

RIVM rapport 711701060/2007

**Richtlijn: bepalen van de orale
biobeschikbaarheid van lood in de bodem**

W.I. Hagens, A.J.A.M. Sips, J.P.A. Lijzen,
A.G. Oomen

Contact:

Werner Hagens

Centrum voor Stoffen en Integrale Risicoschatting

Werner.Hagens@rivm.nl

Agnes Oomen

Centrum voor Stoffen en Integrale Risicoschatting

Agnes.Oomen@rivm.nl

Dit rapport is opgesteld in het kader van het deelproject 'Implementatie biobeschikbaarheid mens', onderdeel van het project 'Risico's in relatie tot bodemkwaliteit' (M/711701).

Rapport in het kort

Richtlijn: bepalen van de orale biobeschikbaarheid van lood in de bodem

Het RIVM heeft een richtlijn ontwikkeld om nauwkeurig te bepalen hoeveel lood in de grond op een specifieke locatie schadelijk is voor de mens. Hierdoor is beter in te schatten of maatregelen nodig zijn om de loodverontreiniging aan te pakken.

De bodem in Nederland is op een groot aantal locaties verontreinigd met lood. Vooral kinderen lopen gevaar doordat ze naar schatting gemiddeld 100 mg grond via hun vuilgemaakte handen inslikken. Echter, niet al het lood in de bodem komt na inname beschikbaar in het lichaam. Een deel van het lood hecht bijvoorbeeld aan de bodemdeeltjes en wordt uitgescheiden via de ontlasting. Het overige lood dat in de bloedbaan terechtkomt vormt een (potentieel) risico voor de gezondheid van mensen.

Dit rapport beschrijft een richtlijn voor het bepalen van het biobeschikbare lood uit de bodem, dat wil zeggen de hoeveelheid lood die in het bloed kan komen en schade kan aanrichten. De richtlijn bevat een protocol voor het nemen en meten van bodemonsters. Deze worden getest in een kunstmatig maag-darmsysteem (digestiemodel) om realistisch de relatieve orale biobeschikbaarheidsfactor te berekenen. Dit is een maat voor het biobeschikbare gedeelte lood in de bodem. Deze maat kan worden ingevoerd in een blootstellingsmodel om het humane risico te berekenen.

De richtlijn is bestemd voor laboratoria die de biobeschikbaarheid van lood uit bodems willen bepalen. Door de bepaling uit deze richtlijn wordt de risicobeoordeling realistischer en in de meeste gevallen minder conservatief. Ook vraagt het RIVM de laboratoria om hun resultaten door te geven voor gegevensonderzoek. Door relaties te leggen tussen bodemkarakteristieken en de biobeschikbaarheid van lood wordt het wellicht in de toekomst mogelijk de biobeschikbaarheid van lood in de bodem te schatten op basis van eenvoudige bodemeigenschappen.

Trefwoorden:

bioaccessibility, risicobeoordeling, *in vitro* digestiemodel, monsternamen, monsterbehandeling

Abstract

Guideline for determining the oral bioavailability of lead from soil

The RIVM has developed a guideline to accurately determine, for a specific location, the amount of lead in soil that may pose a risk to human health. Such a determination will allow a more accurate risk assessment of lead-contaminated soil.

Many sites in the Netherlands are contaminated with lead. Lead intoxication puts especially children at risk, since they are assumed to swallow, on average, 100 mg soil per day via dirty hands. However, not all the lead will become bioavailable in the human body after ingestion. Part of the lead remains soil-bound in the gastrointestinal tract, for example, and will be excreted via feces. However, lead released into the blood circulation can cause a (potential) risk to human health.

The guideline serves to assist in determining the bioavailable lead from soil, in other words, the amount of lead that reaches the blood. On absorption, the lead may cause adverse effects. This guideline describes how soil samples should be collected, handled and tested. These samples are tested with an artificial gastrointestinal tract to obtain a relative bioavailability factor (a measure of the bioavailable lead in soil). This factor can be used to assess the human health risk using a specific exposure model (Sanscrit).

This guideline is intended for laboratories with an interest in determining the bioavailability of lead from soil with a method that makes risk assessment more realistic and, in most cases, less conservative. Laboratories are requested by the RIVM to return their results for database-screening. The relationship between soil characteristics and bioavailability of lead might, in future, result in estimation of the oral bioavailability of lead from soil on the basis of simple soil properties.

Key words:

bioaccessibility, risk assessment, *in vitro* digestion model, sampling strategy, sample handling

Inhoud

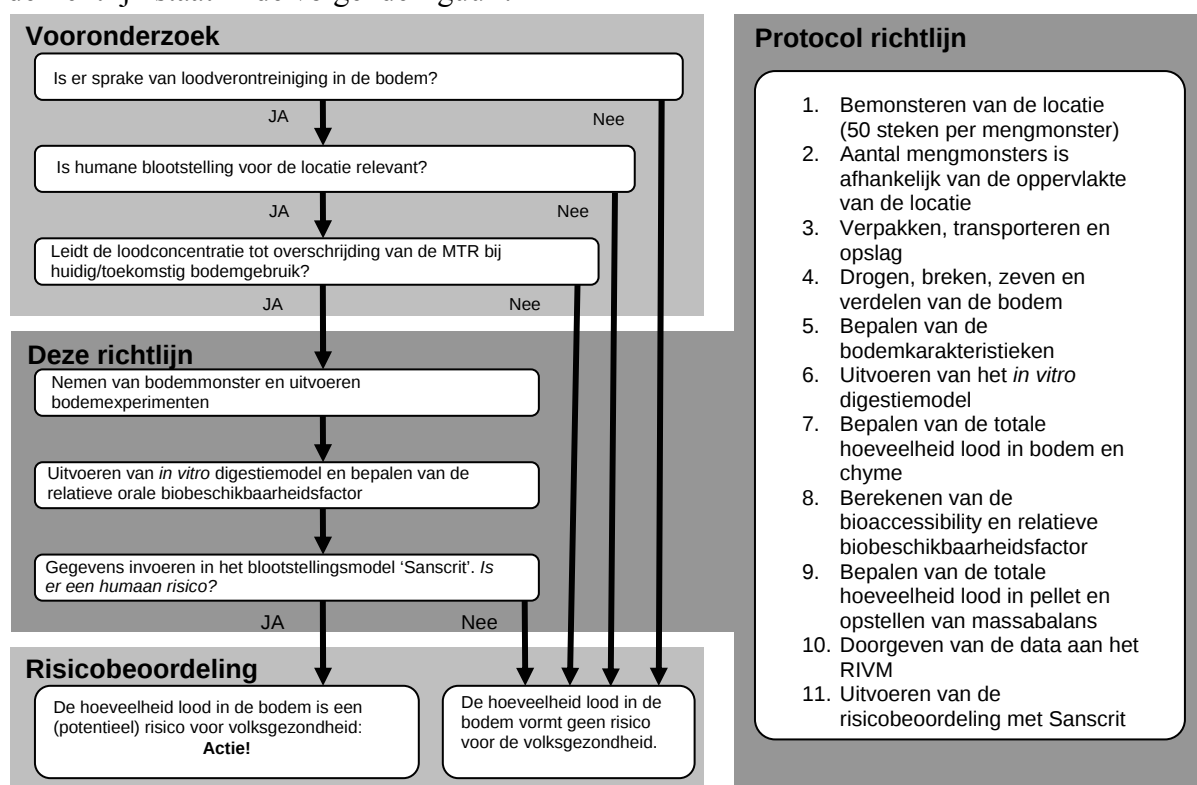
Samenvatting	9
1. Inleiding	11
1.1 <i>Achtergrond</i>	11
1.2 <i>Bioaccessibility en biobeschikbaarheid</i>	11
1.3 <i>Relatieve biobeschikbaarheid</i>	12
2. Methode monsternamen bodem	15
2.1 <i>Wanneer wordt de biobeschikbaarheid van lood uit bodem bepaald?</i>	15
2.2 <i>Welke onderzoeksstrategie is van toepassing?</i>	15
2.3 <i>Onderzoeksstrategie voor de bepaling van de biobeschikbaarheid van lood uit bodem</i>	16
2.3.1 <i>Het verkrijgen van een representatief bodemonmonster van een locatie</i>	16
2.3.2 <i>Diepte van het bodemonmonster</i>	17
2.3.3 <i>Het nemen van bodemonmonsters</i>	18
2.4 <i>Het bewerken van bodemonmonsters</i>	18
2.5 <i>Te bepalen bodemkarakteristieken</i>	19
2.6 <i>Specifieke onderzoeksvragen</i>	20
3. Het <i>in vitro</i> digestiemodel: praktijk	23
3.1 <i>Hoeveelheid in te wegen bodemonmonster</i>	23
3.2 <i>Het bepalen van lood in de bodem en chyme</i>	23
3.3 <i>Berekening van de bioaccessibility en de relatieve biobeschikbaarheidsfactor</i>	24
3.4 <i>Kwaliteitscriteria <i>in vitro</i> digestiemodel</i>	24
3.4.1 <i>Controle op de pH tijdens het experiment</i>	25
3.4.2 <i>Het gebruik van referentiemonsters en blanco's</i>	25
3.4.3 <i>Het meten van de bodemonmonsters in duplo</i>	25
3.4.4 <i>Het maken van een massabalans</i>	26
3.5 <i>Het bepalen van andere elementen in bodem en chyme</i>	26
3.6 <i>Doorgeven van de resultaten</i>	26
4. Risicobeoordeling	29
4.1 <i>Blootstellingsscenario's voor het gebruik van de bodem</i>	29
4.1.1 <i>Wonen met tuin</i>	29
4.1.2 <i>Plaatsen waar kinderen spelen</i>	30
4.1.3 <i>Wonen met moestuin</i>	30
4.2 <i>Risico-index</i>	30
4.3 <i>Het Pica-gedrag bij kinderen</i>	30
5. Schematisch overzicht van deze richtlijn	31
6. Dankwoord	33

Appendix	39
Appendix A - Overzicht van de verschillende NEN-normen	41
Appendix B - Gebruikte afkortingen	43
Appendix C - Termen en definities	45
Appendix D - Protocol <i>in vitro</i> digestiemodel RIVM (SOP 500)	49
Appendix E - S.O.P.: ARO/469: koningswaterdestructie van vaste en vloeibare monsters met behulp van een magnetron (CEM Mars5)	57
Appendix F - SOP LVM: De bepaling van Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sr, Tl, V en Zn met behulp van ICP-MS	63

Samenvatting

Door de lange bewonersgeschiedenis is de bodem op een groot aantal locaties in Nederland verontreinigd met lood. Vooral kinderen krijgen een aanzienlijke hoeveelheid bodem binnen door hand-mondgedrag (naar schatting gemiddeld 100 mg bodem per dag), waardoor lood in de bodem een risico kan vormen voor de volksgezondheid. Daarom zijn interventiewaarden afgeleid, concentraties in de bodem waaronder geen sprake is van een potentieel risico voor de volksgezondheid. Echter, in veel gevallen zal niet al het lood in de bodem na inslikken door het lichaam worden opgenomen en in de bloedbaan terechtkomen (biobeschikbaarheid). Een deel van het lood blijft aan bodemdeeltjes zitten, wordt uitgescheiden via de feces en draagt niet bij aan de toxiciteit. De biobeschikbaarheid van lood in de bodem is afhankelijk van de bodem en de loodverontreiniging. Met een relatief eenvoudig experimenteel model kan de orale humane biobeschikbaarheid van lood uit een specifieke bodem worden geschat waardoor de risicobeoordeling van de betreffende locatie realistischer en in de meeste gevallen minder conservatief wordt.

Dit rapport beschrijft een richtlijn voor het bepalen van de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem. Het doel van deze richtlijn is om de kaders aan te geven voor het nemen van bodemonsters, het uitvoeren van de experimenten en om op basis van de verkregen data een relatieve biobeschikbaarheidsfactor af te leiden die kan worden toegepast binnen de expertbeoordeling van het saneringscriterium voor een risicobeoordeling. Een overzicht van de richtlijn staat in de volgende figuur.



De richtlijn is zowel van toepassing voor externe laboratoria die de biobeschikbaarheid uit bodems willen bepalen als voor het RIVM. Externe laboratoria wordt gevraagd hun verkregen resultaten door te geven aan het RIVM. Door relaties te leggen tussen bodemkarakteristieken en biobeschikbaarheid kan in de toekomst de onderbouwing van de interventiewaarde van lood in de bodem worden verfijnd. Het experimenteel bepalen van de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem kan dan (deels) worden vervangen door een schatting op basis van eenvoudige bodemkarakteristieken.

