 1-6-2004. Miljøstyrelsen.
- /69/ Liu, Q, Liu, Y: Distribution of Pb(II) species in aqueous solution. ***Journal of Colloid and Interface Science*** 268:266-269, 2003
- /70/ Versantvoort, C. H. M., van de Kamp, E., and Rompelberg, C. J. M. Development and applicability of an ***in vitro*** digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. 320102002. 2004. Bilthoven, The Netherlands, RIVM. RIVM report.
- /71/ Plantedirektoratet. Fælles arbejdsmetoder for jordbundsanalyser. 1994. Landbrugsministeriet.
- /72/ Hansen, H. C. B. Environmental Soil Chemistry. 1998. Royal Veterinary and Agricultural University.
- /73/ Alexander, M: How Toxic are Toxic Chemicals in Soil? ***Environmental Science & Technology*** 29:2713-2717, 1995
- /74/ Alexander, M: Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. ***Environmental Science & Technology*** 34:4259-4265, 2000
- /75/ Alexander, M. and Kottler, B. D. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environmental Pollution* 113(3), 293-298. 2001.
- /76/ Alexander, RR, Alexander, M: Bioavailability of Genotoxic Compounds in Soils. ***Environmental Science & Technology*** 34:1589-1593, 2000

Test for bioopløselighed af tungmetaller fra jord Metodebeskrivelse

1 INTRODUKTION

Test for human bioopløselighed er en test, der simulerer opløsningen af tungmetaller fra forurenede jord i menneskets mave- og tarmsystem. Testen kan benyttes til at måle den relative bioopløselighed i forhold til forud definerede referencebetingelser. Fortolkning og anvendelse af testresultater er beskrevet i tekstdelen af denne rapport, Miljøprojekt nr. XYZ, 2005 udgivet af Miljøstyrelsen.

For human bioopløselighed af organiske forureninger, f.eks. PAH, benyttes en anden version af testen, som findes i Bilag B.

2 PRINCIP

I testen behandles jorden med opløsninger, der i sammensætning svarer til menneskets spyt, mavesaft og tarmvæske. Testopløsningerne indeholder uorganiske salte, pH buffer, enzymer, lipider og andre typiske komponenter i menneskets fordøjelsvæsker.

Inden test forbehandles jorden ved tørring og sigtning, og der udtages en delprøve til kemisk analyse. Krav til analysemetode og -kvalitet er specificeret i tekstdelen til denne rapport.

Testen omfatter 3 trin:

1. jord blandes med spyt og inkuberes i 5 minutter ved 37°C under blanding.
2. efter de fem minutter tilsættes mavesaft og blandingen inkuberes 2 timer ved 37°C under blanding.
3. derefter tilsættes tarmsaft og galde, og denne blanding inkuberes 2 timer ved 37°C under opblanding.

Efter endt inkubering centrifugeres blandingen, og den ovenstående vædske tages af og analyseres.

Ved test for cadmiums og nikkels bioopløselighed benyttes alle 3 trin, ved test for bly bioopløselighed afbrydes efter trin 2.

3 UDSTYR

Nedenfor er beskrevet typer af udstyr med angivelse af mærke som eksempel.

- 3.1 Ovn, indstillet til 40°C ± 2°C
- 3.2 Sigte med 2 mm åbning fremstillet af polypropylen eller anden hård plast
- 3.3 Håndmørt af porcelæn
- 3.4 Riffle boks af rustfrit stål

- 3.5 Teflonbelagt stål spatel
- 3.6 Skvalpe til "all over" omrystning med frekvens ikke under 10 rpm¹
- 3.7 Polycarbonat testglas med polycarbonat låg.
- 3.8 Målekolber og Erlenmeyer kolber.
- 3.9 Thermostateret vandbad indstillet til 37°C ± 2°C og forsynet med timer til programmeret start indenfor 24 timer.
- 3.10 Centrifuge indstilbar til 3.000 g ± 100 g med indsætter svarende til benyttede testglas.
- 3.11 Dispensere, 1-10 mL.
- 3.12 Magnetomrører og magneter.
- 3.13 pH meter, mærke Radiometer med kombinations pH electrode.
- 3.14 Finpipetter.
- 3.15 Carlsbergpipetter
- 3.16 Analysevægt.
- 3.17 Grovvægt
- 3.18 Klimarum indstillet til 37°C ± 1°C og forsynet med thermostatreguleret varmeblæser

Udstyr er rengjort efter "metalopvaskeprocedure" med forudgående desinfektion ved maskinopvask. Dette indebærer skylning med fortyndet saltsyre (4.12.1) i 2 skyllebade og rent vand (benyttes til 3 opvaske, skiftes så), efterfulgt af tørring i varmeskab og opbevaring tildækket med låg eller aluminiumsfolie indtil brug.

4 KEMIKALIER OG OPLØSNINGER

Benyttede kemikalier er af analysekvalitet, med mindre andet er anført. Renset vand af Millipore kvalitet (Milli Q anlæg) benyttes i alle tilfælde. Fabrikat og leverandør navne er alene givet som eksempler. Mindre mængder af opløsninger med samme koncentrationer kan fremstilles ved proportional justering af mængder, og til hjælp hertil foreligger et regneark.

- 4.1 NaCl, Merck.
 - 4.1.1 Opløsning af NaCl, 350.6 g/2 L.
- 4.2 KSCN, Merck
 - 4.2.1 Opløsning af KSCN, 10 g/500 mL.
- 4.3 NaH₂PO₄, Merck.
 - 4.3.1 Opløsning af NaH₂PO₄, 88.8 g/L.
- 4.4 Na₂SO₄, vandfrit, Merck.
 - 4.4.1 Opløsning af Na₂SO₄, 28.5 g/500 mL.
- 4.5 KCl, Merck.
 - 4.5.1 Opløsning af KCl, 89.6 g/L.
- 4.6 CaCl₂ · 2H₂O, Merck.
 - 4.6.1 Opløsning af CaCl₂ · 2H₂O, 2.22 g/100 mL.
- 4.7 NH₄Cl, Merck.
 - 4.7.1 Opløsning af NH₄Cl, 1.53 g/50 mL.
- 4.8 NaHCO₃, Merck.
 - 4.8.1 Opløsning af NaHCO₃, 169.4 g/2 L.
- 4.9 KH₂PO₄, Merck.
 - 4.9.1 Opløsning af KH₂PO₄, 8 g/L.
- 4.10 MgCl₂, Merck.

¹ rpm: rotations per minute, fuldstændig opblanding af jord og testopløsning skal sikres for alle jordtyper, der testes

- 4.10.1 Opløsning af $MgCl_2$, 5 g/L.
 4.11 NaOH, Merck.
 4.11.1 Opløsning af NaOH, 2 g/50 mL.
 4.12 HCl, 37 % g/g (sg 1,18 kg/L), Merck.
 4.12.1 Opløsning af HCl, fortynd 8 mL 37% HCl til 1 L med rent vand
 4.13 Urinstof, Merck.
 4.13.1 Opløsning af urinstof, 25 g/L.
 4.14 D+ Glucose, vandfrit, Merck.
 4.14.1 Opløsning af glucose, 65 g/L.
 4.15 D-Glucuronsyre, Fluka.
 4.15.1 Opløsning af glucuronsyre, 2 g/L.
 4.16 D-Glucosaminehydrochlorid, Merck.
 4.16.1 Opløsning af glucosaminhydrochlorid, 33 g/L.
 4.17 Urinsyre, Merck.
 4.18 α -Amylase, Merck (nuværende produkt under udskiftning hos RIVM).
 4.19 Mucin, Roth, art. nr. 8494 73-95%.
 4.20 Pepsin, Merck, art. nr. K27462885 042.
 4.21 BSA (serum albumine bovine, fraktion V), Merck, art. nr. K28215718 109.
 4.22 Pancreatin, Merck, art. nr. F 1187530 245.
 4.23 Lipase, type II, crude, Sigma, art. nr. L-3126 EC 3.1.1.3 [9001-62-1].
 4.24 Galde, freeze dried bovine, Sigma, art. nr. B-3883 [8008-63-7].

Stamopløsningerne 4.1.1 til 4.16.1 fremstilles og opbevares i køleskab, $<5^{\circ}C$, i glasflasker med skruelåg. Dog skal opløsning af $CaCl_2$ (4.6.1) og NH_4Cl (4.7.1) fremstilles frisk for hver testserie. Stamopløsninger kan gemmes 3 måneder køligt, $1-5^{\circ}C$, og fremstillingsdato/-initialer anføres på flaskerne.

Der fremstilles 4 fordøjelsesvæsker: spyt, mavesyre, tarmsaft og galde. Hver vædske fremstilles ved 1:1 sammenblanding af 2 separat fremstillede opløsninger af henholdsvis organiske og uorganiske komponenter, hvorefter yderligere komponenter opløses i blandingen.

Der foretages kontrol af pH på fremstillingsdagen for opløsningerne, samt inden ibrugtagning af færdige væsker.

De 4 væsker fremstilles dagen før brug, hvorefter de placeres i koldt vandbad indstillet til opvarmning til $37^{\circ}C$ med start 2 timer før ibrugtagning den næste dag. Afvejede mængder af faste stoffer fremstilles inden sammenblanding af væskerne, f.eks. i vejebægre dækket med urglas eller lignende.

Krav til præcision af afvejringer er:

Afvejet	Variation max.
<500 mg	1 %
= 1000 mg	0,25 %
>1000 mg	0,1 %

De enkelte opløsninger fremstilles i målekolber svarende til total volumen opløsning. Kontrol af pH foretages ved ophældning af lille delmængde i pH målebæger, ikke ved neddykning af elektrode i væskerne.

4.25 Spyt, uorganisk.

Stof	Nr	mL
KCl	4.5.1	10
KSCN	4.2.1	10
NaH ₂ PO ₄	4.3.1	10
Na ₂ SO ₄	4.4.1	10
NaCl	4.1.1	1,7
NaOH	4.11.1	1,8
Vand	-	Til 500

4.26 Spyt, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	8
Vand	-	Til 500

4.27 Spyt, fordøjelsesvædske

Bland de 500 mL spyt uorganisk, 4.25, med de 500 mL spyt organisk, 4.26, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

145 mg α -amylase (4.18)

15 mg urinsyre (4.17)

50 mg mucin (4.19)

Kontroller pH til $6,5 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

4.28 Mavesaft, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	15,7
NaH ₂ PO ₄	4.3.1	3,0
KCl	4.5.1	9,2
CaCl ₂	4.6.1	18
NH ₄ Cl	4.7.1	10
Koncentreret HCl	4.12	8,3
Vand	-	Til 500

4.29 Mavesaft, organisk.

Stof	Nr.	mL
Glucose	4.14.1	10
Glucuronsyre	4.15.1	10
Urinstof	4.13.1	3,4
Glucosaminhydrochlorid	4.16.1	10
Vand	-	Til 500 mL

4.30 Mavesaft, fordøjelsesvædske

Bland de 500 mL mavesaft uorganisk, 4.28, med de 500 mL mavesaft organisk, 4.29, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer

flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

1 g BSA (4.21)
1 g pepsin (4.20)
3 g mucin (4.19)

Pepsin opløses langsomt og kræver ½ times konstant omrøring inden næste stof tilsættes.

Kontroller pH til $1,07 \pm 0,07$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

Denne opløsning vil i reglen indeholde lidt hvidt svæv.

4.31 Tarmsaft, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	40
NaHCO ₃	4.8.1	40
KH ₂ PO ₄	4.9.1	10
KCl	4.5.1	6,3
MgCl ₂	4.10.1	10
HCl konc.	4.12	0,180
Vand	-	Til 500

4.32 Tarmsaft, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	4
Vand	-	Til 500 mL

4.33 Tarmsaft, fordøjelsessvædske

Bland de 500 mL tarmsaft uorganisk, 4.31, med de 500 mL tarmsaft organisk, 4.32, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

9 mL CaCl₂ (4.6.1)
1 g BSA (4.21)
3 g pancreatin (4.22)
0,5 g lipase (4.23)

Kontroller pH til $7,8 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12). Denne fordøjelsessvædske vil ofte indeholde en smule hvidt svæv.

4.34 Galde, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	30
NaHCO ₃	4.8.1	68,3

Stof	Nr	mL
KCl	4.5.1	4,1
HCl konc.	4.12	0,150
Vand	-	Til 500

4.35 Galde, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	10
Vand	-	Til 500 mL

4.36 Galde, fordøjelsvædske

Bland de 500 mL galde uorganisk, 4.34, med de 500 mL galde organisk, 4.35, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

10 mL CaCl₂ (4.6.1)
 1,8 g BSA (4.21)
 6 g galde (4.24)

Kontroller pH til $8,0 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

Denne opløsning er grøn og uklar, men indeholder ikke synlige partikler. Opløsningen må ikke være brun, men skal så genfremstilles.

5 KEMISKE ANALYSER

Testopløsninger analyseres for tungmetaller efter 10 x fortynding med 0,1 M HNO₃ uden opbevaring ved ICP-MS og med beregning efter standardaddition. Mindste krav til analysekvalitet er anført i hovedrapportens tekstdel.

Prøver opbevares indtil fortynding køligt (1-4°C) i højst 2 døgn.

6 FREMGANGSMÅDER

Repræsentative jordprøver udtages i "slytøjsglas" eller tilsvarende, der fyldes helt og opbevares køligt (1-4°C) ikke længere end 1 uge.

6.1 Forbehandling af jordprøver

Inden test foretages følgende forbehandling af jordprøver:

- tørring af mindst 250 g vejet jord i ovn ved 40° til konstant (<5% ændring i vægttab per 24 timer) vægt (start- og slutvægt noteres)
- manuel frasortering af sten, grene m.v. over 2 mm
- forsigtig knusning af jordaggregater, evt. i håndmørtter (porcelæn)
- manuel frasortering af evt tilbageværende sten over 2 mm
- sigtning til < 2mm
- eventuelt gentagelse af knusning og sigtning, hvis jordaggregater kan ses

- homogenisering af sigtet prøve ved omrøring
- udtagning af repræsentativ delprøve til test af tør, sigtet og homogeniseret prøve
- vejning af samlede frasorterede fraktioner

Der benyttes sigter af hård plast, teflonbelagte skeer, samt riffle box af rustfrit stål.

Der udtages altid 50 g tørret, sigtet og homogeniseret prøve i glasbeholder med skruelåg til analyse for indhold af tungmetaller (DS 259/ICP-MS).

Til test og til total analyse benyttes altså fraktionen under 2 mm. Det endelige resultat korrigeres til oprindelig tørvægt ud fra vejtal for tør total prøve og tør frasorteret fraktion.

Denne fremgangsmåde bør ikke benyttes, såfremt flygtige stoffer (kviksølv) skal testes, og ikke, såfremt den udtagne jord er vandmættet og kan være anaerob.

6.2 Opsætning

Hvis der alene skal testes for cadmium og nikkel, foretages 1 opsætning, som føres igennem hele proceduren. Hvis der skal testes for bly, foretages 1 opsætning, som stoppes efter mavesegmentet.

I hver serie opsættes 2 blindprøver (tomme glas igennem hele proceduren), samt 1 dobbelttest for hvert prøvetagningssted og en jordkontrolprøve. Tillige opsættes dobbelttest af doseringsreference i hver serie, hvor testkoncentrationen bliver 5 x kriterieværdien. Der skal benyttes letopløselige metalsalte til fremstilling af doseringsreferencer, som f.eks. angivet nedenfor.

	Bly	Cadmium	Nikkel
Doseringsreference	Blynitrat, $Pb(NO_3)_2$, i vand	Cadmiumnitrat, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, i vand	Nikkelnitrat, $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, i vand
Koncentration	250 mg Pb/L	30 mg Cd/L	180 mg Ni/L
Tilsætning	0,500 mL	0,500 mL	0,500 mL

6.3 Test

Dag 1

Sæt skvalpen i klimarum og kontroller temperaturen til $37 \pm 2^\circ C$.

Fremstil fordøjelsvæsker og sæt dem i vandbad med koldt vand. Indstil vandbadet til at starte opvarmning til $37 \pm 0.5^\circ C$ 2 timer før påtænkt ibrugtagning af væskerne på den efterfølgende dag 2. Sæt de færdige fordøjelsvæsker, spyt, mavesaft, tarmsaft og galde, i vandbadet.

Dag 2

Bland 9 mL spyt, 13,5 mL mavesaft, 27 mL tarmsaft og 9 mL galde i testglas og kontrollér, at $pH > 5,0$. Hvis dette ikke er tilfældet, fremstilles ny fordøjelsvæsker.

Afvej 0,6 g af jord i testglas, således at alle glas klargøres og sættes op i stativ. Sæt glassene op således, at der startes med blindprøver og prøver med lave koncentrationer og derefter fortsættes efter forventet koncentration.

Tilsæt med dispenser 9 mL spyt til hvert glas, luk glasset og ryst 5 minutter. Under brug af dispenser er flasken med fordøjelsvædske placeret på magnetomrører med magnet i for at holde evt. svæv i suspension. Typisk arbejdes med serier på 25 tests, hvilket giver en passende arbejdsgang.

Tilsæt med dispenser (omrøring) 13,5 mL mavesaft til hvert glas, luk glasset, anbring i skvalpe i klimarum og bland i 2 timer.

Mål og noter i hvert glas pH (pH meter kalibreret ved pH 4 og 7), idet pH elektroden omhyggeligt skylles med rent vand i sprøjteflaske og aftørres med et nyt og rent stykke linse papir imellem neddykning i hvert testglas. pH vil være omkring 1,7, men skal være under 1,8. Hvis dette ikke er tilfældet, kan testen ikke benyttes i standardudformning, men skal gentages med 0.06 g jord afvejet til test og i øvrigt procedure som beskrevet i denne analysemetode.

Ved test for bly stoppes testen her med centrifugering som beskrevet nedenfor.

Tilsæt med dispenser (omrøring) 27 mL tarmsaft og 9 mL galde til hvert glas (gennemfør med én fordøjelsvæske ad gangen for hele serien), luk glasset, anbring i skvalpe i klimarum og bland i 2 timer.

Centrifuger testglas 5 minutter ved 2500-3000 g, og overfør derefter forsigtigt den ovenstående væske til prøveglas. Til tungmetaller overføres mindst 20 mL til metalvaskede polypropylen beholdere.

Mål og noter i hvert glas med rest pH (pH meter kalibreret ved pH 4 og 7), idet pH elektroden omhyggeligt skylles med rent vand i sprøjteflaske og aftørres med et nyt og rent stykke linse papir imellem neddykning i hvert testglas. pH vil være omkring 6,4, men skal være over 5,5 og under 7,0. Hvis dette ikke er tilfældet, kan testen ikke benyttes i standardudformning, men skal gentages med 0.06 g jord afvejet til test og i øvrigt procedure som beskrevet i denne analysemetode.

6.4 Kvalitetskontrol

Som kvalitetskontrol benyttes dobbelttest af blind i hver serie, 1 dobbelttest fra hvert prøvetagningssted, dobbelttest af doseringsreference i hver serie, samt som jordkontrolprøve mindst 1 test af en stabil og homogen jordkontrolprøve som f.eks. det certificerede kontrolmateriale NIST 2711, se hovedrapportens afsnit 4.3. Resultater af blindtest databehandles i X- og R-kort, af dobbelttest i r-kort, af doseringsreferencer i X- og R-kort og af jordkontrol i X-kort.

Fra blindtest fås detektionsgrænse og dobbelttest fås præcision på test af jordprøver (indenfor serien) og for doseringsreferencer fås en løbende kontrol af genfindning i forhold til erfaringsværdi samt en kontrol af erfaringsmæssig præcision. Fra test af jordkontrol fås kontrol af genfindning i test af jord, samt af præcision på test af jordprøver (imellem serier).

Bemærk dog, at for tungmetaller vil blindprøver i reglen give resultater under analysedetekteringsgrænsen, således at test detekteringsgrænse skal estimeres fra metodeindkøring.

Kontrolkort og kontrolgrænser opstilles efter indkøring og afprøvning af metoden.

6.5 Beregning

Der opnås følgende analyseresultater:

Koncentration C_j i jord i mg/kg tørstof

Koncentration C_{ti} i testopløsning i mg/L testopløsning

Koncentration C_{bi} i blindtestopløsning i mg/L testopløsning

Koncentration C_{ri} i doseringsreferenceopløsning i mg/L testopløsning

Hvor der er udført dobbelttests udregnes gennemsnit og benyttes videre.

Følgende størrelser kendes:

Afvejet mængde jord, m_j i g

Tørstofindhold af jord, dw_j i %

Volumen testopløsning 0,0585 L

Tilsat mængde forurening i doseringsreference, m_r i mg

Fraktionen af bioopløselig forurening i jorden, AF_j , beregnes som:

$$AF_j = ((C_t - C_b) * 0,0585) / (C_j * m_j / 1000)$$

Fraktionen af bioopløselig forurening i doseringsreference, RA_r , beregnes som:

$$RA_r = ((C_r - C_b) * 0,0585) / m_r$$

Den relative bioopløselighed af jordens forureninger, RAF , beregnes som forholdet imellem den bioopløselige fraktion i jorden og i doseringsreferencen:

$$RAF = AF_j / RA_r$$

For cadmium benyttes en beregnet referencebioopløselighed, se hovedrapportens afsnit 5.3.

Test for bioopløselighed af PAH fra jord Metodebeskrivelse

1 INTRODUKTION

Test for human bioopløselighed er en test, der simulerer opløsningen af ikke flygtige PAH fra forurenet jord i menneskets mave- og tarmsystem efter indtagelse af et måltid. Testen kan benyttes til at måle den relative bioopløselighed i forhold til forud definerede referencebetingelser. Fortolkning og anvendelse af testresultater er beskrevet i tekstdelen af denne rapport, Miljøprojekt nr. XYZ, 2005 udgivet af Miljøstyrelsen.

For human bioopløselighed af tungmetaller benyttes en anden version af testen, som findes i Bilag A.

2 PRINCIP

I testen behandles jorden med opløsninger, der i sammensætning svarer til menneskets spyt, mavesaft og tarmvæske. Testopløsningerne indeholder uorganiske salte, pH buffer, enzymer, lipider og andre typiske komponenter i menneskets fordøjelsvæsker. Som første del af testen tilsættes babymad, der simulerer fødeindtag sammen med jorden.

Inden test forbehandles jorden ved tørring og sigtning, og der udtages en delprøve til kemisk analyse. Krav til analysemetode og -kvalitet er specificeret i tekstdelen til denne rapport.

Testen omfatter 3 trin:

1. jord blandes med føde og spyt, og inkuberes i 5 minutter ved 37°C under blanding.
2. efter de fem minutter tilsættes mavesaft og blandingen inkuberes 2 timer ved 37°C under blanding.
3. derefter tilsætte tarmsaft, galde og bicarbonatopløsning, og denne blanding inkuberes 2 timer ved 37°C under opblanding.

Efter end inkubering centrifugeres blandingen, og den ovenstående vædske tages af og analyseres.

Ved test for PAH benyttes alle 3 trin.

3 UDSTYR

Nedenfor er beskrevet typer af udstyr med angivelse af mærke som eksempel.

- 3.1 Ovn, indstillet til 40°C ± 2°C
- 3.2 Sigte med 2 mm åbning fremstillet af polypropylen eller anden hård plast
- 3.3 Håndmorter af porcelæn
- 3.4 Riffle boks af rustfrit stål

- 3.5 Teflonbelagt stål spatel
- 3.6 Skvalpe til "all over" omrystning med frekvens ikke under 10 rpm¹,
- 3.7 Polycarbonat testglas med polycarbonat låg.
- 3.8 Målekolber og Erlenmeyer kolber.
- 3.9 Thermostateret vandbad indstillet til 37°C ± 2°C og forsynet med timer til programmeret start indenfor 24 timer.
- 3.10 Centrifuge indstilbar til 3.000 g ± 100 g med indsats svarende til benyttede testglas.
- 3.11 Dispensere, 1-10 mL.
- 3.12 Magnetomrører og magneter.
- 3.13 pH meter med kombinations pH electrode.
- 3.14 Finpipetter med pipettespidser,
- 3.15 Carlsbergpipetter
- 3.16 Analysevægt, 0,1 –1000 mg ± 0,1 mg.
- 3.17 Grovvægt
- 3.18 Klimarum indstillet til 37°C ± 1°C og forsynet med thermostatreguleret varmeblæser

Udstyr er rengjort efter "metalopvaskeprocedure" med forudgående desinfektion ved maskinopvask. Dette indebærer skylning med fortyndet saltsyre (4.12.1) i 2 skyllebade og rent vand (benyttes til 3 opvaske, skiftes så), efterfulgt af tørring i varmeskab og opbevaring tildækket med låg eller aluminiumsfolie indtil brug.