1. Inleiding

1.1 Achtergrond

Lood wordt in Nederland vaak in de bodem aangetroffen. Vooral kinderen krijgen een aanzienlijk hoeveelheid bodem binnen door hand-mondgedrag (aangenomen wordt gemiddeld 100 mg bodem per dag), waardoor lood in de bodem een risico kan vormen voor de volksgezondheid. De interventiewaarde geeft aan dat er boven een bepaalde grens (voor lood 530 mg/kg bij standaardbodem) sprake is van een potentieel risico voor de volksgezondheid. Bij hogere loodconcentraties in de bodem moet locatiespecifiek worden gekeken naar de mogelijke risico's en of spoedige sanering noodzakelijk is. Eén aspect waarnaar bij overschrijding van de interventiewaarde kan worden gekeken om te onderzoeken of er daadwerkelijk een risico is voor de volksgezondheid, is de humane biobeschikbaarheid van lood na inslikken van de bodem. Immers, een deel van het lood in de bodem kan in het maag-darmkanaal aan bodemdeeltjes blijven zitten en weer worden uitgescheiden in de feces zonder schadelijk te zijn geweest voor de gezondheid. **Deze richtlijn beschrijft hoe onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood uit bodem uitgevoerd dient te worden. Deze richtlijn omvat zowel de bemonstering en bewerking van de bodem het experimenteel bepalen van de bioaccessibility van lood uit bodem, waarbij de resultaten vervolgens gebruikt worden om de relatieve biobeschikbaarheidsfactor te berekenen die kan worden toegepast in de locatiespecifieke risicobeoordeling.** De richtlijn wordt een onderdeel de expertbeoordeling van het Saneringscriterium. Hieronder worden de termen bioaccessibility en biobeschikbaarheid uitgebreid beschreven.

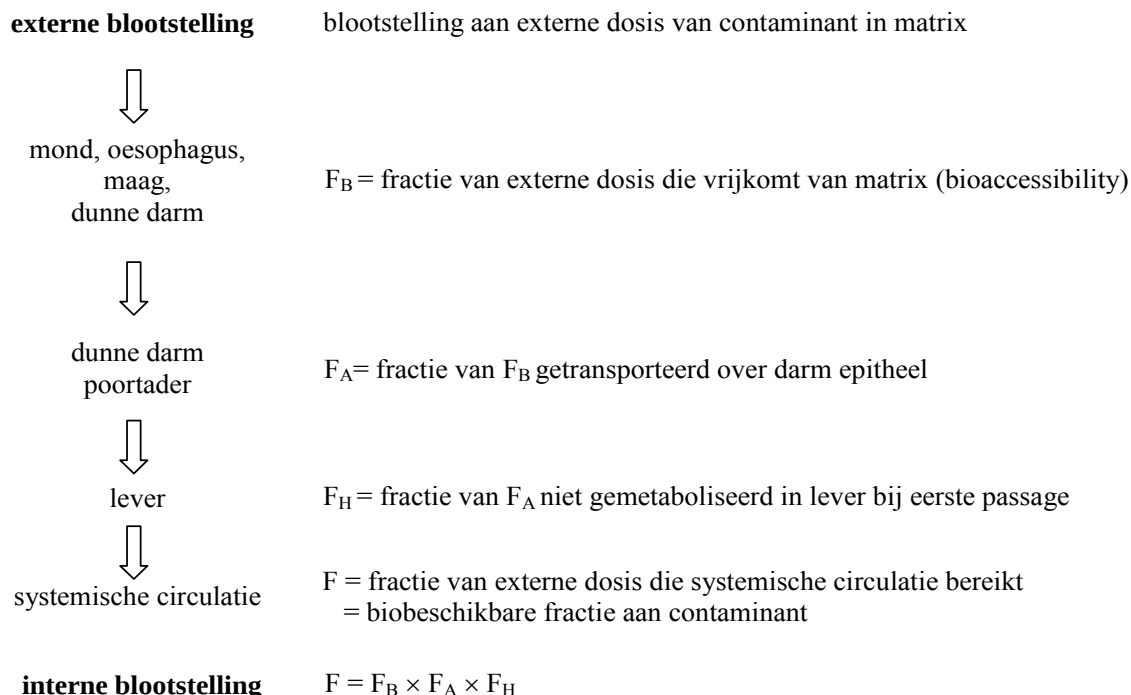
1.2 Bioaccessibility en biobeschikbaarheid

Bioaccessibility is de mate waarin een contaminant tijdens het digestieproces in het maag-darmkanaal van een matrix wordt vrijgemaakt. Hierbij wordt aangenomen dat alleen dat deel dat is vrijgemaakt van de matrix een schatting is van wat maximaal beschikbaar kan komen voor opname in het lichaam en daarmee ook toxiciteit in het lichaam kan veroorzaken. Daarmee kan bioaccessibility beschouwd worden als een indicator voor orale biobeschikbaarheid in de mens.

Orale biobeschikbaarheid (interne blootstelling) van een contaminant uit een matrix kan in vier verschillende deelprocessen worden onderverdeeld (zie Figuur 1):

1. Inname van de contaminant met matrix;
2. Vrijkomen van de contaminant uit de matrix onder invloed van het digestieproces in het maag-darmkanaal (bioaccessibility);
3. Absorptie van de contaminant uit de darm in het bloed;
4. First-pass-effect (metabolisme) in de lever.

Om inzicht te krijgen in het effect van een matrix op de orale biobeschikbaarheid van een contaminant kan naar de bioaccessibility gekeken worden. Er wordt aangenomen dat alleen deze zogenaamde 'vrije' contaminant beschikbaar is om in het lichaam te worden opgenomen en eventueel aanleiding te geven tot (toxische) effecten. Om de orale biobeschikbaarheid (F) van lood uit een matrix, bijvoorbeeld bodem, te bepalen dient men informatie over de verschillende deelprocessen van orale biobeschikbaarheid te verkrijgen (Figuur 1).



Figuur 1: Overzicht van de verschillende deelprocessen die de orale biobeschikbaarheid bepalen. F is de biobeschikbaarheid, F_B de bioaccessibility, F_A de absorptie en F_H het metabolisme.

Informatie over de bioaccessibility van een contaminant uit bodem ($F_{B,soil}$) kan worden verkregen met een *in vitro* digestiemodel. Het RIVM heeft een *in vitro* digestiemodel ontwikkeld, maar er bestaan ook andere modellen. De wetenschappelijke achtergrond van het *in vitro* digestiemodel van het RIVM en een vergelijking met resultaten in dier- en mensenstudies staat beschreven in Oomen et al. (Oomen et al., 2006). Het *in vitro* digestiemodel van het RIVM staat in detail beschreven in Appendix D (Protocol *in vitro* digestiemodel RIVM).

1.3 Relatieve biobeschikbaarheid

Verschillende epidemiologische en toxicologische studies zijn in het verleden uitgevoerd met lood. Aan de hand van deze studies is een Maximaal Toelaatbaar Risico (MTR) afgeleid voor lood van 25 $\mu\text{g/kg}$ lichaamsgewicht/week (oftewel 3,6 $\mu\text{g/kg}$ lichaamsgewicht/dag). Op basis van dit MTR is een interventiewaarde van lood afgeleid van 530 mg/kg voor standaardbodem bij het scenario 'wonen met tuin'. In de belangrijkste MTR-bepalende studies kregen kinderen lood binnen via voeding en water en niet via bodem (Baars et al., 2001). De biobeschikbaarheid van lood uit voeding en water is vaak hoger dan de biobeschikbaarheid van lood dat wordt ingeslikt met bodem. Omdat het inslikken van verontreinigde bodem een belangrijke blootstellingsroute is voor lood, is het zinvol om een correctie toe te passen voor het verschil in biobeschikbaarheid van lood uit voeding en water versus biobeschikbaarheid van lood uit bodem. Dit wordt gedaan met een *relatieve biobeschikbaarheidsfactor*.

De *relatieve orale biobeschikbaarheidsfactor* (Rel F) geeft het factorverschil weer tussen de orale biobeschikbaarheid van lood uit bodem (F_{bodem}) en de orale biobeschikbaarheid van

lood uit de matrix die is gebruikt in de onderbouwende studies van de interventiewaarde (F_{MTR}). De relatieve orale biobeschikbaarheidsfactor (Rel F) kan worden berekend met de volgende vergelijking (1).

$$Rel\ F = \frac{F_{bodem}}{F_{MTR}} = \frac{F_{B, bodem} \times F_{A, bodem} \times F_{H, bodem}}{F_{B, MTR} \times F_{A, MTR} \times F_{H, MTR}} \quad (1)$$

In Oomen et al. is afgeleid hoe de gemeten bioaccessibility ($F_{B, bodem}$) kan worden omgerekend tot een relatieve biobeschikbaarheidsfactor (Oomen et al., 2006).

$$Rel\ F = \frac{F_{bodem}}{F_{MTR}} = 2 \times F_{B, bodem} \quad (2)$$

Met het blootstellingsmodel Sanscrit (gebaseerd op CSOIL: Circulaire bodemsanering 2006; Lijzen et al., 2001) kan de humane blootstelling aan lood uit de bodem worden geschat. In een NoBo-overleg is afgesproken dat de huidige interventiewaarde van standaardbodem en het scenario 'wonen met tuin' op 530 mg/kg blijft staan, waarbij standaard wordt uitgegaan van een relatieve biobeschikbaarheidsfactor van lood uit bodem (Rel F) van 0,74 (VROM, 2006). Dit is het 80-percentiel van de relatieve biobeschikbaarheid van lood van de tot nu toe gemeten bodems, gecombineerd met het 80-percentiel van het verschil tussen gevoede en nuchtere omstandigheden (Oomen et al., 2006). Door de bioaccessibility van lood van een specifieke bodem te bepalen kan de relatieve biobeschikbaarheidsfactor van de betreffende locatie worden berekend. Deze dient te worden ingevoerd in het blootstellingsmodel Sanscrit, om vervolgens de risico-index te bepalen (zie ook hoofdstuk 4).

2. Methode monsternamen bodem

Voor het bepalen van de orale biobeschikbaarheid van lood uit bodem is het van belang de bodem te bemonsteren waaraan mensen, en in het bijzonder kinderen, worden blootgesteld. Daarnaast kunnen argumenten worden aangevoerd voor de haalbaarheid en robuustheid van de methode. Voor de monsternamen van de bodem zal zoveel mogelijk worden aangesloten bij bestaande NEN-normen (zie www.nen.nl). Ook zal in het geval van afwijking van de NEN-norm worden toegelicht waarom de experimenten niet conform NEN worden uitgevoerd. Voor het overzicht zijn alle NEN-normen waaraan in deze richtlijn gerefereerd wordt weergegeven in Appendix A.

2.1 Wanneer wordt de biobeschikbaarheid van lood uit bodem bepaald?

Het is zinvol de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem te bepalen als er sprake is van een potentieel risico voor de volksgezondheid als gevolg van de aanwezigheid van lood. Daarnaast als men vermoedt dat de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem afwijkt dan wordt aangenomen in de afleiding van de interventiewaarde van lood in de bodem. Er is sprake van een potentieel risico voor de volksgezondheid als de loodconcentratie in de bodem de interventiewaarde overschrijdt (> 530 mg/kg) en het een locatie betreft waar (intensief) contact tussen bodem en mens kan worden verwacht.

Het is efficiënt om de bodemmonsters die genomen dienen te worden (conform deze richtlijn) voor biobeschikbaarheidsonderzoek van lood, samen te laten vallen met de monsternamen voor een nader verkennend onderzoek (NVN 5725:1999; NEN 5740:1999) naar de locatie. Als hieruit blijkt dat er geen sprake is van loodverontreiniging (de loodconcentratie in de onderzochte bodemmonsters is lager dan in het saneringscriterium), is er geen sprake van een gezondheidsrisico en kunnen verdere biobeschikbaarheidsanalyses achterwege blijven. Als de loodconcentratie boven de huidige interventiewaarde valt, hoeven niet opnieuw bodemmonsters te worden genomen maar kan direct worden overgegaan op biobeschikbaarheidsonderzoek met de reeds genomen monsters. Het staat iedere instantie echter vrij om te kiezen op welk moment de bodemmonsters worden genomen: al bij het verkennend onderzoek of als blijkt dat nader onderzoek noodzakelijk is.

2.2 Welke onderzoeksstrategie is van toepassing?

Voor het nemen van representatieve bodemmonsters in Nederland wordt verwezen naar de NEN 5740:1999 'Onderzoeksstrategie bij verkennend onderzoek – Onderzoek naar de milieuhygiënische kwaliteit van de bodem'. Hierin staat beschreven dat er eerst vooronderzoek nodig is naar de locatie (NVN 5725:1999). Zo kan van tevoren vast worden gesteld of het te verwachten is dat de bodem verontreinigd is en of de aard van de verontreiniging kan worden vastgesteld. Ook kan (via gemeentelijke voorzieningen) worden onderzocht of er (historische) verontreinigende activiteiten zijn geweest op de te onderzoeken locatie. Deze verontreiniging kan diffuus van aard zijn (stedelijke ophooglagen), of er kan sprake zijn van een verontreinigingskern (lozing e.d.).

Door eeuwenlang gebruik van lood in allerlei producten en materialen is er in Nederland sprake van een grootschalige verontreiniging van de bodem met lood. Deze verontreiniging

heeft veelal een diffuus karakter. Dit wil zeggen dat het lood afkomstig is uit meerdere bronnen en verspreid over grote gebieden. Binnen het gebied zelf zijn verschillen in de loodconcentratie. De locatiespecifieke onderzoeksstrategie die het meest van toepassing is bij onderzoek naar lood in de bodem, is de strategie ‘Verdacht diffuse bodem heterogene verontreiniging’ (VED-HE). Deze strategie is van toepassing bij een verontreiniging van de bodem die wordt gekenmerkt door matig tot veel variatie op de schaal van monsterneming, zonder dat er een duidelijke verontreinigingskern aanwezig is. Voor meer informatie over deze strategie wordt doorverwezen naar de norm NEN 5740:1999.