4 KEMIKALIER OG OPLØSNINGER

Benyttede kemikalier er af analysekvalitet, med mindre andet er anført. Renset vand af Millipore kvalitet (Milli Q anlæg) benyttes i alle tilfælde. Fabrikat og leverandør navne er alene givet som eksempler. Mindre mængder af opløsninger med samme koncentrationer kan fremstilles ved proportional justering af mængder, og til hjælp hertil foreligger et regneark.

- 4.1 NaCl, Merck.
 - 4.1.1 Opløsning af NaCl, 350.6 g/2 L.
- 4.2 KSCN, Merck
 - 4.2.1 Opløsning af KSCN, 10 g/500 mL.
- 4.3 NaH₂PO₄, Merck.
 - 4.3.1 Opløsning af NaH₂PO₄, 88.8 g/L.
- 4.4 Na₂SO₄, vandfrit, Merck.
 - 4.4.1 Opløsning af Na₂SO₄, 28.5 g/500 mL.
- 4.5 KCl, Merck.
 - 4.5.1 Opløsning af KCl, 89.6 g/L.
- 4.6 CaCl₂ · 2H₂O, Merck.
 - 4.6.1 Opløsning af CaCl₂ · 2H₂O, 2.22 g/100 mL.
- 4.7 NH₄Cl, Merck.
 - 4.7.1 Opløsning af NH₄Cl, 1.53 g/50 mL.
- 4.8 NaHCO₃, Merck.
 - 4.8.1 Opløsning af NaHCO₃, 169.4 g/2 L.
- 4.9 KH₂PO₄, Merck.
 - 4.9.1 Opløsning af KH₂PO₄, 8 g/L.
- 4.10 MgCl₂, Merck.

¹ rpm: rotations per minute, fuldstændig opblanding af jord og testopløsning skal sikres for alle jordtyper, der testes

- 4.10.1 Opløsning af $MgCl_2$, 5 g/L.
 4.11 NaOH, Merck.
 4.11.1 Opløsning af NaOH, 2 g/50 mL.
 4.12 HCl, 37 % g/g (sg 1,18 kg/L), Merck.
 4.12.1 Opløsning af HCl, fortynd 8 mL 37% HCl til 1 L med rent vand
 4.13 Urinstof, Merck.
 4.13.1 Opløsning af urinstof, 25 g/L.
 4.14 D+ Glucose, vandfrit, Merck.
 4.14.1 Opløsning af glucose, 65 g/L.
 4.15 D-Glucuronsyre, Fluka.
 4.15.1 Opløsning af glucuronsyre, 2 g/L.
 4.16 D-Glucosaminehydrochlorid, Merck.
 4.16.1 Opløsning af glucosaminhydrochlorid, 33 g/L.
 4.17 Urinsyre, Merck.
 4.18 α -Amylase, Merck (nuværende produkt under udskiftning hos RIVM).
 4.19 Mucin, Roth, art. nr. 8494 73-95%.
 4.20 Pepsin, Merck, art. nr. K27462885 042.
 4.21 BSA (serum albumine bovine, fraktion V), Merck, art. nr. K28215718 109.
 4.22 Pancreatin, Merck, art. nr. F 1187530 245.
 4.23 Lipase, type II, crude, Sigma, art. nr. L-3126 EC 3.1.1.3 [9001-62-1].
 4.24 Galde, freeze dried bovine, Sigma, art. nr. B-3883 [8008-63-7].
 4.25 Babymad, kyllingeret med kartoffelmos, Nestlé, holdbarhed til 27-08-05, 200 g, per 100 g 80 kcal, 3,5 g protein, 8,5 g kulhydrat og 3,5 g fedt²

Stamopløsningerne 4.1.1 til 4.16.1 fremstilles og opbevares i køleskab, $<5^{\circ}C$, i glasflasker med skruelåg. Dog skal opløsning af $CaCl_2$ (4.6.1) og NH_4Cl (4.7.1) fremstilles frisk for hver testserie. Stamopløsninger kan gemmes 3 måneder køligt, $1-5^{\circ}C$, og fremstillingsdato/-initialer anføres på flaskerne.

Der fremstilles 4 fordøjelsvædske: spyt, mavesyre, tarmsaft og galde. Hver vædske fremstilles ved 1:1 sammenblanding af 2 separat fremstillede opløsninger af henholdsvis organiske og uorganiske komponenter, hvorefter yderligere komponenter opløses i blandingen.

Der foretages kontrol af pH på fremstillingsdagen for opløsningerne, samt inden ibrugtagning af færdige vædske.

De 4 vædske fremstilles dagen før brug, hvorefter de placeres i koldt vandbad indstillet til opvarmning til $37^{\circ}C$ med start 2 timer før ibrugtagning den næste dag. Afvejede mængder af faste stoffer fremstilles inden sammenblanding af væskerne, f.eks. i vejebægre dækket med urglas eller lignende.

Krav til præcision af afvejringer er:

Afvejet	Variation max.
<500 mg	1 %
= 1000 mg	0,25 %
>1000 mg	0,1 %

² Før første test undersøges, om babymaden er homogen og findelt, hvis ikke blendes inden brug.

De enkelte opløsninger fremstilles i målekolber svarende til total volumen opløsning. Kontrol af pH foretages ved ophældning af lille delmængde i pH målebæger, ikke ved neddykning af elektrode i vædskerne.

4.26 Spyt, uorganisk.

Stof	Nr	mL
KCl	4.5.1	10
KSCN	4.2.1	10
NaH ₂ PO ₄	4.3.1	10
Na ₂ SO ₄	4.4.1	10
NaCl	4.1.1	1,7
NaHCO ₃	4.8.1	20
Vand	-	Til 500

4.27 Spyt, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	8
Vand	-	Til 500

4.28 Spyt, fordøjelsvædske

Bland de 500 mL spyt uorganisk, 4.25, med de 500 mL spyt organisk, 4.26, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

290 mg α -amylase (4.18)
 15 mg urinsyre (4.17)
 25 mg mucin (4.19)

Kontroller pH til $6,8 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

4.29 Mavesaft, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	15,7
NaH ₂ PO ₄	4.3.1	3,0
KCl	4.5.1	9,2
CaCl ₂	4.6.1	18
NH ₄ Cl	4.7.1	10
Koncentreret HCl	4.12	6,5
Vand	-	Til 500

4.30 Mavesaft, organisk.

Stof	Nr.	mL
Glucose	4.14.1	10
Glucuronsyre	4.15.1	10
Urinstof	4.13.1	3,4
Glucosaminhydrochlorid	4.16.1	10

Stof	Nr.	mL
Vand	-	Til 500 mL

4.31 Mavesaft, fordøjelsesvædske

Bland de 500 mL mavesaft uorganisk, 4.28, med de 500 mL mavesaft organisk, 4.29, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

1 g BSA (4.21)
 2,5 g pepsin (4.20)
 3 g mucin (4.19)

Pepsin opløses langsomt og kræver ½ times konstant omrøring inden næste stof tilsættes.

Kontroller pH til $1,30 \pm 0,02$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

Denne opløsning vil i reglen indeholde lidt hvidt svæv.

4.32 Tarmsaft, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	40
NaHCO ₃	4.8.1	40
KH ₂ PO ₄	4.9.1	10
KCl	4.5.1	6,3
MgCl ₂	4.10.1	10
HCl konc.	4.12	0,180
Vand	-	Til 500

4.33 Tarmsaft, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	4
Vand	-	Til 500 mL

4.34 Tarmsaft, fordøjelsesvædske

Bland de 500 mL tarmsaft uorganisk, 4.31, med de 500 mL tarmsaft organisk, 4.32, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

9 mL CaCl₂ (4.6.1)
 1 g BSA (4.21)
 9 g pancreatin (4.22)
 1,5 g lipase (4.23)

Kontroller pH til $8,1 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12). Denne fordøjelsvædske vil ofte indeholde en smule hvidt svæv.

4.35 Galde, uorganisk.

Stof	Nr	mL
NaCl	4.1.1	30
NaHCO ₃	4.8.1	68,3
KCl	4.5.1	4,1
HCl konc.	4.12	0,150
Vand	-	Til 500

4.36 Galde, organisk.

Stof	Nr.	mL
Urinstof	4.13.1	10
Vand	-	Til 500 mL

4.37 Galde, fordøjelsvædske

Bland de 500 mL galde uorganisk, 4.34, med de 500 mL galde organisk, 4.35, i 1 L glasflaske med skruelåg og forsynet med magnet. Placer flasken på magnetomrører og tilsæt følgende, idet opløsning af hvert enkelt stof afventes, inden næste stof tilsættes.

10 mL CaCl₂ (4.6.1)
 1,8 g BSA (4.21)
 30 g galde (4.24)

Kontroller pH til $8,2 \pm 0,2$. Justér om nødvendigt ved tilsætning af fortyndet NaOH (4.11.1) eller koncentreret HCl (4.12).

Denne opløsning er grøn og uklar, men indeholder ikke synlige partikler. Opløsningen må ikke være brun, men skal så genfremstilles.

5 KEMISKE ANALYSER

Testopløsninger analyseres for PAH ved væske/væske ekstraktion (dråber af methanol kan tilsættes for at bryde emulsion) med dichlormethan, oprensning på fastfasekolonne efterfulgt af GC-MS og med isotopmærkede PAH som intern standard og kalibrering overfor ekstern standardkurve udført med spikede prøver af fordøjelsvæske. Hele mængden af testopløsning inklusive eventuelle fedtperler skal medtages i ekstraktionen. Mindste krav til analysekvalitet er anført i hovedrapportens tekstdel kapitel 4.

For prøver til analyse for PAH skal analysen igangsættes straks efter ved testen ved tilsætning af ekstraktionsmiddel, mens ekstraktionen skal foretages den efterfølgende dag. Prøver opbevares under alle omstændigheder køligt (1-4°C). Hvis opbevaring er nødvendig, tilsættes intern standard, hvorefter prøverne nedfryses.

6 FREMGANGSMÅDER

Repræsentative jordprøver udtages i ”slytetøjsglas” eller tilsvarende, der fyldes helt og opbevares køligt (1-4°C) ikke længere end 1 uge.

6.1 Forbehandling af jordprøver

Inden test foretages følgende forbehandling af jordprøver:

- tørring af mindst 250 g vejet jord i ovn ved 40° til konstant (<5% ændring i vægttab per 24 timer) vægt (start- og slutvægt noteres)
- manuel frasortering af sten, grene m.v. over 2 mm
- forsigtig knusning af jordaggregater, evt. i håndmorter (porcelæn)
- manuel frasortering af evt tilbageværende sten over 2 mm
- sigtning til < 2mm
- eventuelt gentagelse af knusning og sigtning, hvis jordaggregater kan ses
- homogenisering af sigtet prøve ved omrøring
- udtagning af repræsentativ delprøve til test af tør, sigtet og homogeniseret prøve
- vejning af samlede frasorterede fraktioner

Der benyttes sigter af hård plast, teflonbelagte skeer, samt riffle box af rustfrit stål.

Der udtages altid 50 g tørret, sigtet og homogeniseret prøve i glasbeholder med skruelåg til analyse for indhold af PAH (ekstraktion/GC-MS).

Til test og til total analyse benyttes altså fraktionen under 2 mm. Det endelige resultat korrigeres til oprindelig tørvægt ud fra vejetal for tør total prøve og tør frasorteret fraktion.

Denne fremgangsmåde bør ikke benyttes, såfremt flygtige stoffer (mange organiske forureninger herunder mindre PAH) skal testes.

6.2 Opsætning

I hver serie opsættes 2 blindprøver (tomme glas igennem hele proceduren), samt 1 dobbelttest for hvert prøvetagningssted og en jordkontrolprøve. Tillige opsættes dobbelttest af doseringsreference i hver serie, hvor testkoncentrationen bliver 5 x kriterieværdien. Der skal benyttes PAH opløst i acetone til fremstilling af doseringsreferencer, som f.eks. angivet nedenfor.

	Benzo(a)pyren og dibenz(a,h)anthracen
Doseringsreference	Benzo(a)pyren og dibenz(a,h) anthracen opløst i acetone
Koncentration	1 mg/L
Tilsætning	0,200 mL

6.3 Test

Dag 1

Sæt skvalpen i klimarum og kontroller temperaturen til $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Fremstil fordøjelsesvædske og sæt dem i vandbad med koldt vand. Indstil vandbadet til at starte opvarmning til $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 2 timer før påtænkt ibrugtagning af vædskerne på den efterfølgende dag 2. Sæt de færdige fordøjelsesvædske, spyt, mavesaft, tarmsaft og galde, i vandbadet.