Mede door de specifieke onderzoeksvraag om de orale biobeschikbaarheid van lood uit de bodem te bepalen, zal deze richtlijn niet volledig conform NEN 5740:1999 en de specifieke onderzoeksstrategie VED-HE lopen. In paragraaf 2.3 staat beschreven op welke manier de bodemmonsters voor het meten van de bioaccessibility van lood uit de bodem moeten worden genomen.

2.3 Onderzoeksstrategie voor de bepaling van de biobeschikbaarheid van lood uit bodem

De bodemmonsters voor onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood in de bodem dienen te worden genomen van relevante gebieden waar (intensief) contact tussen mens en bodem kan optreden. Het gaat vooral om locaties (percelen) in (toekomstige) woonomgevingen.

2.3.1 Het verkrijgen van een representatief bodemmonster van een locatie

Voor het meten van de bioaccessibility van lood in de bodem is het van belang om een representatief monster van de betreffende locatie te krijgen. Om kosten te besparen heeft het de voorkeur een mengmonster samen te stellen uit een groot aantal individuele steken (of boringen) en het aantal (meng)monsters per locatie te beperken. Immers, het humane risico van lood in de bodem is gebaseerd op langdurige blootstelling waarbij kan worden aangenomen dat een kind op meerdere plekken van een bepaalde locatie speelt. Om een representatief monster te verkrijgen, moeten mengmonsters worden samengesteld uit een groot aantal steken. Er is gekozen voor mengmonsters samengesteld uit 50 steken. Het exacte aantal van 50 steken per mengmonster is gekozen omdat dit aansluit bij andere onderzoeksstrategieën zoals de onderzoeksstrategie voor het bepalen van schone grond. Hierin wordt het samenstellen van een mengmonster uit 50 individuele steken goed beschreven (NEN 5740:1999 strategie ‘schone grond; 2×50 steken’). Voor deze richtlijn wordt dezelfde monsternamen aangehouden. Dat wil zeggen dat het noodzakelijk is om per onderzoekslocatie en/of grondvolume (per 1250 m³) twee mengmonsters te analyseren die samengesteld zijn uit 50 individuele steken uit de bovengrond. Deze afzonderlijke steken kunnen aselekt op de bemonsterde locatie worden genomen. Ook kunnen de steken via een van tevoren bepaald systematisch patroon genomen worden. **De verkregen mengmonsters leveren een betrouwbaar gemiddelde van de te toetsen locatie.** De steken hebben een grootte van ongeveer 180 g. Het samenvoegen van de steken resulteert in een mengmonster van circa 9 kg. Het kan voorkomen dat de onderzoekslocatie te klein is, dat de bodem (gedeeltelijk) bedekt is met een niet-doordringbare laag of dat bij het maken van een steek het grondmonster poreus is (zeer laag vocht- en/of lutumgehalte) en uit elkaar valt voordat het monster kan worden opgevangen. Indien het niet mogelijk is om 50 steken te nemen per mengmonster, is het toegestaan om twee mengmonsters van elk zes steken samen te stellen. Hierbij wordt het aangeraden om een steekgrootte aan te houden van 1,5 kg om zo een

mengmonster van 9 kg te verkrijgen (analoog aan NEN 5740:1999 strategie ‘schone grond; 2×50 steken’).

Niet iedere onderzoekslocatie heeft een even groot oppervlak. Om ook de grootte van de locatie mee te nemen in het onderzoek, wordt de formule $1+1n$ voor het aantal te analyseren samengestelde mengmonsters toegepast, waarbij n de grootte van de locatie in hectaren voorstelt. De uitkomst van deze formule geeft weer hoeveel mengmonsters er geanalyseerd dienen te worden per locatie, waarbij ieder mengmonster uit 50 afzonderlijke steken is samengesteld (Tabel 1). Bij kleine onderzoekslocaties van minder dan 1 hectare (achtertuin, moestuin, enzovoort) zijn twee samengestelde mengmonsters (van elk 50 afzonderlijke steken) voldoende. Bij grotere gebieden (bouwrijpe locatie, speelweide, enz.) zal de oppervlakte meer een rol gaan spelen. Met de formule $1+1n$ kan er onafhankelijk van de locatiegrootte een uitspraak worden gedaan over de biobeschikbaarheid van lood in de bodem voor de gehele locatie. Deze formule is conform de methodiek van de onderzoeksstrategie VED-HE (NEN 5740:1999). Als er op de onderzoekslocatie verschillende verontreinigingsgebieden zijn (vooronderzoek en/of zintuiglijke waarneming: kleur, geur en dergelijke), moeten per subgebied aparte boringen (geen mengmonsters) worden genomen. Deze dienen apart te worden geanalyseerd.

Tabel 1: Aantal te analyseren mengmonsters als functie van het oppervlak van de te onderzoeken locatie bij de onderzoeksstrategie voor de richtlijn ‘bepalen van de orale biobeschikbaarheid van lood uit bodems’; n representeert het aantal hectare van de locatie.

Richtlijn biobeschikbaarheid lood	
Oppervlakte Locatie (ha)	50 steken per mengmonster (~ 9 kg) Aantal mengmonsters
≤ 1	2
2	3
5	6
10	11
n	$1+1n$

2.3.2 Diepte van het bodemmonster

Tijdens buitenspelen zullen kinderen in het bijzonder worden blootgesteld aan lood dat zich in de toplaag van de bodem bevindt. Dit is dan ook de meest relevante laag om te bemonsteren. De bovenste 2 cm (waarbij de zogenaamde strooisellaag wordt verwijderd, dat wil zeggen de takjes, blaadjes, grasjes et cetera) komt het meest in contact met de mens. Daarentegen is monsternamen van de eerste 10 cm representatiever voor het totale loodgehalte in de bodem, en is de monsternamen meer robuust. **Daarom zal de bovenste 10 cm als standaard monsterdiepte worden genomen.** Wanneer er echter aanwijzingen zijn dat vooral iets dieper (tot 50 cm) een veel hogere of andersoortige verontreiniging zit, dan moet de monsternamen hierop aangepast worden, zodat ook de bioaccessibility in die laag kan worden bepaald. Immers, deze diepere laag kan door werkzaamheden naar boven worden gebracht.

De monsterdiepte voor onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood in bodems is niet conform NEN 5740:1999.

2.3.3 Het nemen van bodemonsters

De monsterneming van bodem voor de bepaling van het gehalte lood staat beschreven in norm NEN 5742:2001. Deze methode is naast metalen in de bodem ook van toepassing op matig-vluchtige organische verbindingen (kookpunt boven 300°C; onder andere polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK) en polychloorbifenylen (PCB)). Er moet bij elke steek of boring gebruik worden gemaakt van een schone steek of grondboor (geen grondresten van het vorige monster aanwezig). Omdat er onderzoek wordt gedaan naar loodconcentraties in de bodem, is het gebruik van roestige, geverfde en/of gegalvaniseerde instrumenten niet toegestaan. De afzonderlijke boringen of steken kunnen aselekt op de bemonsterde locatie worden genomen. Ook kan er via een van tevoren bepaald systematisch patroon te werk worden gegaan. De mengmonsters (zie Tabel 1) worden in het veld samengesteld uit de individuele boringen of steken. De mengmonsters dienen luchtdicht verpakt te worden in een glazen of kunststof pot, of in een zak.

2.4 Het bewerken van bodemonsters

De monsters worden na monsternamen (koel en donker) getransporteerd naar een geaccrediteerd laboratorium. Hier worden de monsters voorbehandeld voor fysisch-chemische analyse (analoog aan NEN 5709:2006). De grondmonsters kunnen aan de lucht, in een vriesdroger of in een droogstoof (maximaal 40°C) worden gedroogd. Na het drogen kunnen grondmonsters harde brokken vormen. Indien nodig kunnen de grondmonsters na het drogen gebroken worden in een steenbreekmolen, wormschijvenmolen, mortier of met een hamer. Na het breken worden de monsters gezeefd op 2 mm. Als meerdere deelmonsters nodig zijn voor analyse, is het noodzakelijk om het monster in representatieve porties te verdelen. Dit kan zowel met de hand als met een automatische monsterverdeler.

In deze richtlijn wordt de bodem gezeefd op 2 mm, dit wordt in onderstaande paragrafen nader toegelicht. Ook in NEN 5709:2006 wordt de bodem standaard gezeefd op 2 mm. Echter, de norm bevat een extra voorbehandelingsstap als er minder dan 2 g gedroogde bodem per experiment gebruikt wordt (zoals bij het *in vitro*-digestiemodel van het RIVM waar standaard 0,06 g en in sommige gevallen 0,6 g bodem per experiment wordt gebruikt, zie paragraaf 3.1). Conform de NEN-norm is het dan noodzakelijk om de bodem te malen en te verkleinen. Hierna wordt gezeefd op 0,25 mm (250 µm). Om de biobeschikbaarheid van lood uit bodem te bepalen, is het malen en daarmee verkleinen van bodemdeeltjes niet representatief voor de blootstelling. Dit is bijvoorbeeld het geval voor lood in zinkassen en loodglazuur omdat het lood uit kleinere deeltjes beter biobeschikbaar zou kunnen zijn dan lood uit de oorspronkelijke vorm. Het zeven op 0,25 mm en het extra vermalen van bodemdeeltjes zoals in sommige gevallen wordt toegepast in de NEN-norm, wordt daarom niet overgenomen in deze richtlijn.

Uit de literatuur blijkt dat vooral bodemdeeltjes kleiner dan ongeveer 0,25 mm (ook soms wat groter) aan de handen van kinderen blijven zitten (Paustenbach et al., 1997; Roberts, 2004; Sheppard en Evenden, 1994; Kissel et al., 1996; Kissel et al., 1998; Bright et al., 2006; EPA short sheet 2000; Edwards en Liroy, 1999). Dit zou kunnen betekenen dat vooral deze kleinere deeltjes door hand-mondgedrag door kinderen worden ingeslikt. Daarom wordt in een ISO-richtlijn (ISO, 2006) aanbevolen om voor biobeschikbaarheidsonderzoek bij 'normale bodemingestie' (geen Pica-gedrag) de bodem te zeven op 0,25 mm. Het ISO-document geeft wel aan dat er verschillen bestaan tussen landen en dat er met reden van deze aanbeveling kan worden afgeweken. Ook de US-EPA beveelt aan om de bodem voor biobeschikbaarheidsonderzoek te zeven op 0,25 mm (EPA, 1999). Het is echter onduidelijk

of 0,25 mm inderdaad de meest relevante fractie is. Dit wordt in de volgende paragraaf verder bediscussieerd.

Er wordt aangenomen dat een kind dagelijks gemiddeld 100 mg bodem inslikt (Lijzen et al., 2001; Otte et al., 2001). Dit is gebaseerd op tracerstudies waarbij is onderzocht hoeveel van een element dat typerend is voor bodem, terug wordt gevonden in de feces van kinderen. Deze tracerstudies geven geen informatie over de grootte van de bodemdeeltjes die door kinderen worden ingeslikt. Het is waarschijnlijk dat vooral kleine bodemdeeltjes worden ingeslikt tijdens hand-mondgedrag, maar het inslikken van enkele grote bodemdeeltjes draagt relatief veel bij aan de normale dagelijkse bodeminname van 100 mg. Het (geheel) uitsluiten van bodemdeeltjes tussen de 0,25 mm en 2 mm is daarom niet wenselijk.

Het is wel bekend dat verschillende bodemfracties tot een verschillende biobeschikbaarheid van lood kunnen leiden. Er zijn twee studies bekend die hiernaar onderzoek hebben verricht. Ten eerste bleek uit een recent onderzoek met het *in vitro* digestiemodel van het RIVM waarbij twee verschillende bodemfracties werden onderzocht (<4 mm en $< 0,05$ mm; 0,6 g bodem per digestie) dat de biobeschikbaarheid van lood hoger was uit de 4 mm-fractie (gemiddeld 15,4%) dan uit de 0,05 mm-fractie (gemiddeld 4,2%) (Ljung et al., 2007). In een ander onderzoek door Morrison en Gulson (2007) was de trend net andersom: 45% bioaccessibility voor de deeltjes kleiner dan 0,25 mm en 75% bioaccessibility voor deeltjes kleiner dan 0,053 en groter dan 0,032 mm. De bodem- en looideigenschappen zijn waarschijnlijk bepalend voor de verschillen in bioaccessibility. Omdat verschillende bodemfracties tot verschillende bioaccessibility kunnen leiden, is het van belang om een bewuste keus te maken over de deeltjesgrootte waarop gezeefd moet worden in deze richtlijn.

In het biobeschikbaarheidsonderzoek tot nu toe zijn de bodems gezeefd op 2 mm (Oomen et al., 2006). Het zeven op een andere grootte dan 2 mm zal leiden tot verschillende loodgehaltes in het vooronderzoek volgens NEN 5709:2006 en het onderzoek om de biobeschikbaarheid van lood te bepalen, wat tot verwarring kan leiden. Deeltjes groter dan 2 mm worden waarschijnlijk zelden ingeslikt door kinderen, omdat dit grotere deeltjes zijn zoals steentjes, takjes en scherfjes. Vanwege bovengenoemde praktische aspecten en omdat het zeven op 0,25 mm zowel voor- als nadelen heeft wordt vooralsnog besloten te zeven op 2 mm. Indien er in de toekomst duidelijke aanwijzingen komen dat beter op een andere grootte kan worden gezeefd, kan dit worden aangepast.

2.5 Te bepalen bodemkarakteristieken

Het is aangetoond dat de orale biobeschikbaarheid van lood in de bodem beïnvloed wordt door de aard en herkomst van het bodemmateriaal. Zo is de orale biobeschikbaarheid van lood in verontreinigde bodems afhankelijk van de bodem pH, de hoeveelheid organische stof, klei (lutum) en carbonaten in de bodem (Oomen et al., 2006). Ook de kationenuitwisselingscapaciteit van de bodem beïnvloedt de orale biobeschikbaarheid van lood. Om in de toekomst relaties af te kunnen leiden tussen bioaccessibility en bodemkarakteristieken is het van belang enkele bodemkarakteristieken te bepalen. Daarom is het raadzaam om bij het bepalen van de orale biobeschikbaarheid van lood uit bodem de volgende bodemkarakteristieken te analyseren met standaard NEN-methoden:

1. Het organisch-stofgehalte: het gehalte organische stof kan bepaald worden met de gloeiverliesmethode (NEN 5754:2005 Bepaling organische stof op massabasis volgens gloeiverliesmethode).

2. Het lutumgehalte: Het lutumgehalte (kleigehalte) van een bodem kan worden bepaald met een pipet bezinkproef (NEN 5753:2006 Bepaling lutum en korrelgrootteverdeling met zeef en pipet).
3. De bodem pH: De pH van de bodem kan bepaald worden met een pH-meter in een bodemslurrie van bodem met water (NEN-ISO 10390:2005 Bepaling pH-waarde bodem). In NoBo (Normstelling en Bodemkwaliteitsbeoordeling) afgesproken om de pH van de bodem te bepalen met de CaCl_2 -methode. Dit zal daarom worden aangehouden.
4. Het calciumcarbonaat(CaCO_3)-gehalte van de bodem: Het gehalte calciumcarbonaat kan worden bepaald met thermogravimetrische analyse (NEN 5752:1995 bepaling carbonaten gravische methode).

Optioneel kan ook nog gekozen worden voor het bepalen van de (potentiële) kationenuitwisselingscapaciteit van de grond. Deze methode heeft als nadeel dat de kosten relatief hoog zijn.

5. De (potentiële) kationenuitwisselingscapaciteit, ook wel Cation Exchange Capacity (CEC) genoemd, kan bepaald worden volgens NEN 5780:1996 (Bepaling van de potentiële kationenuitwisselingscapaciteit in grond).

In 2007 is een project gestart waarin wordt gekeken naar de bioaccessibility van lood uit stedelijke ophooglagen. Het doel van dit project is om met het *in vitro* digestiemodel de bioaccessibility van stedelijke ophooglagen te bepalen. Ook zullen bodemkarakteristieken van de stedelijke ophooglagen bepaald worden. Door bodemkarakteristieken te combineren met bioaccessibility-gegevens zal getracht worden een generieke factor af te leiden van de orale biobeschikbaarheid van lood in (bepaalde typen) ophooglagen. De uitkomsten van deze studie zullen worden gebruikt om op basis van enkele bodemeigenschappen een relatieve biobeschikbaarheidsfactor van lood uit bodem toe te kennen.

Naast het bepalen van de bodemkarakteristieken zal dit onderzoek ook kijken naar de chemische vorm van het lood (loodkarakteristieken). Er zijn in de geschiedenis verschillende gebieden verontreinigd met lood van verschillende herkomst. Zo is er lood uit bouwafval, uit steenkoolas, uit glazuur, van industriële activiteiten (heden en verleden). Het lood kan in verschillende chemische vormen aanwezig zijn in de vervuilde bodems. Deze verschillen kunnen effect hebben op de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem. Het onderzoek richt zich naast het effect van bodemtype op bioaccessibility ook op de relatie tussen de chemische vorm van lood en de bioaccessibility uit die bodem. Met de uitkomst van dit onderzoek is wellicht een relatie tussen bioaccessibility en loodkarakteristieken af te leiden, waardoor in de toekomst op basis van loodkarakteristieken een voorspelling kan worden gemaakt van de bioaccessibility van lood in de bodem. Op deze manier kan informatie over de biobeschikbaarheid van lood uit bodem in een eerder stadium en met minder kosten worden toegepast in de risicobeoordeling. De uitkomsten van de studie naar de bioaccessibility van lood in stedelijke ophooglagen kunnen worden gebruikt om te concluderen welke loodkarakteristieken en bodemkarakteristieken van belang zijn om te bepalen.

2.6 Specifieke onderzoeksvragen

Niet al het bodemonderzoek naar de bioaccessibility van lood zal precies dezelfde onderzoeksvraag hebben. Daarom moet ook goed naar het doel van het onderzoek worden

gekeken voor het volgen van deze richtlijn (nemen van de bodemmonsters, monsterbewerking, en dergelijke). Deze richtlijn is bedoeld voor onderzoek naar locaties waarvan bekend is dat de concentratie lood in de bodem boven de interventiewaarde ligt (530 mg/kg bodem). Door 50 steken per mengmonster te nemen wordt een zo homogeen mogelijk mengmonster verkregen.

Deze richtlijn is niet geschikt om bijvoorbeeld de bioaccessibility van lood uit verschillende bodemtypen te bepalen die zijn verontreinigd met verschillende loodbronnen. Hierbij is het van belang om niet een gemiddeld monster (mengmonster van 50 steken) te onderzoeken, maar juist om van meerdere individuele boringen afzonderlijk het effect van bodem en loodkarakteristieken op de bioaccessibility van lood te bepalen.

Als de concentratie van lood lager is dan de interventiewaarde, is het vanuit de humane risicobeoordeling niet meer van belang om de bioaccessibility van lood uit de bodem te bepalen. Immers, ook bij een relatieve biobeschikbaarheid van 1 (het lood uit de bodem is even beschikbaar als lood uit voeding en water) zal er geen risico voor de volksgezondheid zijn. Deze richtlijn zal dus altijd bij het doel van het onderzoek moeten passen: het onderzoek naar de actuele risico's van locaties waarvan bekend is dat de concentratie lood in de bodem boven de interventiewaarde ligt.

3. Het *in vitro* digestiemodel: praktijk

In Appendix D staat het *in vitro* digestiemodel van het RIVM in detail beschreven. Met dit fysiologische model kunnen verschillende situaties worden nagebootst. Het model kan zowel de nuchtere als de gevoede toestand nabootsen. Bij onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood uit bodem wordt standaard het maag-darmkanaal onder nuchtere condities gesimuleerd. Na afloop van het experiment wordt de loodconcentratie in het chyme (de bovenliggende vloeistof na de centrifugestap) bepaald. Deze fractie is vrijgemaakt uit de bodem en representeert het *bioaccessible* lood.

3.1 Hoeveelheid in te wegen bodemmonster

Het wordt aanbevolen om een kleine hoeveelheid bodem (0,06 g) te gebruiken per digestiebuis. De vergelijking van data van dier- en mensexperimenten toonden voor deze hoeveelheid bodem per digestiebuis een betere correlatie dan voor 0,6 g bodem per digestiebuis (Oomen et al., 2006). De oorzaak hiervan is waarschijnlijk dat bodem de pH van het digestie-experiment beïnvloedt, en daarmee de bioaccessibility. Beïnvloeding van de pH wordt in verreweg de meeste gevallen voorkomen door een kleine hoeveelheid bodem per digestiebuis te gebruiken. Tevens wordt met 0,06 g bodem per digestiebuis de hoeveelheid bodem dat een kind dagelijks inslikt en in het maag-darmkanaal terechtkomt beter benaderd (Oomen et al., 2006).

Echter, er zijn situaties waarbij het niet wenselijk is zulke kleine hoeveelheden bodem per experiment (digestiebuis) te gebruiken. Voorbeelden hiervan zijn als de bodem erg inhomogeen is, of als er problemen zijn met de analyse van lood in het digestiesap. In dergelijke gevallen is het mogelijk toch 0,6 g bodem per digestiebuis te gebruiken. Voorwaarde is wel dat de pH tijdens het digestie-experiment binnen bepaalde ranges moet liggen (zie kwaliteitscriteria).

Standaard wordt dus 0,06 g bodem gebruikt voor het bioaccessibility-experiment. Bij inhomogene monsters kan een uitzondering gemaakt worden door 0,6 g in te wegen.

3.2 Het bepalen van lood in de bodem en chyme

De hoeveelheid lood in de bodem moet worden gemeten door middel van destructie van de bodem. Deze hoeveelheid wordt gebruikt om de bioaccessible loodfractie te berekenen. De ontsluiting van lood (en andere elementen) uit de bodemmonsters staat beschreven in NEN 6961:2005; RIVM protocol Appendix E. In een ontsluitingsvat wordt maximaal 3 tot 5 g gedroogde grond ontsloten met koningswater (aqua regia). Dit bestaat uit 3 delen zoutzuur (HCl; 37%) en 1 deel salpeterzuur (HNO₃; 65%), eventueel met een paar druppels antischuimmiddel (n-dodecaan). Het gewicht van het ontsluitingsvat met bodemmonster en koningswater wordt vooraf bepaald. Na de ontsluiting en na afkoeling wordt er weer gewogen. Het massaverlies hoort in overeenstemming te zijn met gedocumenteerd referentiemateriaal. De bovenstaande (heldere) oplossing wordt gebruikt om de concentratie van lood middels ICP-MS te bepalen (NEN-EN-ISO 17294-2:2004).

Ook het lood in het chyme wordt met de ICP-MS methode bepaald. Dit chyme dient echter wel 10 maal te worden verdund met 0,1 M HNO₃ omdat het chyme anders stoort bij de analyse. Voor analyse kan het chyme worden opgeslagen bij -20°C.

3.3 Berekening van de bioaccessibility en de relatieve biobeschikbaarheidsfactor

De bioaccessibility van lood uit bodem kan bepaald worden als de totale hoeveelheid lood in het chyme en in de originele bodem bepaald is. De bioaccessibility ($F_{B,bodem}$, dimensieloos) wordt berekend door de totale hoeveelheid lood in het chyme (totaal Pb_{chyme}) te delen door de totale hoeveelheid lood in de bodem (totaal Pb_{bodem}).

$$F_{B,bodem} = \frac{\text{totaal Pb}_{\text{chyme}}}{\text{totaal Pb}_{\text{bodem}}} \quad (3)$$

Het verkregen getal (tussen 0 en 1) geeft de bioaccessibility weer. Als extra kwaliteitscontrole kan ook het totaalgehalte lood in het pellet (bodemresidu na afdraaien digestiebuis) bepaald worden en kan er een massabalans worden opgemaakt. Immers, het totaalgehalte lood in de bodem (uitgangsmateriaal) moet gelijk zijn aan de het totaalgehalte lood in het pellet en chyme samen. Wanneer en hoe deze massabalans dient te worden berekend staat beschreven in paragraaf 3.4.4.

De bioaccessibility van lood uit de bodem dient altijd berekend te worden door het totaalgehalte lood uit chyme te delen door het totaalgehalte lood uit de bodem (en niet het totaalgehalte uit pellet en chyme samen, wat theoretisch gelijk is aan het totaalgehalte lood uit de bodem). Het uitvoeren van een massabalans dient alleen als extra kwaliteitscontrole.

Naast de bioaccessibility dient ook de relatieve biobeschikbaarheidsfactor te worden berekend. In paragraaf 1.3 staat uitgelegd dat de orale biobeschikbaarheid van lood uit voeding en water is vaak hoger is dan de orale biobeschikbaarheid van lood uit de bodem. Om de orale biobeschikbaarheid van lood uit de bodem te bepalen moet hierdoor een correctie worden toegepast. De afleiding van deze vergelijking staat beschreven in Oomen et al. (Oomen et al., 2006). Dit wordt gedaan met de *relatieve biobeschikbaarheidsfactor* (RelF). Voor lood geldt:

$$Rel F = \frac{F_{bodem}}{F_{MTR}} = 2 \times F_{B,bodem} \quad (4)$$

Uit formule 4 kan worden opgemaakt dat de relatieve biobeschikbaarheidsfactor van lood in de bodem een verdubbeling is van de bioaccessibility. Deze waarde wordt gebruikt om middels het blootstellingsmodel Sanscrit de humane blootstelling aan lood uit de bodem te schatten (zie hoofdstuk 4).

3.4 Kwaliteitscriteria *in vitro* digestiemodel

Het is noodzakelijk er zeker van te zijn dat het *in vitro* digestie-experiment goed is verlopen. In het algemeen kan worden gesteld dat men natuurlijk dient aan te sluiten bij de werkwijze van Good Laboratory Practice (GLP). Daarnaast zijn nog een aantal specifieke criteria te onderscheiden, te weten de pH tijdens het experiment (paragraaf 3.4.1), blanco en

referentiemonsters (paragraaf 3.4.2), duplo monsters (paragraaf 3.4.3) en het maken van een massabalans (paragraaf 3.4.4).