Dag 2

Bland 6 mL spyt, 12 mL mavesaft, 12 mL tarmsaft, 6 mL galde og 2 mL NaHCO_3 (4.8.1) i testglas og kontrollér, at $\text{pH} > 5,0$. Hvis dette ikke er tilfældet, fremstilles ny fordøjelsesvædske. Bestem tørstof af føde i triplikat.

Afvej 0,4 g af jord og 4,5 g føde (vådt afvejet) i testglas, således at alle glas klargøres og sættes op i stativ. Sæt glassene op således, at der startes med blindprøver og prøver med lave koncentrationer og derefter fortsættes efter forventet koncentration.

Tilsæt med dispenser 6 mL spyt til hvert glas, luk glasset og ryst 5 minutter. Under brug af dispenser er flasken med fordøjelsesvædske placeret på magnetomrører med magnet i for at holde evt. svæv i suspension. Typisk arbejdes med serier på 25 tests, hvilket giver en passende arbejdsgang.

Tilsæt med dispenser (omrøring) 12 mL mavesaft til hvert glas, luk glasset, anbring i skvalpe i klimarum og bland i 2 timer.

Mål og noter i hvert glas pH (pH meter kalibreret ved pH 4 og 7), idet pH elektroden omhyggeligt skylles med rent vand i sprøjteflaske og aftørres med et nyt og rent stykke linse papir imellem neddykning i hvert testglas. pH vil være omkring 2,2, men må ikke være ikke under 2,0 og ikke over 2,5. Hvis dette ikke er tilfældet, kan testen ikke benyttes i standardudformning.

Tilsæt med dispenser (omrøring) 12 mL tarmsaft, 6 mL galde og 2 mL NaHCO_3 (4.8.1) til hvert glas (gennemfør med én fordøjelsesvædske ad gangen for hele serien), luk glasset, anbring i skvalpe i klimarum og bland i 2 timer.

Centrifuger testglas 5 minutter ved 2.500-3.000 g, og overfør derefter forsigtigt den ovenstående vædske til prøveglas. Til PAH overføres mindst 30 mL til organisk vaskede glasbeholdere med skruelåg og teflonindlæg.

Overførslen foretages ved først at udtage med udglødet Pasteur pipette med ny eller sikkert ren bold (for hver serie) overfladen af vædske med evt. fedtperler og overføre til prøvebeholdere. Dette gøres nogle gange, herunder skylles siderne af glasset grundigt med vædske (uden at forstyrre bundfaldet), og Pasteur pipetten renses grundigt ved til sidst at skylle pipetten grundigt ved at suge frem og tilbage med lidt vædske fra glasset.

Mål og noter i hvert glas med rest pH (pH meter kalibreret ved pH 4 og 7), idet pH elektroden omhyggeligt skylles med rent vand i sprøjteflaske og aftørres med et nyt og rent stykke linse papir imellem neddykning i hvert testglas. pH vil være omkring 7,0, men skal være over 6,8 og under 7,2. Hvis dette ikke er tilfældet, kan testen ikke benyttes i standardudformning.

6.4 Kvalitetskontrol

Som kvalitetskontrol benyttes dobbelttest af blind i hver serie, 1 dobbelttest fra hvert prøvetagningssted, dobbelttest af doseringsreference i hver serie, samt som jordkontrolprøve mindst 1 test af et internt eller eksternt fremstillet, homogent og stabilt kontrolmateriale. Resultater af blindtest databehandles i X- og R-kort, af dobbelttest i r-kort, af doseringsreferencer i X- og R-kort og af jordkontrol i X-kort.

Fra blindtest fås detektionsgrænse, fra dobbelttest fås præcision (indenfor serier) på test af jordprøver og fra doseringsreferencer fås en løbende kontrol af genfinding i forhold til erfaringsværdi samt en kontrol af erfaringsmæssig præcision. Fra test af kontrolmateriale fås kontrol af genfinding i test af jord, samt af præcision på test af jordprøver (imellem serier).

Bemærk dog, at for PAH vil blindprøver i reglen give resultater under analysedetektionsgrænsen, således at test detektionsgrænse skal estimeres fra metodeindkøring.

Kontrollkort og kontrolgrænser opstilles efter indkøring og afprøvning af metoden.

6.5 Beregning

Der opnås følgende analyseresultater:

Koncentration C_j i jord i mg/kg tørstof
Koncentration C_{ti} i testopløsning i mg/L testopløsning
Koncentration C_{bi} i blindtestopløsning i mg/L testopløsning
Koncentration C_{ri} i doseringsreferenceopløsning i mg/L testopløsning

Hvor der er udført dobbelttests udregnes gennemsnit og benyttes videre.

Følgende størrelser kendes:

Afvejet mængde jord, m_j i g
Tørstofindhold af jord, dw_j i %
Volumen testopløsning 0,038 L (skal justeres for vandindhold i føde, måles)
Tilsat mængde forurening i doseringsreference, m_r i mg

Fraktionen af bioopløselig forurening i jorden, AF_j , beregnes som:

$$AF_j = ((C_t - C_b) * 0,038) / (C_j * m_j / 1000)$$

Fraktionen af bioopløselig forurening i doseringsreference, RA_r , beregnes som:

$$RA_r = ((C_r - C_b) * 0,038) / m_r$$

Den relative bioopløselighed af jordens forureninger, RAF , beregnes som forholdet imellem den bioopløselige fraktion i jorden og i doseringsreferencen:

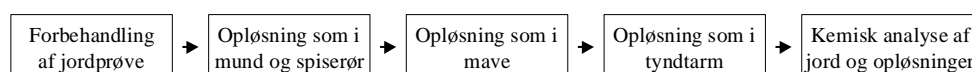
$$RAF = AF_j / RA_r$$

Betingelser i biopløselighedstest

I udformningen af en testmetode for human biopløselighed af jordforureninger til brug i risikovurdering har de fleste metoder taget udgangspunkt i ønsket om at efterligne forholdene i menneskets mave-tarmsystem: ønsket om en test, der kan forklares og begrundes, se kapitel 9 i hovedrapporten. I udviklingen af metoderne er dette ønske fastholdt for nogle metoder (RIVM, DIN), mens hensynet til en enkel, robust og relevant (korrelation med biotilgængelighed som målt *in vivo* i forsøgsdyr) test har haft større vægt for andre metoder (først og fremmest SBRC). Erfaringen har vist, at det her er nødvendigt at foretage en prioritering af de forskellige hensyn, idet ikke alle hensyn kan opfyldes samtidig, se f.eks.: /1/.

Principperne i test for biopløselighed er vist i Figur C. 1.

Figur C. 1 Principskitse for test for biopløselighed



I dette bilag er samlet en række tekniske detaljer, som er indgået i valget af testbetingelser, som det er beskrevet i hovedrapportens kapitel 4, se også hovedrapportens afsnit 2.1 for beskrivelse af de omtalte metoder.

Fordøjelsessegmenter

I metodevalget er medtagne segmenter af fordøjelsessystemet og deres kompleksitet i sammensætningen af fordøjelsesvæskerne første element.

For bly og arsen benyttes nu i USA mest den meget simple SBRC test med kun mave segment og kun tilsætning af saltsyre og aminosyren glycin, og denne simple test er valideret i forhold til optag af bly og arsen i US EPA's valgte type af forsøgsdyr, unge svin /2;3/. SBRC testen omfattende kun mave segmentet anbefales ligeledes til test for biopløselighed af cadmium og nikkel i jord, mens det for chrom og kviksølv anbefales at inddrage det mere komplicerede tarm segment /4/. Det anføres, at der for bly er vist god sammenhæng imellem biopløselighed i denne tests simple mave segment og biotilgængelighed i dyreforsøgene, samt at der for arsen er en enkelt undersøgelse med en sådan god sammenhæng.

Det er vist, at test for biopløselighed af bly fra jord med et simpelt mave segment gav næsten 10 gange højere biopløselighed end med kombineret mave- og tarm segment /5/. Tendensen til lavere biopløselighed for bly med tarm segmentet inkluderet blev mindre ved tilsætning af mælkepulver som simulering af føde i testen, nu cirka 2/3 af biopløseligheden i det simple mave segment /5/.

Til test af PAH biopløselighed fra jord er foreslået kun at benytte opløsning svarende til forholdene i tyndtarmen med 4 timers testtid og under

anvendelse af phosphatbuffer, natriumchlorid, svinegalde og mælkepulver, men resultaterne er ikke offentliggjort /6/. Samme forskergruppe har dog efterfølgende til test af dioxiners bioopløselighed fra jord benyttet en test med både et mave- og et tarm segment, der i udførelse er tæt på RIVM metoden og med en mere kompliceret sammensætning af testopløsningerne /7/. For én jord er opløseligheden af PAH vist at blive 7½ gang højere ved kombination af mave- og tarm segment, sammenlignet med opløsning kun i mave segmentet /8/.

Som eksempel på vigtigheden af test opløsningernes sammensætning kan nævnes, at en undersøgelse af dioxiners bioopløselighed har vist en 50 – 100 gange mindre opløsning af disse organiske forureninger med en simpel testopløsning med sammensætning langt fra det fysiologisk korrekte, sammenlignet med opløsningen ved en mere kompliceret sammensætning /9/.

Separat analyse af testopløsning efter mave segmentet og efter tarm segmentet kan benyttes til at vurdere, i hvilken del af mave-tarmsystemet opløsning af forureninger sker. Særligt for tungmetaller som bly, der primært opløses i mave segmentets syre og potentielt udfældes i det efterfølgende, mindre sure tarm segment, kan resultatet efter mave segmentet betragtes som worst case. Det skal imidlertid bemærkes, at absorption af tungmetaller generelt antages at finde sted i tyndtarmen og ikke i maven /10/. I præsentationen af RIVM metoden angives da også, at bly primært optages i tyndtarmen, hvorfor vurdering af bioopløselighed af bly fra jord bør foregå efter tarm segmentet /11/.

Fordøjelsessegmenter og testbetingelser for de tre hyppigt benyttede, se afsnit 2.1.4 og kapitel 4 i hovedrapporten, testmetoders er i hovedtræk opsummerede i Tabel C. 1.

Tabel C. 1 Hovedtræk af tre hyppigt benyttede testmetoder

	SBRC	RIVM		DIN
		Fastende	Efter måltid	
Segment mund/spiserør	Nej	Ja	Ja	Muligt tilvalg
Mave segment	Ja	Ja	Ja	Ja
Tarm segment	Muligt tilvalg	Ja	Ja	Ja
Fødetilsætning	Nej	Nej	Ja	Muligt tilvalg

Segmentet mund/spiserør

Simulering af bioopløsning i mund/spiserør har til hensigt at inddrage opløsning af stivelse, som det foregår her efter opblanding med spyt fra mundhulen. Spaltningen af stivelse fremmes ved tilsætning af enzymet α -amylase. Der er ikke fundet undersøgelser, der belyser den kvantitative effekt af at inkludere dette segment i testen, men rationalet bag er angiveligt, at en test bør repræsentere hele den humane fysiologi, som den er involveret i bioopløsningsprocessen /12/.

Delvis kemisk spaltning af stivelse som simuleret i segmentet mund/spiserør vil også foregå alene ved opvarmning med fortyndet saltsyre, kvalitativt svarende til betingelserne i testmetodernes mave segment /13/.

I SBRC metoden indgår ikke simulering af bioopløsning i mund/spiserør, i DIN metoden er dette segment et muligt tilvalg, mens det i RIVM metoden er en integreret del af testen, Tabel C. 2. I DIN metoden bemærkes, at dette segment kun har begrænset betydning for den totale bioopløselighed.

Reagenter og koncentrationer i testopløsningerne efter RIVM og DIN er ikke ens, med væsentligt højere koncentrationer i DIN metoden, ligesom reaktionstiden efter DIN metoden er væsentligt længere end efter RIVM metoden. For begge metoder er pH cirka 6,5. Det kan ikke på det foreliggende grundlag afgøres, om det ene sæt reaktionsbetingelser giver mere retvisende resultater end det andet.

Mave segmentet

Bioopløsningsprocessen i maven omfatter først og fremmest opløsning i syre, samt effekterne af protein- og fedtnedbrydende enzymer. Den vigtigste proces i mave segmentet er opløsning af metaller under sure betingelser under tilstedeværelse af chlorid.