3.4.1 Controle op de pH tijdens het experiment

Gedurende het *in vitro* digestiemodel moet de pH van de verschillende fasen binnen de voorafgestelde waarden liggen. De pH in de maagfase moet $1,5 \pm 0,5$ zijn, de pH in de darmfase $6,0 \pm 0,5$. Als de pH bij aanvang van de betreffende fase niet in de goede range ligt, is het mogelijk met HCl of NaOH de pH bij te stellen. Dit dient wel opgenomen te worden in het verslag. Blanco controlemonsters (geen bodemmonster, alleen de verschillende sappen) mogen niet gesteld worden, en moeten wel aan de gestelde pH-ranges voldoen. Het protocol van de *in vitro* digestiemethode is als bijlage toegevoegd.

3.4.2 Het gebruik van referentiemonsters en blanco's

Bij ieder experiment worden een of meerdere referentiebodems meegenomen. De referentiebodems die tot op heden zijn gebruikt zijn commercieel gekocht bij de National Institute for Standardization and Technology (NIST, USA), een instituut dat referentiemonsters maakt voor allerlei wetenschappelijke toepassingen. Echter, de betreffende bodems zijn op (Montana soil 2711) of bijna op (Montana soil 2710). Er zijn nog geen nieuwe algemene toegepaste referentiebodems ontwikkeld en daarmee is het dus nog onduidelijk welke referentiebodems in de toekomst moeten worden gebruikt, en wat de bioaccessibility (met een bepaalde range) moet zijn om als kwaliteitscriterium te kunnen worden gebruikt. Door BARGE, een ringstudiegroep die in internationaal verband bioaccessibility studies uitvoert, zal NIST gevraagd worden een nieuwe grote batch van een referentiebodem te maken. De kwaliteitscriteria voor dit nieuw te maken referentiemonster moet nog worden opgesteld. Als het referentiemonster door NIST gemaakt is, is de bodem voor ieder instituut verkrijgbaar. Nadere informatie over de actuele stand van zaken over de referentiemonsters kan worden verkregen bij het RIVM (auteurs van het rapport).

Bij ieder experiment moet in ieder geval één blanco monster worden meegenomen. Dit bestaat uit een digestiebuis zonder bodemmonster waaraan de normale hoeveelheden digestiesappen tijdens het experiment worden toegevoegd. De hoeveelheid lood die in het blanco monster wordt gemeten, moet verwaarloosbaar zijn ten opzichte van de gemeten bioaccessibilitywaarden. Dit geeft aan dat het lood in de andere monsters afkomstig is van de bodem en niet van een andere bron.

3.4.3 Het meten van de bodemmonsters in duplo

Iedere bodem dient minimaal in duplo te worden gemeten, dat wil zeggen dat dezelfde hoeveelheid bodemmonster in twee verschillende digestiebuizen wordt afgewogen en waarmee met beide een digestie wordt uitgevoerd. De bioaccessibility van het lood moet in beide buizen vergelijkbaar zijn (een spreiding van maximaal 20% is hierbij acceptabel).

Bij twijfel over de juistheid van het analyseresultaat kan worden bekeken of er sprake is van een uitschieter. Daartoe kunnen de volgende twee stappen doorlopen worden:

1. Heranalyse van het reeds beschikbare monster waarin de uitschietende waarde is gevonden;
2. Eenmalige herbemonstering en analyse van dezelfde locatie.

De heranalyse dient tweemaal te worden uitgevoerd (twee verschillende experimenten op verschillende dagen) en goed met elkaar overeen te komen (spreiding 20%). Wanneer de

waarde van de heranalyses een andere waarde oplevert dan de uitschietende waarde, moet besloten worden om het geheranalyseerde resultaat als maatgevend te beschouwen.

3.4.4 Het maken van een massabalans

Als extra kwaliteitscontrole bij bioaccessibility-experimenten dient een massabalans te worden gemaakt bij minimaal 1 op de 10 bodemmonsters. Dit houdt in dat van ieder tiende monster naast het totaalgehalte van lood in de originele bodem en in het chyme ook het pellet na de *in vitro* digestie moet worden geanalyseerd. Ook bij inhomogene monsters (bijvoorbeeld zingassen, scherfjes e.d.) dient een massabalans te worden berekend.

Een massabalans wordt als volgt opgesteld:

$$\text{Totaal lood bodem} = (\text{totaal lood chyme}) + (\text{totaal lood pellet}) \quad (5)$$

Het totaalgehalte lood in de ingewogen bodem (uitgangsmateriaal) moet gelijk zijn (met een onzekerheidsmarge) aan het totaalgehalte lood in de pellet en chyme samen. Als voorlopige onzekerheidsmarge op de massabalans wordt aangehouden dat de gemeten hoeveelheid lood in de bodem en de gemeten hoeveelheid lood in pellet + chyme tussen de 80% en 120% mogen liggen.

3.5 Het bepalen van andere elementen in bodem en chyme

Bodemmonsters kunnen naast lood ook andere metalen bevatten. De bioaccessibility van deze metalen kan ook met het *in vitro* digestiemodel worden onderzocht door in het chyme en de bodem niet alleen lood, maar ook andere elementen te analyseren. De informatie over andere elementen dan lood is met weinig extra inspanning verkrijgbaar. Echter, wat de bioaccessibility van de andere elementen betekent voor de risicobeoordeling (wat is de relatieve biobeschikbaarheidsfactor?) is nog niet uitgezocht doordat de relatieve biobeschikbaarheids factor nog niet bepaald is. Hierdoor kunnen gegevens over andere elementen nog niet worden toegepast in de risicobeoordeling. Het analyseren van andere elementen is daarom optioneel.

3.6 Doorgeven van de resultaten

Omdat de methodiek van de *in vitro* digestie in de openbare wetenschappelijke literatuur is gepubliceerd, kunnen andere laboratoria deze methodiek zelf toepassen. Voor het afleiden van relaties tussen bioaccessibility en bodemkarakteristieken is het van groot belang dat informatie over de bodemkarakteristieken en de bioaccessibility aan het RIVM wordt doorgegeven¹. Hiermee kan het RIVM een database vullen waarmee het op den duur mogelijk is relaties tussen bodemkarakteristieken en bioaccessibility (beter) af te leiden. Op deze manier kan van meer bodems een goede schatting van de relatieve biobeschikbaarheid worden gemaakt zonder experimenteel werk te verrichten, waardoor informatie over biobeschikbaarheid vaker kan worden toegepast zonder extra kosten. Het RIVM zal hierbij de betreffende bodem vertrouwelijk behandelen. De database zal onderdeel gaan vormen van de risicoolbox voor een saneringscriterium.

¹ De data kunnen naar de auteurs van dit rapport gestuurd worden. In de toekomst zal in Sanscrit een optie worden ingebouwd om data terug te koppelen naar het RIVM.

Indien geen of onvoldoende bodemkarakteristieken zijn bepaald, kan worden gevraagd een bodemonmonster op te sturen zodat deze bodemkarakteristieken door het RIVM kunnen worden bepaald. Op deze manier is het mogelijk op relatief eenvoudige wijze de database te vullen met informatie over de bioaccessibility en bodemkarakteristieken van Nederlandse bodems. Algemene relaties die hieruit kunnen worden afgeleid, kunnen worden gebruikt om aan te geven voor welke bodems het zinvol is om de bioaccessibility van lood te bepalen, of aan welke bodemkarakteristieken een bodem moet voldoen om een bovengrens van de bioaccessibility en de relatieve biobeschikbaarheidsfactor af te leiden. Uit de huidige (beperkte) dataset blijkt dat bodems met een hoog organisch-stofgehalte over het algemeen een lagere bioaccessibility van lood laten zien (Oomen et al., 2006). Zo kan al een standaardwaarde voor een relatieve biobeschikbaarheidsfactor worden afgeleid voor bodem met een organisch-stofgehalte >20%. Omdat de meeste Nederlandse bodems een lager organisch-stofgehalte hebben (met uitzonderingen zoals toemaakdekken) kan dit nog niet vaak worden toegepast. Echter, bij een grotere database is het mogelijk nauwkeuriger relaties af te leiden die een grotere toepasbaarheid hebben. Zowel bodemkarakteristieken als de aard van de loodverontreiniging (herkomst en speciatie van lood) zullen er aan bijdragen dat een generieke factor kan worden afgeleid om de orale biobeschikbaarheid van lood uit bodems te schatten zonder experimenten te hoeven doen.

4. Risicobeoordeling

Met Sanscrit kan onder meer de humane blootstelling aan lood uit de bodem worden geschat (Sanscrit: gebaseerd op CSOIL: Circulaire bodemsanering 2006; Lijzen et al., 2001; Brand et al., 2007). Voor dit blootstellingsmodel wordt een toxicologische grenswaarde voor lood gebruikt. Wanneer deze grenswaarde overschreden wordt door de berekende blootstelling, is er sprake van een potentieel humaan risico. De toxicologische grenswaarde voor blootstelling aan lood, het Maximaal Toelaatbaar Risico (MTR), is gebaseerd op studies waar een inname van 25 µg lood/kg lichaamsgewicht/week bij kinderen niet leidde tot een toename in het loodbloedgehalte (Baars et al., 2001; Oomen et al., 2006). Ook internationaal wordt dezelfde grenswaarde voor lood gehanteerd. De blootstelling van de mens bij gebruik van verontreinigde bodem per locatie (perceel) kan worden bepaald in Sanscrit. Hiermee is het mogelijk een locatiespecifieke beoordeling te geven van lood in de bodem. De blootstelling van lood uit bodem is gericht op kinderen (0-6 jaar), omdat zij de risicogroep vormen.

4.1 Blootstellingsscenario's voor het gebruik van de bodem

Om een risicobeoordeling te maken is het belangrijk dat ook het gebruik van de betreffende bodem door de mens wordt bepaald. Zo zijn er verschillende scenario's ontwikkeld in Sanscrit die allen een verschillende gebruiksintensiteit en dus blootstelling hebben (Brand et al., 2007). Voorbeelden van scenario's die relevant zijn voor bodemingestie zijn 'wonen met tuin', 'plaatsen waar kinderen spelen' en 'wonen met moestuin' (Tabel 2). Voor de andere scenario's is een lagere grondingestie van toepassing (20 mg/dag).

Tabel 2: De bijdrage van verschillende blootstellingsroutes (Brand et al., 2007).

Scenario	Blootstelling voor	Blootstelling via gewas (% van totaal)*	Blootstelling via directe ingestie van bodemdeeltjes (mg/dag)	Blootstelling overig (%)
Wonen met tuin	Kind	10	100	< 1
Plaatsen waar kinderen spelen	Kind	0	100	< 1
Wonen met moestuin	Kind	100/50**	100	< 1

* Alleen de blootstelling aan bodemdeeltjes via gewas dat in eigen tuin is verbouwd wordt meegenomen.

** 100% van de bladgewassen en 50% van de knolgewassen wordt uit eigen tuin geconsumeerd.

4.1.1 Wonen met tuin

Het scenario 'wonen met tuin' is het scenario dat is gebruikt bij de afleiding van interventiewaarden. In dit scenario wordt aangenomen dat de huizen waarin mensen wonen een tuin hebben en dat mogelijk een deel van de geconsumeerde groente uit deze tuin afkomstig is. Bij de afleiding van interventiewaarden wordt aangenomen, dat 10% van de geconsumeerde groente uit eigen tuin komt. Volgens de huidige inzichten slikken kinderen gemiddeld 100 mg bodem per dag in. Op het niveau van de interventiewaarde wordt de blootstelling van mensen (kinderen) in dit scenario voor het grootste gedeelte veroorzaakt door de consumptie van gewassen uit eigen tuin (43%) en de directe ingestie van bodemdeeltjes (57%).

4.1.2 Plaatsen waar kinderen spelen

Het scenario 'plaatsen waar kinderen spelen' omvat plaatsen waar vaak kinderen spelen zoals speeltuinen, grasveldjes en tuinen vlakbij school. De bodemingestie is gelijk aan het scenario 'wonen met tuin', 100 mg/dag, alleen is er geen blootstelling via gewasconsumptie.

4.1.3 Wonen met moestuin

In het scenario 'wonen met moestuin' wordt aangenomen dat een groot deel (50% wortelgroente en 100% bladgroente) van de dagelijks geconsumeerde groente uit eigen tuin afkomstig is. Daarnaast is de directe ingestie van bodemdeeltjes even hoog als bij het scenario 'wonen met tuin' (100 mg/dag voor kinderen).

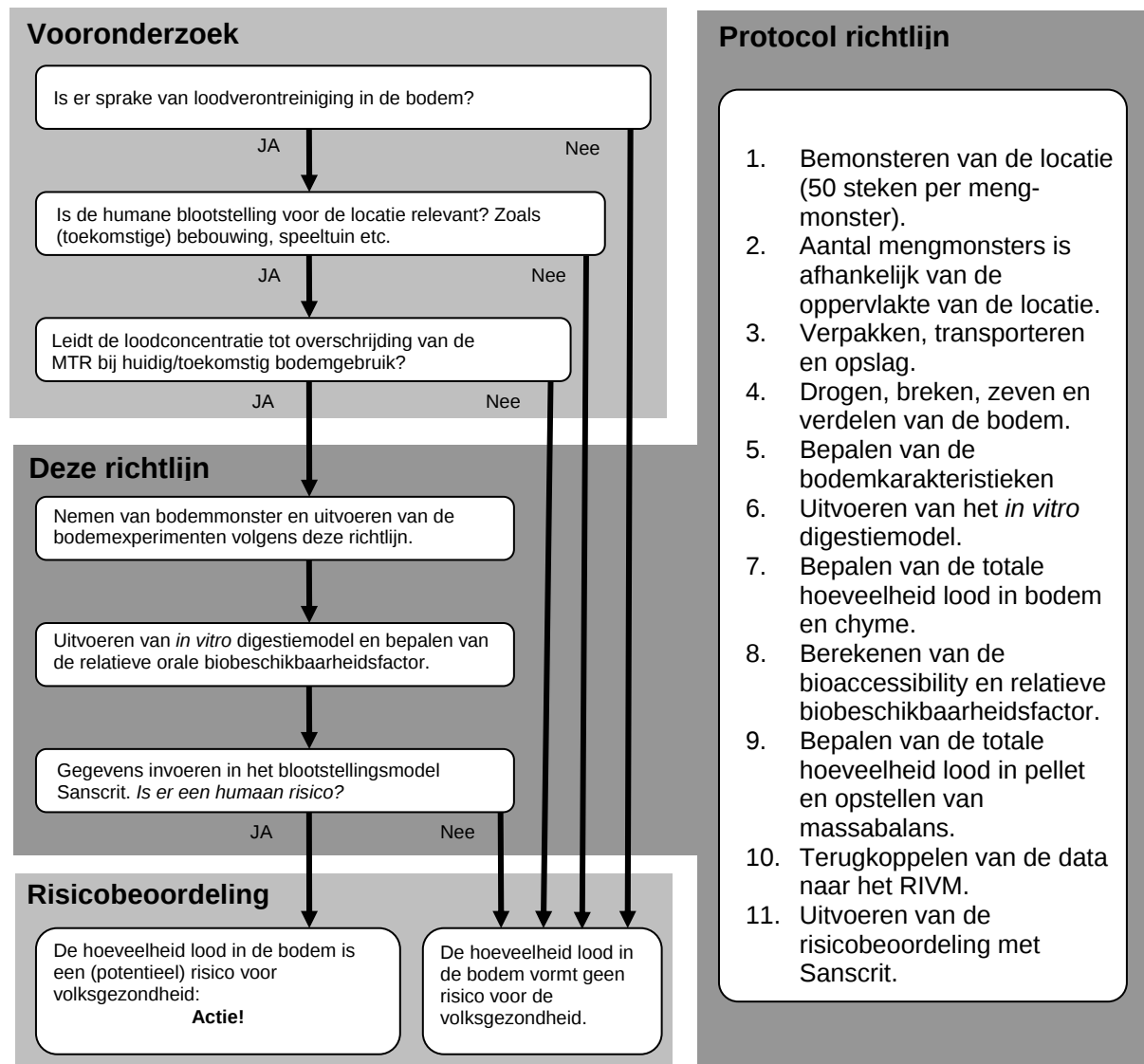
4.2 Risico-index

Met Sanscrit wordt de blootstelling van een kind aan lood via verschillende blootstellingsroutes geschat bij verschillende scenario's (zie voorgaande paragrafen). Door in de expertbeoordeling (stap 3) onder andere de loodconcentratie en de relatieve biobeschikbaarheid van lood in de bodem van de betreffende locatie in te voeren wordt een locatiespecifieke risicobeoordeling uitgevoerd (zie Circulaire 2006). Uiteindelijk is er sprake van een actueel risico en 'met spoed saneren' indien Sanscrit aangeeft dat de 'risico-index' groter is dan 1.

4.3 Het Pica-gedrag bij kinderen

De huidige risicobeoordeling van verontreinigde bodem gaat uit van de gemiddelde dagelijkse opname van grond door een kind (100 mg/dag). Hierbij is geen rekening gehouden met het zogenoemde 'Pica-gedrag'. Dit gedrag houdt in dat kinderen expres (grote hoeveelheden) bodem inslikken. Er zijn gevallen van Pica-gedrag bekend waar een kind enkele grammen bodem per dag in heeft geslikt, zelfs tot 60 g per dag (Calabrese et al., 1999). Het is aannemelijk dat bodemingestie van 1 g per dag regelmatig voorkomt, met name bij jonge kinderen (1 tot 2 jaar oud) (Baars, 2007). Dit kan acute toxiciteit van een stof als lood tot gevolg hebben (Baars, 2007). Om in de risicobeoordeling rekening te houden met Pica-gedrag bij kinderen, zou in Sanscrit het scenario 'Pica-gedrag' kunnen worden ontwikkeld. Naast het implementeren van Pica-gedrag in Sanscrit, zouden optioneel ook extra experimenten uitgevoerd kunnen worden om de relatieve biobeschikbaarheid van lood uit bodem bij Pica-gedrag te bepalen. Hierbij zal de hoeveelheid bodem per experiment moeten worden aangepast ten opzichte van deze richtlijn, bijvoorbeeld naar 0,6 g bodem per digestiebuis, wat ruwweg overeenkomt met een ingestie van 1 g bodem in één keer.

5. Schematisch overzicht van deze richtlijn



Figuur 2: Stroomschema en protocol voor het onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood in de bodem.

6. Dankwoord

De auteurs van dit rapport willen graag Nikolaj Walraven (Geoconnect) en Joke Wezenbeek (Grontmij) bedanken voor hun kritische blik op de verschillende conceptversies van dit rapport.

Literatuur

- Baars AJ, Theelen RMC, Janssen PJCM, Hesse JM, Van Apeldoorn ME, Meijerink MCM, Verdam L, Zeilmaker MJ (2001), Report no. 711701025, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Baars AJ (2007), Notitie: short term exposure.
- Brand E, Otte PF, Lijzen JPA (2007), CSOIL 2000: an exposure model for human risk assessment of soil contamination. A model description. Report no. 711701054, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Bright, DA, Richardson GM, Dodd M (2006),, Do Current Standards of Practice in Canada Measure, What is Relevant to Human Exposure at Contaminated Sites? I: A Discussion of Soil Particle Size and Contaminant Partitioning in Soil, Human and Ecological Risk Assessment , 12:591-605, 2006.
- Calabrese EJ, Stanek EJ, James RC, Roberts SM (1999), Soil ingestion. A concern for acute toxicity in children. Journal of Environmental Health 61, 18-23.
- Circulaire bodemsanering (2006), deze circulaire is beschikbaar op het volgende internetadres (bezoekt 8 juni 2007): <http://www.vrom.nl/pagina.html?id=23288>.
- Edwards RE and Liroy PJ, (1999), The EL sampler: a press sampler for the quantitative estimation o dermal exposure to pesticides in house dust, Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 9, 521-529.
- EPA (1999), Short sheet: IEUBK model bioavailability variable: EPA#540-F-00-006, Washington, USA.
- EPA (2000), Short sheet: TRW recommendations for sampling and analysis of soil at lead sites: EPA#540-F-00-010, Washington, USA.
- ISO (2006) DIS 17924 Soil quality – Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material – Guidance on the application and selection of physiologically-based extraction methods for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.
- Kissel JC, Rickter KY, Fenske RA (1996), Factors affecting soil adherence to skin in hand-press trials. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 722-728.
- Kissel, JC, Shirai JH, Richter KY, Fenske RA (1998), Investigation of dermal contact with soil in controlled trails. J. Soil. Contam 7(6), 735-752.
- Lijzen JPA, Baars AJ, Otte PF, Rikken MGJ, Swartjes FA, Verbruggen EMJ, van Wezel AP (2001), Report no. 711701023, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Ljung K, Oomen AG, Duits M, Selinus O, Berglund M (2007), Bioaccessibility of metals in urban playground soils. J Environ. Sci. Health Part A 42(9).

- Morrison AL and Gulson BL (2007), Preliminary findings of chemistry and bioaccessibility in base metal smelter slags. Science of the total environment. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.03.034.
- NEN 5709:2006, Bodem – Monstervoorbehandeling voor de bepaling van organische en anorganische parameters in de grond.
- NEN 5740:1999, Bodem - Onderzoeksstrategie bij verkennend onderzoek - Onderzoek naar de milieuhygiënische kwaliteit van de bodem.
- NEN 5742:2001, Bodem – Monsterneming van grond en sediment ten behoeve van de bepaling van metalen, anorganische verbindingen, matig-vluchtige organische verbindingen en fysisch-chemische bodemkenmerken.
- NEN 5752:1995, Bodem – Bepaling van het gehalte aan carbonaten in grond- Gravimetrische methode.
- NEN 5753:2006, Bodem – Bepaling van het lutumgehalte en de korrelgrootteverdeling in grond met behulp van zeef en pipet.
- NEN 5754:2005, Bodem – Bepaling van het gehalte aan organische stof op massabasis in grond en waterbodem volgens de gloeiverliesmethode.
- NEN 5780:2006, Bodem – Bepaling van de potentiële kationenuitwisselingscapaciteit en uitwisselbare basische kationen in grond.
- NEN 6950:2005, Bodem – Koepelnorm voor de bepaling van geselecteerde elementen in bodem, waterbodem en (zuiverings)slib.
- NEN 6961:2005, Milieu – Ontsluiting met salpeterzuur en zoutzuur (Koningswater) voor de bepaling van geselecteerde elementen in water, waterbodem, slib, slibhoudend water, luchtstof, grond en bouwstoffen.
- NEN-EN-ISO 10390:2005, Bodem – Bepaling van de pH-waarde.
- NEN-EN-ISO 17294-2:2004, Water – Toepassing van massaspectrometrie met inductief gekoppelde plasma (ICP-MS) – Deel 2: Bepaling van 62 elementen.
- NVN 5725:1999, Nederlandse voornorm Bodem – Leidraad voor het uitvoeren van vooronderzoek bij verkennend, oriënterend en nader onderzoek.
- Oomen AG, Brandon EFA, Swartjes FA, Sips AJAM (2006), How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis. Report no. 711701042, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Otte PF, Lijzen JPA, Otte JG, Swartjes FA, Versluijs CW (2001), Evaluation and revision of the CSOIL parameter set. Proposed parameter set for human exposure modeling and deriving Intervention values for the first series of compounds. Report no. 711701 021, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Paustenbach DJ, Finley BL, Long TF (1997), The critical role of house dust in understanding

the hazards posed by contaminated soils. *International Journal of Toxicology* 16, 339-362.

Roberts SM (2004), Debate and Commentary: Incorporating information on bioavailability of soil-borne chemicals into human health risk assessments. *Human and Ecological Risk Assessment* 10, 631-635.

Sheppard SC and Evenden WG (1994), Contaminant enrichment and properties of soil adhering to skin. *J. Environ. Qual.* 23, 604-613.

VROM (2006), Notulen Loodoverleg d.d. 15 september 2006 Kenmerk NOBO-2006-143.

Appendix

- A. Overzicht van de verschillende NEN-normen
- B. Gebruikte afkortingen
- C. Lijst met verklarende termen en definities
- D. RIVM-ARO SOP 500: *in vitro* digestiemodel RIVM
- E. RIVM-ARO SOP 469: koningswaterdestructie van vaste en vloeibare monsters.
- F. RIVM-LVM SOP 419: bepaling van Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sr, Tl, V en Zn met behulp van ICP-MS.

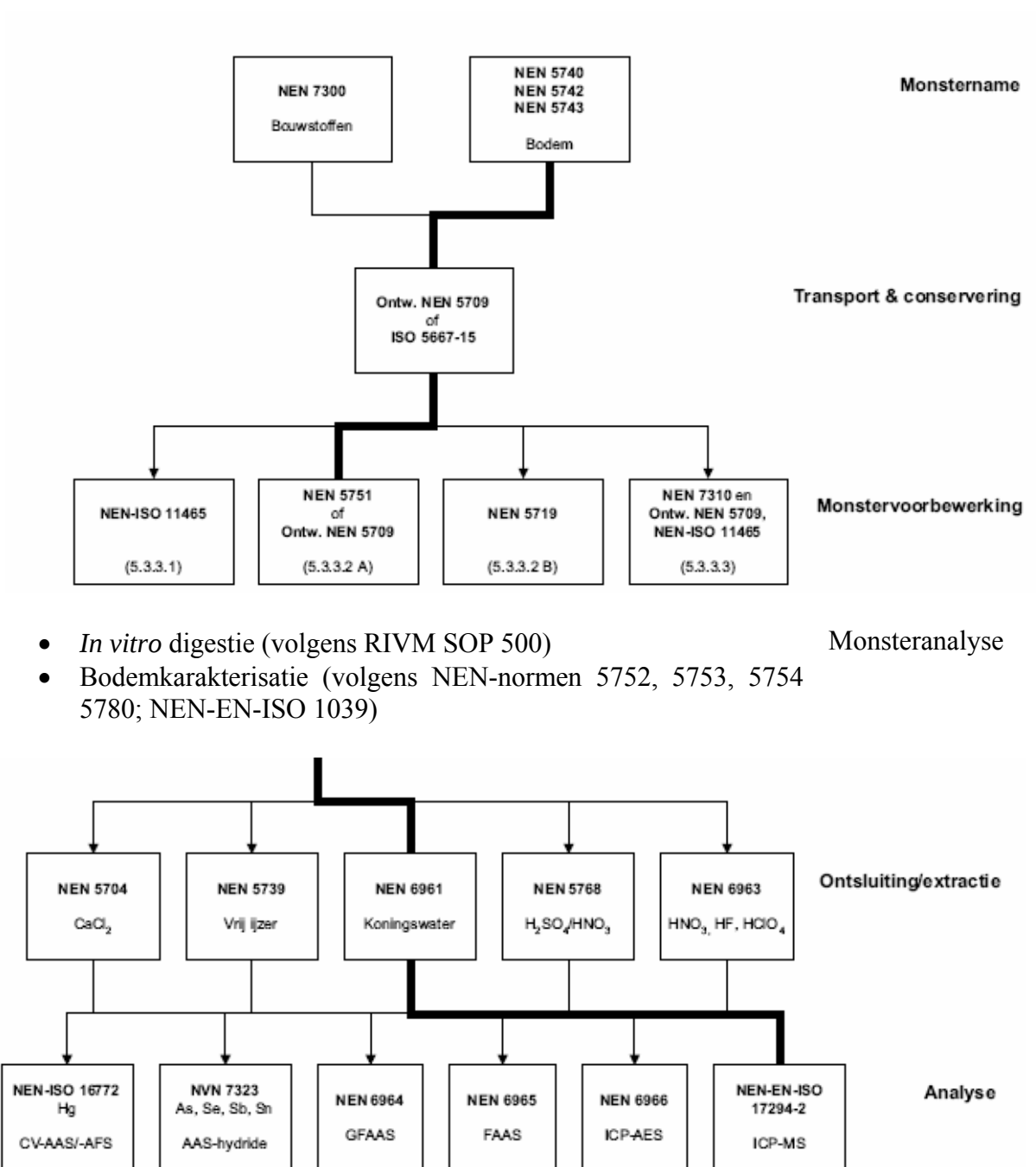
Appendix A - Overzicht van de verschillende NEN-normen

De verschillende normen van het Nederlands Normalisatie Instituut (NNI) waaraan in deze richtlijn gerefereerd wordt, staan vermeld in Tabel 3. Deze NEN-normen worden regelmatig geëvalueerd en verbeterd. De richtlijn die hier gepresenteerd is, verwijst naar de meest recente en dus op dit moment geldende norm.