Det angives, at pH i menneskets mave ligger lige under 2 for fastende tilstand (interval pH = 1 – 4) og kan stige til 4 – 5 efter et måltid /14/ for så igen at falde til under 2 efter cirka 1 time /15/. En høj koncentrationen af saltsyre og dermed en lav pH i mave opløsningen er vist at give højere bioopløselighed af tungmetaller ved at fremme opløsning af jordens mineraler (f.eks. jernoxider) og ved at binde metaller i opløste komplekser af chlorid (f.eks. bly) /16;17/. Et skift fra pH = 1.3 til pH = 2.5 er vist at reducere bioopløseligheden af bly fra jord med 65%, mens effekten er mindre for f.eks. arsen (16%) /14/. Effekten skyldes både hurtigere opløsning og opløsning til højere ligevægtskoncentration ved høj syretilsætning. Der må derfor tilstræbes en så høj saltsyrekoncentration og en så lav pH som fysiologisk relevant.

For RIVM metoden, Tabel C. 3, under fastende forhold er valgt at benytte pH = 1.2 som pH i mave opløsningen ud fra ønsket om en konservativ test under forhold svarende til pH i et fastende barns mavesæk /12/, selvom undersøgelser viste endnu højere bioopløselighed af f.eks. bly fra jord ved lavere pH. For RIVM metoden efter måltid er valgt at sigte efter pH = 2-2.5, igen ud fra ønsket om en konservativ test /18/. For SBRC er pH i mave opløsningen 1.5 og for DIN 2.0.

Testopløsningerne (fordøjelseskerner) er mest komplekse for RIVM metoderne og mest simple for SBRC, mens DIN metodens væsker er mere kompleks end for RIVM og enklere end for SBRC.

Til testopløsningen sættes i RIVM metoderne organiske syrer (galactarsyre og glucoronsyre), idet dette er vist at øge opløseligheden af f.eks. krom og bly i tarm segmentet /19/. I mave segmentet viste denne undersøgelse dog en lavere opløselighed af bly efter tilsætning af organiske syrer. Tilsætning af galactarsyre har vist sig at øge opløseligheden af PAH fra en jord med faktor 5 /8/.

Tabel C. 2 Segmentet mund/spiserør

Procedure	SBRC	RIVM fastende/efter måltid ¹	DIN	Kommentarer
<i>Test opløsning²</i>				
<i>Uorganiske stoffer</i>				
KCl		896	1500	
KSCN		200	500	
NaH ₂ PO ₄		888	2000	
Na ₂ PO ₄				
NaCl		298	1667	
NaOH		72/-		
Na ₂ SO ₄		570	1833	
NaHCO ₃		-/1694	500	
CaCl ₂			500	
<i>Organiske stoffer</i>				
Urinstof		200	333	
α-Amylase		145/290	833	
Urinsyre		15	33	
Galactarsyre		50/25	2500	
<i>pH</i>		6.5±0.2/6.8±0.2	6.4	
<i>Test betingelser</i>				
Prøvemængde		0.6 g/0.4 g	2 g	
Mængde test opløsning		9 mL/6 mL	30 mL	
L/S forhold		15	15	
Test tid		5 minutter	30 minutter	

¹ Kun vist, hvis forskellige betingelser er benyttet

² Hvor intet andet er noteret, er opgivet mg/L til benyttet testopløsning

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Temperatur		37±2°C	37°C	

Det proteinnedbrydende enzym pepsin tilsættes til relativt høj koncentration efter RIVM og DIN. Derimod opererer ingen af de 3 test metoder med tilsætning af fedtnedbrydende enzymer i dette segment. I RIVM metoden tilsættes der en højere koncentration af pepsin til testen efter måltid og et blod serum protein (bovine serum albumin, BSA) til begge tests, hvor serum albumin i blodet blandt andet har som funktion at holde fede syrer i opløsning.

Tilstedeværelse af phosphat i testens mave segment vil reducere bioopløseligheden af eksempelvis bly fra jord, hvilket blandt andet fremgår af tests af jord med og uden tilsat phosphorsyre /20/.

En test tid på 2 timer er ofte benyttet for mave segmentet dels som et udtryk for en overgrænse for fysiologisk realistisk opholdstid /21/, dels fordi opløsningshastigheden i denne periode er relativt konstant for f.eks. bly fra jord forurenet med mineaffald /17/, hvilket giver en mere robust test. Det skal dog bemærkes, at kun 25% af den totale ligevægtsopløselighed var opnået efter 2 timer /22/. I realiteten er opholdstiden i maven formodentlig nærmere 1 time, idet undersøgelser har vist 94% udskiftning af maveindholdet efter et måltid på cirka 1 time /14/. Sammenligning af blys bioopløselighed efter 1 og 2 timers test har vist cirka samme bioopløselighed for en jord, men 1-1.7 gange højere bioopløselighed efter 2 timer for 5 typer slagge fra affaldsforbrænding /23/. I en anden undersøgelse er fundet en begrænset stigning i blys bioopløselighed fra jord efter 2 timer fra cirka 70% til cirka 80% efter 6 timer /24/, og tilsvarende begrænset stigning for arsen. En ny undersøgelse viser, at forlængelse af testtiden i mave segmentet for RIVMs test efter måltid fra 2 til 16 timer ikke gav forøget bioopløselighed for BaP, bly, cadmium og arsen /18/.

Tarm segmentet

Simulering af bioopløsning i tarm segmentet har til formål at inddrage opløsning af jord og forureninger i den øverste del af tyndtarmen. Kun den øverste del af tyndtarmen medtages, fordi for eksempel bly er kendt for primært at optages her /11/. De vigtigste processer er opløsning af organisk stof som følge af den højere pH, opløsning af metaller som følge af kompleksering med f.eks. galdesyrer og opløsning af organiske forureninger som følge af binding til overfladeaktive stoffer som galde /25/. Enzymatisk spaltning af proteiner (ved proteaser som trypsin eller pepsin), kulhydrater (ved amylaser) og fedtstoffer (ved lipaser) er tillige vigtige opløsningsprocesser.

For tarm segmentet er refereret en typisk pH værdi på 7 /14/, men den varierer i realiteten fra cirka 4 ved overførsel til tarmen til 6 – 7.5 efter nogen tids ophold i tarmen /15/.

I fastende RIVM metoden er valgt at sigte imod en pH på >5.5 svarende til pH i den øverste del af tyndtarmen i fastende tilstand/11/, Tabel C. 4, men en pH på 6.5-7.0 i metoden efter måltid. Dette valg i RIVM metoden kunne medføre en større bioopløselighed af f.eks. bly i fastende testen, og en større opløselighed af organiske forureninger i testen efter måltid, men undersøgelser har overraskende vist større bioopløselighed af både bly og BaP ved den højere pH /18/. For en anden test (PBET) er det vist, at blys opløselighed falder ved overgangen fra mave segmentets lave pH til tarm segmentets højere pH /16/.

Tabel C. 3 Mave segment

Procedure	SBRC	RIVM fastende/efter måltid ³	DIN	Kommentarer
<i>Test opløsning</i>				
<i>Uorganiske stoffer</i>				
HCl	≈0.36 N. til pH = 1.50	0.1 N/0.078 N	Til pH = 2.0	
KCl		824	700	
NaH ₂ PO ₄		266	270	
NaCl		2752	2900	
CaCl ₂ · 2H ₂ O		400		
NH ₄ Cl		306		
<i>Organiske stoffer</i>				
Urinstof		85		
Galactarsyre		3000	3000	
Glycin	30030			
Glucose		650		
Glucuronsyre		20		
Glucosamin hydrochlorid		330		
BSA ⁴		1000		
Pepsin		1000/2500	1000	
Fødetilsætning		-/4500 mg børnemad	10000 mg mælkepulver	Tilsætning af mælkepulver er et muligt tilvalg efter DIN metoden
<i>pH</i>	1.50±0.05	1.07±0.07/1.30±0.02	2.0	
<i>Test betingelser</i>				
Prøvemængde	1.00±0.05 g	0.6 g/0.4 g	2 g	
Mængde test opløsning	100±0.5 mL	13.5 mL (Σ ⁵ 22.5)/12.0 mL (Σ 18)	100 mL	
L/S forhold	100	22.5(Σ 37.5)/ 30(Σ 45)	50	
Test tid	1 time	2 timer	2 timer	

³ Kun vist, hvis forskellige betingelser er benyttet

⁴ Bovine serum albumin, blod protein fra okse

⁵ Inklusive tidligere trin

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Temperatur	37±2°C	37±2°C	37°C	
Test blanding pH		1.2/2-2.5	2.0	I DIN metoden skal efterjusteres til pH = 2.0

En højere tilsætning af natriumbicarbonat til testopløsningen i RIVM metoden sammenlignet med DIN metoden skyldes ønsket om at kunne justere pH til den ønskede værdi ved kun én tilsætning, uden behov for efterjustering /11/. I RIVM metoden efter måltid tilsættes yderligere opløsning af natriumbicarbonat for at sikre den relativt høje pH i tarm segmentet /18/.

I både DIN og RIVM metoden benyttes tilsætning af frysetørret galde i relativt høje koncentrationer /11/, og opløseligheden af f.eks. PCB fra syntetisk jord er vist at stige med stigende koncentration af galde i testopløsningen /26/. Forskellig opløselighed af dioxiner fra en slagge ved anvendelse af 2 forskellige testmetoder er tilskrevet forskellig koncentration af tilsat galde, hvor en cirka 6 gange højere galdekonzentration gav cirka 2 gange så høj opløselighed /27/. RIVM metoden efter måltid benytter 4-5 gange højere tilsætning af galde end den fastende version, svarende til de fysiologiske forhold /18/.

I RIVM metoden tilsættes natriumdihydrogenphosphat, da phosphat findes i både spyt, mavesaft og tarmsaft /28/, og dette vil formodentlig give anledning til reduceret opløselighed af metaller som bly /25/.

Tilstedeværelsen af organiske syrer eller proteiner i tarm segmentets testopløsning giver højere opløselighed af bly, formodentlig på grund af kompleksbinding, men for kationiske metaller falder opløseligheden samlet trods tilstedeværelsen af sådanne kompleksbindere betydeligt ved overgang til tarm segmentet (f.eks. for bly et 74% fald fra jord og mineaffald /14/). I RIVM metoden efter måltid er koncentrationen af pancreatin og lipase øget med faktor 3 sammenlignet med fastende versionen for at reflektere de fysiologiske ændringer efter fødeindtag og for at øge opløseligheden af jord, forureninger og fødetilsætning.

Opholdstiden i tyndtarmen, hvor opløsningen af jorden og optag af dens indholdsstoffer antages at ske, er normalt 3-5 timer med et gennemsnit omkring 3.5 time for børn /14/. En maksimal opholdstid i tyndtarmen angives til 6 timer /15/. RIVM metoden benytter en testtid på 2 timer, ligeledes ud fra "fysiologisk realistiske opholdstider" /11/.

Praktisk testudførelse

For at opnå en robust test, skal den praktiske gennemførelse af tests være fastlagt og rettet imod enkel og reproducerbar udførelse. Detaljer bag den praktiske udførelse af de benyttede test metoder er beskrevet nedenfor, se også oversigten i Tabel C. 5.

Der er almindeligt anerkendt, at opblanding ved fuldstændig vending ("all over" eller "end over") er mere effektiv end omrøring /11/.

I tidligere versioner af SBRC metoden benyttedes pH justering for tarm segmentet med placering af dialyseslange indeholdende en opløsning af natriumbicarbonat /16/, men dette trin er nu erstattet af simpel titrering med base til ønsket pH /29/. I RIVM metoden benyttes tilsætning af faste mængder af buffrede opløsninger til opnåelse af de ønskede pH intervaller /11;18/.