Tabel 3: Overzicht van de normen waaraan de richtlijn ‘Bepalen van de orale biobeschikbaarheid van lood in de bodem’ refereert.

NEN-norm	Beschrijving
NEN 5709:2006	Monstervoorbehandeling voor de bepaling van organische en anorganische parameters in de grond.
NEN 5740:1999	Onderzoeksstrategie bij verkennend onderzoek – Onderzoek naar de milieuhygiënische kwaliteit van de bodem.
NEN 5742:2001	Monsterneming van grond en sediment ten behoeve van de bepaling van metalen, anorganische verbindingen, matig-vluchtige organische verbindingen en fysisch-chemische bodemkenmerken.
NEN 5752:1995	Bepaling van het gehalte aan carbonaten in grond – Gravimetrische methode.
NEN 5753:2006	Bepaling van het lutumgehalte en de korrelgrootteverdeling in grond met behulp van zeef en pipet.
NEN 5754:2005	Bepaling van het gehalte aan organische stof op massabasis in grond en waterbodem volgens de gloeiverliesmethode.
NEN 5780:2006	Bepaling van de potentiële kationenuitwisselingscapaciteit en uitwisselbare basische kationen in grond.
NEN 6950:2005	Koepelnorm voor de bepaling van geselecteerde elementen in bodem, waterbodem en (zuiverings)slib.
NEN 6961:2005	Ontsluiting met salpeterzuur en zoutzuur (koningswater) voor de bepaling van geselecteerde elementen in water, waterbodem, slib, slibhoudend water, luchtstof, grond en bouwstoffen.
NEN-EN-ISO 10390:2005	Bepaling van de pH-waarde.
NEN-EN-ISO 17294-2:2004	Toepassing van massaspectrometrie met inductief gekoppelde plasma (ICP-MS) – Deel 2: Bepaling van 62 elementen.
NVN 5725:1999 (voornorm)	Leidraad voor het uitvoeren van vooronderzoek bij verkennend, oriënterend en nader onderzoek.

De koepelnorm voor bodemonderzoek NEN 6950:2005 geeft een duidelijk overzicht van de verschillende NEN-normen die een rol spelen bij het bodemonderzoek (Figuur 3). Het *in vitro* digestiemodel en de extra bodemkarakterisaties worden na de monstervoorbewerking uitgevoerd (hoofdstuk 4).



Figuur 3: Stroomschema met daarin aangegeven welke NEN-normen (gedeeltelijk) gevolgd worden bij het onderzoek naar de biobeschikbaarheid van lood uit de bodem. Dit stroomschema is gebaseerd op het stroomschema uit de bodemkoepelnorm NEN 6950:2005.

Appendix B - Gebruikte afkortingen

BARGE:	BioAccessibility Research Groupe Europe
CEC:	Cation Exchange Capacity
EPA:	Environmental Protection Agency
F:	Biobeschikbare fractie van een contaminant ($F = F_B \times F_A \times F_H$) F_B : Fractie van externe dosis die bioaccessible is na externe blootstelling F_A : Fractie van F_B die getransporteerd wordt over de darmwand F_H : Fractie van F_A dat niet na eerste passage gemetaboliseerd is
GLP:	Good Laboratory Practice
ICP-MS:	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry
ISO:	International Organization for Standardization
MTR:	Maximaal Toelaatbaar Risico
NEN:	Nederlandse Norm, uitgegeven door het Nederlands Normalisatie-Instituut
NIST:	National Institute for Standardization and Technology
NoBo:	Normstelling Bodemsanering (Discussiegroep in opdracht van VROM)
NVN :	Nederlandse VoorNorm, uitgegeven door het Nederlands Normalisatie-Instituut
PAK:	Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen
PCB :	PolyChloorBifenylen
Rel F :	Relatieve biobeschikbaarheidsfactor
RIVM :	RijksInstituut voor Volksgezondheid en Milieu
Sanscrit :	Sanerings Criterium (blootstellingsmodel)
VED-HE:	VERdacht Diffuse bodem, HEterogene verontreiniging

Appendix C - Termen en definities

Analysemonster: Een zodanige door middel van de voorgeschreven wijze van monstervoorbehandeling verkregen hoeveelheid monstermateriaal dat deze volledig voor de analyse wordt gebruikt.

Bioaccessibility: De mate waarin een contaminant tijdens het digestieproces in het maag-darmkanaal van een matrix wordt vrijgemaakt.

Biobeschikbaarheid: (Orale) biobeschikbaarheid (interne blootstelling) van een contaminant uit een matrix is het totaal aan processen dat ervoor zorgt dat een contaminant beschikbaar komt in het lichaam. Deze processen zijn: 1) inname, 2) vrijkomen van de contaminant uit de matrix onder invloed van het digestieproces in het maag-darmkanaal (=bioaccessibility), 3) de absorptie van de contaminant uit de darm in het bloed en 4) het first-pass-effect (metabolisme in de lever).

Blootstellingsmodel: Model dat de humane risico's van lood in de bodem kan schatten. Hiervoor gebruikt dit model o.a. blootstellingsscenario's.

Bodem: Het vaste deel van de aarde met de zich daarin bevindende bestanddelen en organismen.

Bodemfractie: De deeltjesgrootte waarop de bodem gezeefd is voor verdere analyse. Door gebruik te maken van verschillende poriegroottes, worden verschillende fracties verkregen.

Bodemkarakteristieken: De eigenschappen van de bodem op het gebied die bepalend (kunnen) zijn voor de bioaccessibility van lood uit de bodem (onder andere pH; lutumgehalte; organische stof; CaCO₃ enzovoort).

Bodemmonster: Hoeveelheid bodem van een onderzoekslocatie die voor de monstervoorbehandeling als een eenheid wordt beschouwd. Na monstervoorbehandeling wordt een bodemmonster gebruikt voor verdere analyse.

Bodemverontreiniging: Situatie waarbij stoffen zich op een zodanige wijze in de bodem bevinden dat deze stoffen zich met de bodem kunnen vermengen, met de bodem kunnen reageren, zich in de bodem kunnen verspreiden en/of ongecontroleerd kunnen verplaatsen en een of meer van de functionele eigenschappen die de bodem voor mens, plant en dier heeft, verminderen of bedreigen.

Boring: Een boring is het nemen van een bodemmonster met een grondboor. De hoeveelheid bodemmateriaal die met een boring verkregen wordt is meestal groter dan een steek.

Chyme: Het supernatant van het digestiesap waar de hoeveelheid lood in moet worden bepaald na het *in vitro* digestiemodel.

In vitro digestiemodel: Een fysiologisch digestiemodel om de bioaccessibility van een contaminant uit een matrix te bepalen.

Interventiewaarde: Waarde waarmee voor verontreinigde stoffen in grond en grondwater het concentratieniveau wordt aangegeven waarboven sprake is van ernstige vermindering van de functionele eigenschappen die de bodem heeft voor mens, plant of dier.

Koningswater (aqua regia): Een oplossing die bestaat uit 1 volume-eenheid salpeterzuur en 3 volume-eenheden zoutzuur.

Locatie (perceel): Het grondgebied dat wordt onderzocht op de aanwezigheid van verontreinigde stoffen.

Loodkarakteristieken: De eigenschappen van de chemische samenstelling van het lood (in het monster) die bepalend (kunnen) zijn voor de bioaccessibility van het lood (loodzout, valentie et cetera).

Massabalans: Een massabalans beschrijft het totaal aan stof dat een systeem ingaat en weer uitkomt. Voor de bioaccessibility van lood kan een massabalans worden gemaakt door het totaal van lood in de bodem te vergelijken met het totaal aan lood in het chyme en pellet na de *in vitro* digestie experiment.

Maximaal toelaatbaar risico: Een grenswaarde die aangeeft wanneer er sprake is van een potentieel humaan risico (bij overschrijding).

Mengmonsters: De hoeveelheid grond die ontstaat doordat meer steken/boringen worden samengevoegd, waarbij de identiteit van de oorspronkelijke steek of boring verloren is gegaan.

Monsterdiepte: De diepte tot waar een monster wordt genomen.

Monstervoorbehandeling: Geheel van handelen waarmee vanuit een uit de oorspronkelijke partij genomen monster een deel- of analysemonster wordt verkregen.

NEN-norm: Een norm (richtlijn) uitgegeven door het Nederlands Normalisatie-Instituut.

Onderzoeksstrategie: De opzet van het verkennende onderzoek waarin het aantal te nemen monsters, de plaatsen op de locatie waar deze moeten worden genomen en de stoffen die in deze monsters moeten worden bepaald, is vastgelegd. De onderzoeksstrategie wordt vastgesteld op basis van de onderzoekshypothese uit het vooronderzoek in combinatie met de aanleiding en doelstelling van het onderzoek.

Pellet: Het bodemresidu dat overblijft in de digestiebuis na het afdraaien tijdens het *in vitro* digestiemodel.

Pica-gedrag: Gedrag waarbij kinderen moedwillig grote hoeveelheden grond inslikken.

Referentiemonster: Een goed gekarakteriseerd bodemmonster. Tijdens de bepaling van de bioaccessibility van lood uit de bodem wordt altijd een referentiemonster meegenomen voor het vergelijken van de uitkomsten.

Relatieve biobeschikbaarheidsfactor: Een omrekenfactor die wordt verkregen door de orale biobeschikbaarheid van een contaminant uit bodem te vergelijken met de orale

biobeschikbaarheid in de matrix die is gebruikt in de onderbouwende studies van de interventiewaarde.

Stedelijke ophooglaag: De bovenste laag in stedelijke gebieden die ontstaan is door (lange) bewonersgeschiedenis. Deze laag is door eeuwenlang gebruik van lood in allerlei producten en materialen grootschalig verontreinigd met lood.

Steek: Een steek is de hoeveelheid materiaal die in een handeling uit een partij is genomen, maar voor analyse wordt samengevoegd met andere steken tot een mengmonster.

Verdacht diffuse bodem, heterogene verontreiniging: Een verontreinigde stof die wordt gekenmerkt door matig tot veel variatie op de schaal van monsterneming.

Verdachte locatie: Een locatie waarvoor op grond van het vooronderzoek concrete aanwijzingen bestaan dat die locatie of een deel ervan verontreinigd is met een of meer stoffen.

Verontreiniging (diffuus): Een, in relatie tot de onderzoeksschaal, gelijkmatige belasting van de bodem. Er is over het algemeen geen duidelijke verontreinigingskern aanwezig.

Verontreiniging (verontreinigingskern): Een verontreinigde bodem met een (vermoedelijk) centrum als gevolg van plaatselijke bodembelasting.

Vooronderzoek: Het verzamelen van informatie over het vroegere gebruik en het huidige gebruik, onder meer gericht op het vinden van mogelijke bronnen van bodembelasting.

Appendix D - Protocol *in vitro* digestiemodel RIVM (SOP 500)

Introduction

The digestion process in the human body is simulated by use of an '*in vitro*' digestion model. To do so, artificial saliva, gastric juice, duodenal and bile juice are prepared by addition of relevant salts, enzymes and other characteristics compounds to water.

The digestion consists of three steps:

1. Short incubation (5 minutes) of the sample with saliva
2. Addition of gastric juice followed by a two hour incubation
3. Addition of duodenal and bile juice followed by a two our incubation

All incubation is performed at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, and during incubation the samples are rotated head over heels. After the last incubation phase the sample is centrifuged. In the supernatant, representing the chime, the amount of free contaminant is determined which is referred to as the bioaccessible amount. Sometimes the amount of free contaminant is also determined in the other phases of the digestion model (mouth, stomach) for determination of the bioaccessibility.