Tabel C. 4 Tarm segment

Procedure	SBRC	RIVM fastende/efter måltid ⁶	DIN	Kommentarer
<i>Test opløsning</i>				I RIVM metoden fremstilles separat tarmsaft og galde. mens der i DIN metoden benyttes én tarmopløsning med komponenter af begge oprindelser
<i>Uorganiske stoffer. tarmsaft</i>				
HCl		0.0022 N		
KCl		559	300	
NaH ₂ PO ₄		79		
NaCl		6943		
NaHCO ₃		3355	1000	I DIN metoden tilsættes yderligere fast NaHCO ₃ og titreres efterfølgende automatisk til den ønskede pH
NaOH	Til pH = 7.0 ± 0.2			
MgCl ₂		49.5	200	
CaCl ₂		197.8	500	
<i>Uorganiske stoffer. galde</i>				
HCl		0.0022 N/0.0018 N		
KCl		364		
NaCl		5207		
NaHCO ₃		5728		
CaCl ₂		220		
<i>Organiske stoffer. tarmsaft</i>				
Urinstof		99	300	
BSA ⁷		990		
Pancreatin	500	2970/8911	9000	

⁶ Kun vist, hvis forskellige betingelser er benyttet

⁷ Bovine serum albumin, blod protein fra okse

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Lipase		495/1485		
Trypsin		-	300	
<i>Organiske stoffer. galde</i>				
Urinstof		248		
BSA		1782		
Galde	1750	5940/29703	9000	
<i>pH. tarmsaft</i>		7.8±0.2/8.1±0.2		I DIN metoden kontrolleres ikke pH af testopløsningerne men af blandingen af jord og opløsning
<i>pH. galde</i>		8.0±0.2		
<i>pH justering</i>				
NaHCO ₃		-/9411		
<i>Test betingelser</i>				
Prøvemængde	1.00 ± 0.05 g	0.6 g/0.4 g	2 g	
Mængde test opløsning	95	27 mL tarmsaft og 9 mL galde (Σ ⁸ 58.2)/ 12 mL tarmsaft. 6 mL galde og 2 mL natriumbicarbonat (Σ38)	100 mL (Σ200)	
L/S forhold	95	60 (Σ 97)/ 50 (Σ 95)	50 (Σ 100)	
Test tid	4 timer	2 timer	6 timer	
Temperatur	37±2°C	37±2°C	37°C	
Test blanding pH	7.0 ± 0.2	>5.5/6.5-7.0	7.5	I DIN metoden skal pH holdes på 7.5 I SBRC metoden startes tarm segmentet ved titrering af pH til 7.0

⁸ Inklusive tidligere trin

Valg af materiale for og rengøring af beholdere mv. benyttet i testen afhænger af de stoffer, som skal testes for bioopløselighed. Brug af HDPE (high density polyethylen) er foreslået til brug ved test af tungmetaller efter SBRC /29/. Den tyske standard kræver brug af glasflasker ved test for organiske stoffer og PE (polyethylen) flasker ved test for tungmetaller /15/. For dioxiner er foreslået deaktivering af glasoverfladerne for yderligere at hindre tab af dioxinerne fra testopløsningen ved adsorption /9/. RIVM benytter beholdere af polycarbonat til test for bioopløselighed af både tungmetaller og organiske forbindelser, phthalater dog undtaget /30/.

Vask af udstyr i kontakt med testopløsninger med fortyndet saltsyre efterfulgt af skylning med rent laboratorievand skal benyttes ved test for metaller bioopløselighed /11/. I RIVM's udførelse af testen benyttes vask af udstyr i en opvaskemaskine, der samtidig med normal opvask foretager sterilisering af udstyret.

Efter afsluttet opløsning, skal testopløsningen skilles fra den tilbageværende jord (faseadskillelse), inden denne kan underkastes analyse. Faseadskillelsen foretages normalt ved centrifugering. Det er angivet, at 2500 g (tyngde-accelerationer) i 2 timer er tilstrækkeligt til at fjerne alle synlige partikler, men dog med et forslag om at kontrollere partikelfri testopløsninger ved membranfiltrering (0.45 µm porediameter) /9/. I en undersøgelse var glasfiberfiltre og filtre af nitrocellulose velegnede (<5% tab af opløste dioxiner), mens teflonfiltre var mindre velegnede på grund af stort adsorptionstab. Filtrering igennem 0.45 µm porediameter cellulosefilter er benyttet som eneste faseadskillelse i test for bioopløselighed af arsen /31/. Centrifugering ved 906 g i 10 minutter efterfulgt af filtrering igennem 0.45 µm filtre har ligeledes været benyttet, men uden en belysning af effekten /10/. I en sammenligning af flere tests er centrifugering 10 minutter ved både 5000 g og 7000 g benyttet parallelt med centrifugering i 2 timer ved 3000 g /5/. Kombination af 10 minutters centrifugering ved 7000 g og efterfølgende filtrering igennem 20 µm sigte af rustfrit stål er også foreslået for test af PAH /8/. For RIVM metoden er fundet, at bundfældning natten over og centrifugering ved 2750 g både i 5 minutter og i 30 minutter giver nogenlunde samme resultater for opløselighed af bly fra syntetisk jord /11/.

I faseadskillelsen er bidraget af kolloidbundne stoffer ikke veldefineret ved de anvendte adskillelsmetoder. Kolloider vil have partikelstørrelser fra nogle nm til 10 µm, hvor forureninger bundet til små kolloider formodentlig er fuldt biotilgængelige og til store kolloider mindre biotilgængelige /32/. Overgangen imellem egentlige partikler og kolloider er ligeledes ikke veldefineret, men sættes ofte operationelt til f.eks. 10 µm partikelstørrelse. Kolloider defineres som partikler, der ikke fælder i en opløsning ved simpel henstand /33/. Da der ikke er en anerkendt viden om, i hvilket omfang kolloid bundne stoffer kan optages i mave-tarmsystemet, benyttes operationelt i tests en faseadskillelse, der er reproducerbar, giver testopløsninger uden synlige partikler, men ikke tilsigter fjernelse af kolloider.

Der er konstateret analysetekniske vanskeligheder ved bestemmelse af tungmetaller ved ICP-MS i testopløsninger med centrifugering, men uden filtrering af prøverne, hvilket er tilskrevet matrix effekter /34/. Det vurderes, at disse vanskeligheder bør løses ved korrekt analyse (standardaddition) snarere end ved forbehandling af prøverne.

I DIN metoden skylles den nedcentrifugerede jord med vand for at opnå fuldstændig bestemmelse af den opløste fraktion /15/. Da DIN testen omfatter 2 g jord med et anslået porevolumen på 1 mL og 200 mL testopløsning, anslås det ekstra bidrag fra dette trin at udgøre mindre end 1% af det totale volumen testopløsning, hvorfor trinnet ikke synes nødvendigt.

Forholdet imellem volumen af testopløsning og mængde jord (forhold liquid : solid, L/S, normalt i L/kg) kan påvirke test resultatet, idet et lille L/S forhold (5 – 25 L/kg) teoretisk kan give for lave resultater (diffusionsbegrænset opløsning) /14/, mens varierende L/S forhold over 1000 L/kg er vist uden væsentlig effekt på bioopløseligheden af 4-5 metaller fra 2 jorder /35/. I den sidste undersøgelse var et L/S forhold på 100 L/kg tilstrækkeligt til at opnå konstant bioopløselighed for den ene jord. Antages et gennemsnitligt volumen udskilt mavesyre på 100 mL/time /35/ og et gennemsnitligt dagligt indtag af jord på 0.2 g/dag /36/, vil et fysiologisk korrekt L/S forhold være 500 L/kg.

Mængden af jord til test er først og fremmest udvalgt for at have en praktisk lille mængde jord, men alligevel en tilstrækkeligt stor mængde til at tillade repræsentativ delprøveudtagning til testen /14/.

I sin oprindelige version udførtes PBET metoden anaerobt med opblanding ved gennembobling med argon, men efterfølgende er dette vist unødvendigt for f.eks. bly /37/, hvorimod en effekt af aerobe eller anaerobe testbetingelser ikke uden videre kan udelukkes for redox følsomme forureninger som chrom /38/.

Kvalitetskontrol af test

For selve testen er benyttet kvalitetskontrol i varierende omfang,

Tabel C. 6. De i litteraturen benyttede redskaber til kvalitetskontrol af testen er blindprøver af fremstillede reagenser, blindprøver for hele testen, gentagne tests af delprøver af samme jordprøve, kontrolprøver fremstillet af en opløsning af testens målestof(-fer) (syntetiske kontrolprøver), kontrolprøver af en jord, der medtages i hver test, samt opstilling af massebalance.

Massebalancen etableres ved at analysere for koncentrationen af målestoffet (-erne) i oprindelig jord, opløst i testopløsning og tilbageværende i testet jord, hvorefter det beregnes, hvorvidt startmængden af stoffet (-erne) genfindes efter test, se f.eks.: /10/. Det skal bemærkes, at denne fremgangsmåde ikke vil være brugbar, hvis der til analyse af jordprøver for tungmetaller benyttes en delvis oplukning (f.eks. efter DS 259), idet oplukkeligheden af jordprøverne med stor sandsynlighed vil ændres ved behandlingen med testopløsning.

I SBRC metoden kræves foruden omfattende kvalitetskontrolprøver med specificerede kvalitetskrav, se

Tabel C. 6, også dokumentation af prøvernes håndtering fra prøvetagning til analyseresultat i form af en såkaldt "chain of custody" dokumentation /29/.

DIN metoden henviser til generelle forskrifter for kvalitetssikring af analyseresultater, samt opgivelse af detektionsgrænse, men kræver derudover opstilling af massebalance for hver 20 prøver testet /15/.

For RIVM metodens anvendelse af NIST 2711 Montana standard reference jord som kontrolprøve (tungmetaller) skal bemærkes, at RIVM laboratoriet undersøger årsagerne til inkonsistente kontrolresultater /30/, hvorfor denne jord ikke i øjeblikket kan anses at være velegnet som kontrolprøve for denne test. RIVM angiver, at blindprøver for testen normalt giver analyseresultater for f.eks. bly under analysemetodens detektionsgrænse (8 µg Pb/L).

Tabel C. 5 Praktisk testudførelse

Procedure	SBRC	RIVM fastende/efter måltid ⁹	DIN	Kommentarer
Opblanding	30±2 rpm ¹⁰ all over	55 rpm all over	200 spm ¹¹ rystebord eller 300 rpm magnetomrører (2 cm magnet)	
pH justering	I mave segmentet foretages pH justering af reagenser, men hvis slut pH af testblanding er steget til mere end 2, skal testen laves om med trinvis tilsætning af saltsyre under testen. I tarm segmentet titreres testblandingen manuelt med natriumhydroxid opløsning til pH = 7.5 ± 0.2	Der foretages alene pH justering af tilsatte reagenser, men slut pH af testblanding kontrolleres	Justering af pH foretages løbende med autotitrator, alternativt ved løbende, manuel justering	
Faseadskillelse	Filtrering (sprøjte) igennem 0.45 µm porediameter filter af celluloseacetat	Centrifugering ved 2750 g ¹² i 5 minutter	Centrifugering ved 7000 g i 10 minutter, evt. med filtrering igennem 20 µm rustfrit stålfilter (organiske forureninger) eller 30 µm nylon filter (tungmetaller) til fjernelse af flydende partikler	

⁹ Kun vist, hvis forskellige betingelser er benyttet

¹⁰ rpm: rounds per minute

¹¹ spm: strokes per minute

¹² g: tyngdeacceleration

Tabel C. 6 Kvalitetskontrol

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Reagensblind	1 per reagensfremstilling og mindst 1 per 20 prøver, max. 25 µg Pb/L	Ikke krævet	Ikke krævet	Ingen
Blindprøver	1 per serie og mindst 1 per 20 prøver, max. 50 µg Pb/L	1 per serie	Ikke krævet	Ingen
Gentagelser	1 per serie og mindst 1 per 10 prøver, max. 20% CV ¹³	Alle prøver i triplikat	Ikke krævet	Ingen
Kontrolprøver, syntetisk	1 per serie og mindst 1 per 20 prøver, genfinding 85-115% for bly	Ikke krævet	Ikke krævet	Ingen
Kontrolprøver, matrix	1 prøve af Montana 2711 standard reference soil fra NIST ¹⁴ per 50 prøver, genfinding 84-116% af erfaringsværdi for bly	1 prøve af Montana 2711 standard reference soil fra NIST per serie for tungmetaller	Ikke krævet	Ingen
Massebalance	Ikke krævet	For 1 prøve per serie	For 1 per 20 prøver, max. 10% afvigelse fra 100 massegenfindelse	Ingen

¹³ Coefficient of variation eller relativ standardafvigelse

¹⁴ National Institute of Standards and Technology

Analyse af jord og testopløsninger

De 3 metoder til test for bioopløselighed benytter forskellige metoder til oplukning af jordprøver til total analyser for tungmetaller, se Tabel C. 7, og disse metoder antages ofte at give forskellige resultater /39/ og også resultater afvigende fra den i Danmark benyttede metode. I en større sammenligning af tungmetalkoncentrationer fundet i jord med 3 forskellige destruktionsmetoder er fundet, at salpetersyre destruktion i gennemsnit giver koncentrationer på 1/3 af koncentrationerne ved destruktion med flussyre ("total oplukning") /24/, se dog resultaterne fra denne undersøgelse i hovedrapportens afsnit 4.2..

I de tre testmetoder er benyttet analyse for tungmetaller af testopløsninger uden destruktion (se Tabel C. 7), men andre rapporter beskriver forudgående destruktion f.eks. i mikrobølgeovn efter tilsætning af salpetersyre /34/.

Prøveforbehandling

Prøveforbehandling som knusning, formaling, sigtning og homogenisering foretages normalt for at muliggøre udtagning af repræsentative delprøver til analyse.

Det forventes normalt, at små jordpartikler med større indhold af ler og organisk stof viser højere koncentration af tungmetaller og sorberbare organiske forureninger end større jordpartikler /40/, hvilket for eksempel er vist for dioxiner med 5 gange højere koncentrationer i finfraktionen (partikel størrelse $< 20 \mu\text{m}$) end i den samlede jord /9/. Ligeledes vil opløsningshastigheden af forureninger fra små jordpartikler kunne være større end fra store jordpartikler på grund af den større specifikke overflade, men koncentrationen i en opløsning ved ligevægt vil ikke være større alene på grund af forskellen i partikelstørrelse /17;27/. Der er vist væsentligt højere bioopløselighed af bly i fraktionen $< 125 \mu\text{m}$ end for fraktionerne med større jordpartikler /41/.

Derfor er det afgørende for en ensartet testudførelse, at jordprøver forbehandles på samme måde inden test.

ISO 11464 beskriver forbehandling inden fysisk-kemisk analyse af jord og anviser:

- tørring
- frasortering af større partikler
- sigtning til $< 2 \text{ mm}$
- frasortering af større partikler fra sigterest
- knusning af sigterest i morter
- sigtning til $< 2 \text{ mm}$
- homogenisering
- deling

ISO 11464 stiller med udtagning af mindre end 2 g prøve til test eller analyse yderligere krav om:

- formaling
- sigtning til $< 250 \mu\text{m}$

Tabel C. 7 Analyser for total koncentrationer i jord og analyse af testopløsninger

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Tungmetaller, jord	Destruktion af prøve med 2:1 HNO ₃ /H ₂ O, efterfulgt af 30% H ₂ O ₂ , efterfulgt af ICP analyse som nedenfor.	Destruktion med kongevand (HNO ₃ /HCl) formodentlig efterfulgt af analyse ved ICP-MS ¹⁵	Destruktion med kongevand efter efterfulgt af analyse ved AAS	
Tungmetaller, test opløsninger	ICP direkte af test opløsninger	Testopløsninger fortyndes x 10 med 0.1 M HNO ₃ og analyseres ved ICP-MS	Testopløsning fortyndes x 5-10 og analyseres ved ICP-MS eller ICP OES ¹⁶	Ved analyse af testopløsning ved AAS er destruktion nødvendig.
PAH, jord	Ikke angivet	HPLC ¹⁷ for benzo(a)pyren.	Soxhlet ekstraktion med hexan/acetone, 4:1, efterfulgt af GC ¹⁸ -MS, eller tilsvarende.	
PAH, test opløsninger	Ikke angivet	HPLC for benzo(a)pyren. For andre organiske stoffer benyttet ekstraktion med hexan, tilsætning af lidt methanol og centrifugering, inddampning og til slut GC-ECD ¹⁹	Ekstraktion af testopløsning med hexan efter tilsætning af NaCl og acetone, efterfulgt af GC-MS, eller tilsvarende. SPE ²⁰ er ikke velegnet på grund af tilsat mælkepulver	Forsæbning af mælkepulver kan være nødvendig for at opnå fuldstændig analyse af PAH. Tilsætning af mættet saltopløsning og ethanol, samt centrifugering kan være nødvendig for at bryde emulsioner under ekstraktion.

¹⁵ Massespektrometri, en detektionsmetode anvendt til både metaller og til organiske stoffer

¹⁶ Optisk emissionsspektroskopi, en detektionsmetode anvendt til metaller og lignende stoffer

¹⁷ High Performance Liquid Chromatography, væskkromatografi, en analysemetode for organiske stoffer

¹⁸ Gas Chromatography, gaskromatografi, en analysemetode for organiske stoffer

¹⁹ Electron Capture Detector, en detektionsmetode anvendt for organiske stoffer

²⁰ Solid Phase Extraction, fastfaseekstraktion, en opkoncentreringsmetode anvendt primært for organiske stoffer

For prøver til analyser for organiske stoffer er udarbejdet ISO 14507 med følgende procedure anvist for semiflygtige stoffer (defineret som stoffer med kogepunkt over 300°C) /42/:

- tilsætning af kemiske tørringsmidler (natriumsulfat og magnesiumsilikat)
- knusning i mekanisk mølle efter nedkøling med flydende kvælstof

Som alternativ for prøver og parametre, hvor knusningsproceduren ikke er anvendelig, anbefales i ISO 14507:

- fjernelse af synlige store partikler
- knusning, hvis muligt, af prøven i håndmorter
- udtagning af delprøve til analyse med ske eller lille hulbor

Det vurderes, at fremgangsmåden i ISO 11464 i udgaven til prøver mindre end 2 g vil påvirke jordprøver til test for human bioopløselighed i uacceptabel grad. Det vurderes endvidere, at fremgangsmåden i ISO 14507 for semiflygtige stoffer ligeledes vil påvirke jordprøver i uacceptabel grad, samt at proceduren er unødvendigt arbejdskrævende.

Det er eftervist, at tørring af spildevandsslam ved 100°C ikke betyder tab af PAH /43/, ligesom det er vist, at lufttørring af jord ikke giver tab af/prøveforurening med PAH med mere end 4 ringe /44/. I forslag til analysemetode for PAH i jord udarbejdet for Miljøstyrelsen anvises lufttørring af prøverne inden analyse /45/. Det vurderes på den baggrund, at tørring af jordprøver i ovn ved 40°C inden test for bioopløselighed af PAH forbindelserne benzo(a)pyren og dibenz(a,h)anthracen (begge med 5 ringe, kogepunkter henholdsvis 496 og 524°C) ikke vil medføre betydelige tab. Det skal dog bemærkes, at tests for bioopløselighed af organiske jordforureninger tidligere alene er rapporteret med lufttørring af prøverne /8/, /46/, /7/.

For metaller vurderes, at tørring af jordprøver ved 40°C inden test for bioopløselighed ligeledes vil være acceptable, når der ikke er tale om redox følsomme metaller.

Tabel C. 8 Procedurer for forbehandling af jord benyttet før test for human bioopløselighed

Procedure	SBRC	RIVM	DIN	Kommentarer
Tørring	<40°C	Tørres ved "stuetemperatur" over 1 uge	Efter ISO ²¹ 11464 og ISO 14507	
Sortering	-	Sten og grene frasorteres	<1 mm sikres ved sortering eller sigtning	
Knusning	Ikke specificeret	I Retsch mølle	Ikke specificeret	
Sigtning	<250 µm	<1 mm	<1 mm sikres ved sortering eller sigtning	
Homogenisering	Prøvesplitter	Omrøres med håndskovl og prøve udtages med teflonbelagt stålske	Ikke specificeret	

²¹ International Standardization Organisation

Referencer

- /1/ Grøn, C. and Andersen, L. Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. 2003. Miljøstyrelsen.
- /2/ Ruby, M. V. Personal communication. 2003.
- /3/ Drexler, J. The In-Vitro Method. 26-4-2005.
- /4/ Kelley,NE, Brauning,SE, Schoof,RA, Ruby,MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. *Journal of Hazardous Materials* 95:331-334, 2002
- /5/ Hack,A, Kraft,M, Mackrodt,P, Selenka,F, Wilhelm,M: Mobilisierung von Blei und Quecksilber aus real kontaminiertem Bodenmaterial durch synthetische Verdauungssäfte unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Lebensmitteln. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 3:297-305, 1998
- /6/ Ruby,MV: Determining the oral bioavailability of PAHs from soil. *Division of Environmental Chemistry Preprints of Extended Abstracts* 37:237-238, 1997
- /7/ Ruby,MV, Fehling,KA, Paustenbach,DJ, Landenberger,BD, Holsapple,MP: Oral Bioaccessibility of Dioxins/Furans at Low Concentrations (50-350 ppt Toxicity Equivalent) in Soil. *Environmental Science & Technology* 36:4905-4911, 2002
- /8/ Hack,A, Selenka,F: Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters* 88:199-210, 1996
- /9/ Rotard, W., Christmann, W., Knoth, W, and Mailahn, W. Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. UWSF-Z Umweltchem Ökotox 7, 3-9. 1995.
- /10/ Hamel,SC, Ellickson,KM, Liou,PJ: The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. *The Science of the Total Environment* 243/244:273-283, 1999
- /11/ Oomen, A. G., Rempelberg, C J M, Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., and Sips, A. J. A. M. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 44, 281-287. 2003.
- /12/ Sips, A. J. A. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., van de Kamp, E., Oomen, A. G., Pereboom, D. P. K. H., Rempelberg, C J M, and Zeilmaker, M. J. Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. 711701012/2001. 2001. Bilthoven, National Institute of Public Health and the Environment. RIVM Report.
- /13/ Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS: Organic Chemistry. 1980,

- /14/ Ruby,MV, Davis,A, Schoof,R, Eberle,S, Sellstone,CM: Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science & Technology* 30:422-430, 1996
- /15/ Deutsches Institut für Normung. Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminierten Bodenmaterial. (DIN 19738). 2000. Berlin, DIN.
- /16/ Ruby,MV, Davis,A, Link,TE, Schoof,R, Chaney,RL, Freeman,GB, Bergstrom,PD: Development of an in Vitro Screening Test to Evaluate the in Vivo Bioaccessibility of Ingested Mine-Waste Lead. *Environmental Science & Technology* 27:2870-2877, 1993
- /17/ Ruby,MV, Davis,A, Kempton,JH, Drexler,JW, Bergstrom,PD: Lead Bioavailability: Dissolution Kinetics under Simulated Gastric Conditions. *Environmental Science & Technology* 26:1242-1248, 1992
- /18/ Versantvoort, C. H. M., van de Kamp, E., and Rompelberg, C. J. M. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. 320102002. 2004. Bilthoven, The Netherlands, RIVM. RIVM report.
- /19/ Ellickson, K. M. The Bioaccessibility of Selected Radionuclides and Heavy Metals: an Investigation of Bioaccessibility, Bioavailability and Natural Soil Characteristics. 2001. The State University of New Jersey.
- /20/ Yand,J, Mosby,DE, Casteel,SW, Blanchar,RW: In Vitro Lead Bioaccessibility and Phosphate Leaching as Affected by Surface Application of Phosphoric Acid in Lead-Contaminated Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43:399-405, 2002
- /21/ Versantvoort, C H M, Rompelberg, C J M, and Sips, A. J. A. M. Methodologies to study human intestinal absorption. 630030001. 2000. Bilthoven, The Netherlands, National Institute of Public Health and the Environment. RIVM Report.
- /22/ Davis,A, Ruby,MV, Bergstrom,PD: Bioavailability of Arsenic and Lead in Soils from the Butte, Montana, Mining district. *Environmental Science & Technology* 26:461-468, 1992
- /23/ Davis,A, Ruby,MV, Goad,Ph, Eberle,S, Chryssoulis,S: Mass Balance on Surface-Bound, Mineralogic, and Total Lead Concentrations as Related to Industrial Aggregate Bioaccessibility. *Environmental Science & Technology* 31:37-44, 1997
- /24/ Hamel, S. C. The Estimation of Bioaccessibility of Heavy Metals in Soils using Artificial Biofluids. 1998. The State University of New Jersey.
- /25/ Grøn, C. and Andersen, L. Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. 2003. Miljøstyrelsen.
- /26/ Oomen,AG, Sips,AJAM, Groten,JP, Sijm,DTHM, Tolls,J: Mobilization of PCBs and Lindane from Soil during in Vitro Digestion and Their Distribution

among Bile Salt Micelles and Proteins of Human Digestive Fluid and the Soil. *Environmental Science & Technology* 34:297-303, 2000

- /27/ Wittsiepe,J, Schrey,P, Hack,A, Selenka,F, Wilhelm,M: Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dipenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag "Kieselrot". *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203:263-273, 2001
- /28/ Oomen, A. G., Tolls, J., Sips, A. J. A. M., and van den Hoop, A. G. T. Lead Speciation in Artificial Human Digestive Fluid. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 107-115. 2003.
- /29/ Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV: Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. 2002,
- /30/ Oomen, A. G. RIVM. 2003.
- /31/ Cave, M. R., Wragg, J., Palumbo, B., and Klinck, B. A. Measurement of the bioaccessibility of arsenic in UK soils. 2002. Nottingham, British Geological Survey.
- /32/ Smith, B. and Rawlins, B. G. Review of the bioaccessibility of arsenic in soils using the physiologically-based extraction test (PBET). Technical Report WP/98/11C. 1998. British Geological Survey.
- /33/ Stumm W, Morgan JJ: Aquatic Chemistry. Wiley-Interscience, 1981,
- /34/ Lioy, P. J., Gallo, M. A., Georgopoulos, P., and Roy, A. Comparison of the Bioavailability of Elemental Waste Laden Soils using In Vivo and In Vitro Analytical Methodology and Refinement of Exposure/Dose Estimates. 1998. Environmental and Occupational Health Sciences Institute.
- /35/ Hamel,SC, Buckley,B, Lioy,PJ: Bioaccessibility of Metals in Soils for Different Liquid to Solid Ratios in Synthetic Gastric Fluid. *Environmental Science & Technology* 32:358-362, 1998
- /36/ Miljøstyrelsen. Afskæringskriterier for forurennet jord. 425. 1998. København, Miljøstyrelsen. Miljøprojekt.
- /37/ Wragg, J. and Cave, M. R. In-vitro methods for the measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils: a critical review. 2003. Nottingham, British Geological Survey.
- /38/ Proctor DM, Hays S, Ruby MV, Liu S, Sjong A, Goodman M, Paustenbach D: Rate of hexavalent chromium reduction by human gastric fluid (Abstract). *Presentation at Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2002, Nashville, Tennessee, US*, 2002
- /39/ Oomen,AG, Hack,A, Minekus,M, Zeijdner,E, Cornelis,C, Schoeters,G, Verstraete,W, van de Wiele,T, Wragg,J, Rompelberg,CJM, Sips,AJAM, van Wijnen,JH: Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the

Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Science & Technology* 36:3326-3334, 2002

- /40/ Green-Pedersen, H. and Andersen, K. J. Homogenisering og delprøvetagning af jordprøver til sporelementanalyse. 2002. Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for Miljøkemiske Analyser.
- /41/ Mercier,G, Duchesne,J, Carles-Gibergues,A: A simple and fast screening test to detect soils polluted by lead. *Environmental Pollution* 118:285-296, 2002
- /42/ ISO. Soil quality - Pretreatment of samples for determination of organic contaminants. ISO 14507. 2003.
- /43/ Wild,SR, Obbard,JP, Munn,CI, Berrow,ML, Jones,KC: The Long-Term Persistence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in an Agricultural Soil Ammended with Metal-Contaminated Sewage Sludges. *Science of the Total Environment* 101:235-253, 1991
- /44/ Cousins,IT, Kreibich,H, Hudson,LE, Lead,WA, Jones,KC: PAHs in soils: contemporary UK data and evidence for potential contaminant problems caused by exposure of samples to laboratory air. *Science of the Total Environment* 203:141-156, 1997
- /45/ Bøwadt, S., Dybdahl, H. P., Bennetzen, S., Merry, J., Andersen, K. J., and Vejbøl, J. Udvikling af analysemetode til bestemmelse af Polycykliske Aromatiske Hydrocarboner (PAH'er) i jord. 564. 2000. Miljøprojekt.
- /46/ Hack,A, Selenka,F, Wilhelm,M: Mobilisierung von PAK durch synthetische Verdauungssäfte aus dem kontaminierten Bodenmaterial einer Altlastenfläche. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 3:275-280, 1998

Prøveforbehandling af testopløsninger

Analysen af testopløsninger for tungmetaller er som nævnt gennemført som tidligere beskrevet, se hovedrapporten kapitel 4, ved fortynding med en vandig opløsning af salpetersyre og analyse ved ICP-OES under anvendelse af standardaddition. Praksis i det laboratorium, som har udviklet testmetoden, har været at analysere testopløsningerne straks efter fortynding og uden yderligere syrekonservering /1/.

I denne undersøgelses fase 2 har test for bioopløselighed af tungmetaller efter RIVM fastende tilstand været udført i 2 runder med samme jordprøver: én runde med konservering af testopløsninger med koncentreret salpetersyre og opbevaring af prøverne inden analyse (2a), og én efterfølgende runde alene med fortynding med salpetersyreopløsning og analyse umiddelbart efter fremstilling af fortyndingerne ("straks analyser", 2b). I Tabel D.1 er vist det gennemsnitlige, det største og det mindste forhold imellem resultaterne i de to runder.

Tabel D.1 Resultater af analyser af testopløsninger "straks" og ukonserveret, samt efter konservering og opbevaring

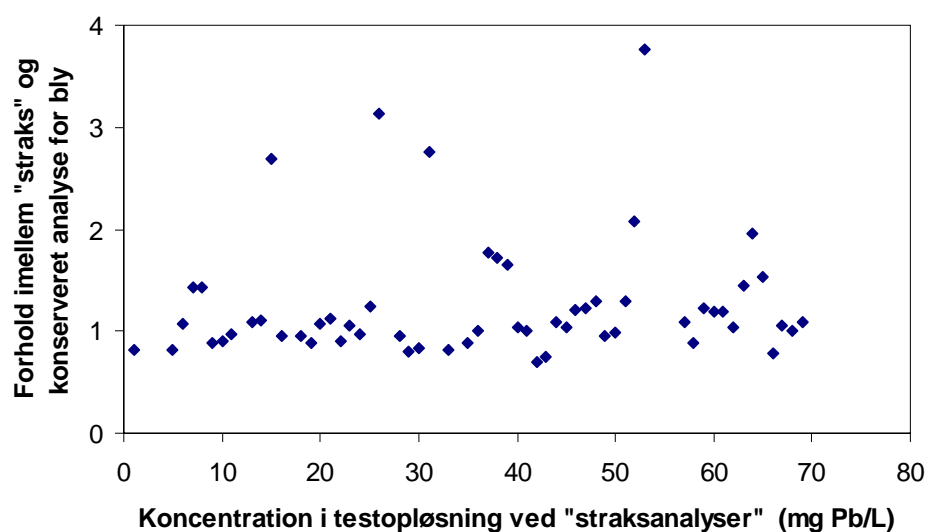
	Forhold imellem "straks" og konserveret		
	Cd	Pb	Ni
Gennemsnit	0,97	1,3	0,92
Største	1,5	3,8	1,8
Mindste	0,36	0,71	0,55

Resultaterne viser, at analyse af testopløsninger "straks" og uden konservering antydningvist gav lavere indhold af cadmium og nikkel, men at forskellen i gennemsnit var mindre end 10%.

For bly opnåedes i gennemsnit højere indhold ved analyse af testopløsninger "straks" og uden konservering, og for 5 prøver var forskellen betydelig, faktor 2-4. Der er ikke tegn på, at forskellen var størst for lave eller høje koncentrationer af bly i testopløsningerne, se Figur D.1.

Forskellen på analyser for bly ved "straksanalyser" og ved analyse efter konservering kan skyldes bundfældning af humus, der under testen var opløst fra jordprøver med højt indhold af organisk stof, men udfældet ved den efterfølgende konservering med koncentreret syre. Tungmetaller, særligt bly på grund af dette metals villighed til at kompleksbindes til humus (se f.eks.: /2/), vil bindes til bundfældet og kan dermed i et vist omfang undslippe efterfølgende analyse. Efter analyse af første testrunde blev konstateret bundfæld i en række prøver af testopløsninger.

Figur D.1 Forhold imellem analyser for bly af testopløsninger "straks" og analyser efter konservering og opbevaring afbildet imod koncentrationen i testopløsningerne ved "straks" analyser



Der er derfor efter første testrunde med analyser udført efter syrekonservering og opbevaring yderligere bestemt tungmetaller i udvalgte af disse konserverede prøver efter oplukning med kogning i stærk salpetersyre efterfulgt af analyse ved ICP-OES /3/. Oplukning vil i vidtgående omfang destruere bundfald og bringe bundne tungmetaller i opløsning. Resultaterne er vist for bly i Tabel D.2 sammen med de oprindelige analyseresultater for testopløsninger uden oplukning og sammen med resultater af analyser udført straks og uden syrekonservering i den efterfølgende gentagelse af den samlede test.

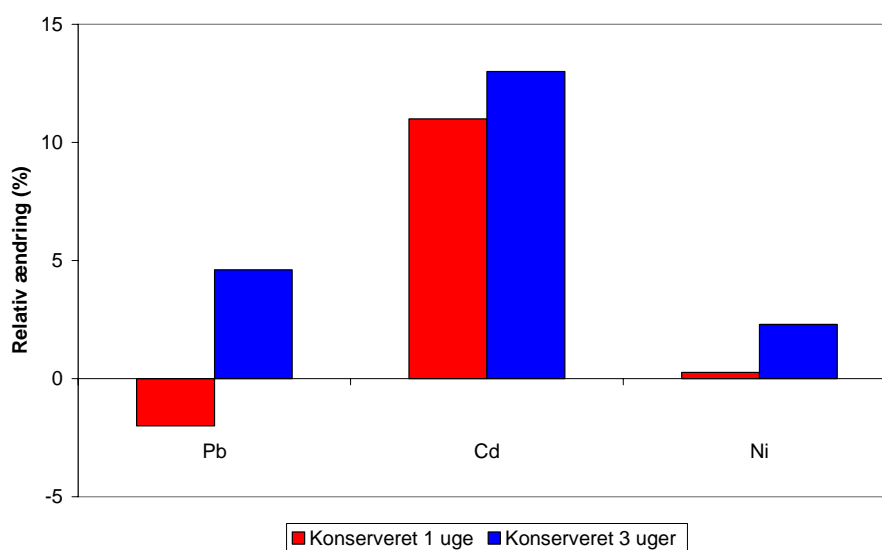
Analyse efter oplukning viste ikke øgede koncentrationer af bly (og heller ikke af cadmium og nikkel, data ikke vist), men gentagne test og "straksanalyser" uden konservering i 2. runde viste for 2 af disse prøver 3 gange højere koncentrationer af bly. Der var ingen forskel for cadmium og nikkel.

Tabel D.2 Analysersultater for bly i konserverede testopløsninger, i oplukkede testopløsninger, samt i testopløsninger "straksanalyseret" uden syrekonservering i 2. testrunde

Prøve (mg Pb/L)	Syrekonserverede prøver runde 1	Oplukkede prøver runde 1	Fortyndede prøver runde 2
Bruchsal	0.087	0.061	0.064
Carl 1	0.74	0.68	0.60
8-122575	28	26	30
8-37926	0.22	0.22	0.70
8-122651	1.1	1.0	3.0
8-122653	1.3	1.2	1.2

I forbindelse med analyser efter 2. runde er tillige konserveret delprøver med koncentreret syre, hvorefter prøverne er opbevaret 1 og 3 uger inden analyse, se Figur D.2.

Figur D.2 Gennemsnitlig relativ ændring i analyseresultater for testopløsninger konserverede og opbevarede 1 og 3 uger i forhold til "straks"



Sammenligning af resultater i 2. runde fra "straksanalyser" med analyser efter konservering viser efter opbevaring stigende eller svagt stigende tendens for cadmium og nikkel, henholdsvis, men ingen klar tendens for bly.

Samlet viser resultaterne fra runde 1 og runde 2 af undersøgelsens fase 2, at for en række prøver har enten test eller konservering og opbevaring i 1. runde givet for lave resultater for bly, men resultaterne kan ikke konsistent identificere årsagen. Derfor er alene resultaterne fra 2. test runde for tungmetaller indgået i den videre vurdering.

På den baggrund anbefales det, at analyser af testopløsninger for tungmetaller fremover udføres som "straksanalyser" uden syrekonservering, for at opnå den størst mulige sikkerhed imod fejlbehæftede analyseresultater for bly.

Referencer

- /1/ Oomen, A. G. RIVM. 2003.
- /2/ Christensen, J. B., Jensen, D. L., Filip, Z., Grøn, C., and Christensen, T. H. Characterization of the Dissolved Organic Carbon in Landfill Leachate Polluted Groundwater. Water Research 32(1), 125-135. 1998.
- /3/ Dansk Standard. Vandundersøgelse - Bestemmelse af metaller i vand, jord, slam og sedimenter - Almene principper og retningslinjer for bestemmelse ved atomabsorptionsspektrofotometri i flamme. DS 259. 2003.