Depending on the research question basically three different digestion models can be used:

1. Soil model
2. Model for fasted conditions
3. Model for fed conditions

Within each model variations can be made depending on the research questions, in this SOP the most important variations of the model are described.

Apparatus

Beside standard laboratory equipment the following equipment was used:

- stove (Heroes), type KTG 800;
- rotator (Labinco), type L2, or rotator (Heodolph), type Reax 2;
- centrifuge tubes (Nalgene), cat. no. 3430-3870 (polycarbonate with polyphenylenoxide screw cap with polyphenylene plug and silicone O-ring, dimensions 38 * 102 mm) or cat no. 3118A-0085 (polycarbonate with polypropylene screw cap, dimensions 38 * 101 mm);
- spatula coated with PTFE (Omnilabo), cat. nr. 762/T of 794/T;
- centrifuge (Rotina), type 48 and centrifuge (Hettich), type 30 RF;
- pH meter with a Ross sure-flow combination pH electrode (Orion), type 720A and cat. nr. 8172BN;
- analytical balance;
- balance for large amounts;
- dispensers;
- volumetric flask and Erlenmeyer flask;
- magnetic stirrer and stirring bar;
- pipettes.

Safety and Environment

Safety

The RIVM have defined rules to work safe. These rules can be found on the intranet.

Waste disposal

Waste is disposed according to SOP 487. More information how to handle waste is found on the RIVM intranet.

Chemicals and reagents

Reference to a company and/or product is for purpose of identification and information only. All reagents must be of analytical grade, unless otherwise specified

NaCl (Merck, cat no. 106404).
KSCN (Merck, cat. no. 105125).
NaH₂PO₄ (Baker, cat. no. 0306).
Na₂SO₄ water free (Merck, cat. no. 106647).
KCl (Merck, cat. no. 104936).
CaCl₂·2H₂O (Merck, cat. no. 102382).
NH₄Cl (Merck, cat. no. 101145).
NaHCO₃ (Merck, cat. no. 106329).
KH₂PO₄ (Baker, cat. no. 0240).
MgCl₂·6H₂O (Merck, cat. no. 105833).
NaOH (Merck, cat. no. 6498).
37% HCl (Merck, cat. no. 100317).
urea (Merck, cat. no. 108487).
uric acid (Merck, cat. no. 100817).
D-+-glucose water free (Merck, cat. no. 8337).
D-glucuronic acid (Fluka, cat. no. 49335).
D-glucosaminehydrochloride (Merck, cat. no. 104113).
α-amylase (bacillus species) (Sigma, cat. no. A-6814).
mucin (pig) (Carl Roth (Germany), cat. no. 84941).
pepsin (pig) (Merck, cat. no. 107185).
bovine serum albumin (BSA) (Merck, cat. no. 112018).
pancreatin (pig) (Merck, cat. no. 107130).
lipase (pig) (Sigma, cat. no. L-3126).
bile (bovine) (Sigma, cat. no. B-3883).
10 M (400 g/l) of NaOH (Merck, cat. no. 6498).
84.7 g/l of NaHCO₃ (Merck, cat. no. 106329)

Procedure

The digestion model is performed on two days. On day 1 the artificial juices are prepared and on day 2 the digestion is performed. If the bioaccessibility has to be determined for metals then all used glassware should be acid washed (pH 1, 8 ml of 37% HCl + 1 liter of milli-Q water)

DAY 1

In Table 1 an overview is given of the juices that have to be prepared on day 1 for the different models. The dissolution of amylase, mucin, BSA, pepsin, pancreatin, lipase and bile can take some time at room temperature (about 1 hour). The pH must be measured and

adjusted after total dissolution of these components. The amounts indicated below are for the preparation of 1000 ml juice (saliva, gastric juice, duodenal juice and bile).

Soil model	Fasted model	Fed model
<u>Saliva</u> inorganic phase (500 ml): 896 mg KCl 200 mg KSCN 888 mg NaH₂PO₄ 570 mg Na₂SO₄ 298 mg NaCl 1.8 ml 1M NaOH solution organic phase (500 ml): 200 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 145 mg amylase 15 mg uric acid 50 mg mucin measure the pH, it should be 6.5 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%)	<u>Saliva</u> inorganic phase (500 ml): 896 mg KCl 200 mg KSCN 888 mg NaH₂PO₄ 570 mg Na₂SO₄ 298 mg NaCl 1.8 ml 1M NaOH solution organic phase (500 ml): 200 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 145 mg amylase 15 mg uric acid 50 mg mucin measure the pH, it should be 6.5 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%)	<u>Saliva</u> inorganic phase (500 ml): 896 mg KCl 200 mg KSCN 888 mg NaH₂PO₄ 570 mg Na₂SO₄ 298 mg NaCl 1694 mg NaHCO₃ organic phase (500 ml): 200 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 290 mg amylase 15 mg uric acid 25 mg mucin measure the pH, it should be 6.8 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%)
<u>Gastric juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 2752 mg NaCl 266 mg NaH₂PO₄ 824 mg KCl 400 mg CaCl₂·2H₂O 306 mg NH₄Cl 8.3 ml 37% HCl organic phase (500 ml): 650 mg glucose 20 mg glucuronic acid 85 mg urea 330 mg glucosaminehydrochloride combine organic and inorganic and add the following components: 1 g BSA 1 g pepsin 3 g mucin measure the pH, it should be 1.1 ± 0.1. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Gastric juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 2752 mg NaCl 266 mg NaH₂PO₄ 824 mg KCl 400 mg CaCl₂·2H₂O 306 mg NH₄Cl 8.3 ml 37% HCl 4.5ml organic phase (500 ml): 650 mg glucose 20 mg glucuronic acid 85 mg urea 330 mg glucosaminehydrochloride combine organic and inorganic and add the following components: 1 g BSA 1 g pepsin 3 g mucin measure the pH, it should be 1.1 ± 0.1 1.4 ± 0.02. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Gastric juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 2752 mg NaCl 266 mg NaH₂PO₄ 824 mg KCl 400 mg CaCl₂·2H₂O 306 mg NH₄Cl 6.5 ml 37% HCl organic phase (500 ml): 650 mg glucose 20 mg glucuronic acid 85 mg urea 330 mg glucosaminehydrochloride combine organic and inorganic and add the following components: 1 g BSA 2.5 g pepsin 3 g mucin measure the pH, it should be 1.3 ± 0.1 Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).

<u>Duodenal juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 7012 mg NaCl 3388 mg NaHCO₃ 80 mg KH₂PO₄ 564 mg KCl 50 mg MgCl₂·6H₂O 180 µl HCl (37%) organic phase (500 ml): 100 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 200 mg CaCl₂·2H₂O 1 g BSA 3 g pancreatin 0.5 g lipase measure the pH, it should be 7.8 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Duodenal juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 7012 mg NaCl 3388 mg NaHCO₃ 80 mg KH₂PO₄ 564 mg KCl 50 mg MgCl₂·6H₂O 180 µl HCl (37%) 200ul organic phase (500 ml): 100 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 200 mg CaCl₂·2H₂O 1 g BSA 3 g pancreatin 0.5 g lipase measure the pH, it should be 7.8 ± 0.2 8.1 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Duodenal juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 7012 mg NaCl 3388 mg NaHCO₃ 80 mg KH₂PO₄ 564 mg KCl 50 mg MgCl₂·6H₂O organic phase (500 ml): 100 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 200 mg CaCl₂·2H₂O 1 g BSA 9 g pancreatin 1.5 g lipase measure the pH, it should be 8.1 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).
<u>Bile juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 5259 mg NaCl 5785 mg NaHCO₃ 376 mg KCl 200 µl HCl (37%) organic phase (500 ml): 250 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 222 mg CaCl₂·2H₂O 1.8 g BSA 6 g bile measure the pH, it should be 8.0 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Bile juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 5259 mg NaCl 5785 mg NaHCO₃ 376 mg KCl 200 µl HCl (37%) organic phase (500 ml): 250 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 222 mg CaCl₂·2H₂O 1.8 g BSA 6 g bile measure the pH, it should be 8.0 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).	<u>Bile juice preparation:</u> inorganic phase (500 ml): 5259 mg NaCl 5785 mg NaHCO₃ 376 mg KCl 150 µl HCl (37%) organic phase (500 ml): 250 mg urea combine organic and inorganic and add the following components: 222 mg CaCl₂·2H₂O 1.8 g BSA 30 g bile measure the pH, it should be 8.2 ± 0.2. Adjust to the correct pH with NaOH (1 M) or HCl (37%).
In addition the pH of the total digestion juice is measured (1 ml saliva, 1.5 ml gastric juice, 3 ml duodenal juice and 1 ml bile juice). The pH has to be 6.0 ± 0.5.	In addition the pH of the total digestion juice is measured (1 ml saliva, 2 ml gastric juice, 2 ml duodenal juice and 1 ml bile juice). The pH has to be 6.0 ± 0.5.	In addition the pH of the total digestion juice is measured (1 ml saliva, 2 ml gastric juice, 2 ml duodenal juice, 1 ml bile juice and 28 mg NaHCO₃). The pH has to be 6.5 ± 0.5.

The solutions are stored overnight at room temperature in the stove. About 2 h prior to the experiments the stove is switched on and set at 37 ± 2°C.

DAY 2

Below are the protocols given for the second day for the different digestion models, for each protocol the correct solutions (soil, fasted, fed) should be used!

Soil *in vitro* digestion model under fasted conditions

- Weigh 0.06 and/or 0.6 g of soil (dry weight) into tubes and store them at room temperature. Montana 2710 je had het net nog over 2711?? (0.06 and 0.6 g) is used as internal control.
- Check the pH of the total digestion juice (1 ml saliva, 1.5 ml gastric juice, 3 ml duodenal juice and 1 ml bile juice). The pH has to be 6.0 ± 0.5 .
- Add 9 ml saliva to the tubes with soil and incubate head-over-heels for 5 min at 37°C.
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility.
- Add 13.5 ml gastric juice and measure the pH. It has to be 1.5 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 1.5 ± 0.5 .
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility.
- Add 27 ml duodenal juice and 9 ml bile juice and measure the pH. It has to be 6.0 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 6.0 ± 0.5 .
- Centrifuge for 5 min at 2750 g.
- Take a sample from the supernatant and store the remaining chyme at -20°C for future analysis. For metals, the sample should be stored in the presence of acid (0.1 M HNO₃).
- For mass balance (total recovery) the pellet can be stored and analysed. Is there guidance on how to sample the (complete) pellet, and for metals, how to destruct the pellets?

***In vitro* digestion model under fasted conditions**

- Weigh different amounts of matrix (maximum of 4.5 g), into tubes and store them at advised temperature (-20°C, 4°C, or room temperature).
- Check the pH of the total digestion juice (1 ml saliva, 2 ml gastric juice, 2 ml duodenal juice and 1 ml bile juice). The pH has to be 6.0 ± 0.5 .
- Add 6 ml saliva to the tubes and incubate head-over-heels for 5 min at 37°C.
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility
- Add 12 ml gastric juice and measure the pH. It has to be 1.5 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 1.5 ± 0.5 .
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility
- Add 12 ml duodenal juice and 6 ml bile juice and measure the pH. It has to be 6.0 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 6.0 ± 0.5 .
- Centrifuge for 5 min at 2750 g.
- Take a sample from the supernatant and store the remaining chyme at -20°C for future analysis.
- For mass balance (total recovery) the pellet can be stored and analysed.

***In vitro* digestion model under fed conditions**

- Weigh different amount of matrix in combination with food or only matrix if it is food (maximum of 4.5 g), into tubes and store them at advised temperature (-20°C, 4°C, or room temperature). Olvarit 472 with 2% (v:w) sunflower oil can be used as food source to simulate a standard Dutch diner.
- Check the pH of the total digestion juice (1 ml saliva, 2 ml gastric juice, 2 ml duodenal juice, 1 ml bile juice and 28 mg NaHCO₃). The pH has to be 6.5 ± 0.5 .
- Add 6 ml saliva to the tubes and incubate head-over-heels for 5 min at 37°C.
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility
- Add 12 ml gastric juice and measure the pH. It has to be 2.5 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 2.5 ± 0.5 .
- Optional: take a sample (0.1 ml) to determine the bioaccessibility
- Add 12 ml duodenal juice, 6 ml bile juice and 2 ml NaHCO₃ (84.7 g/L) and measure the pH. It has to be 6.5 ± 0.5 . If not the pH should be adjusted with 37% HCl or 10M NaOH.
- Incubate head-over-heels for 2 h at 37°C.
- Measure the pH, it has to be 6.5 ± 0.5 .
- Centrifuge for 5 min at 2750 g.
- Take a sample from the supernatant and store the remaining chyme at -20°C for future analysis.
- For mass balance (total recovery) the pellet can be stored and analysed.

The following variations on these three models are possible.

- Soil *in vitro* digestion model under fed conditions: this is the fed model, 0.06 and/or 0.6 g of soil (dry weight) and 4.5 g of food is weighted.
- Supplement *in vitro* digestion model under fasted conditions: this is the fasted model, instead of matrix an amount of supplement is added to the tubes based on the instruction leaflet. Store the tubes at 4°C in the dark if necessary.
- Supplement *in vitro* digestion model under fed conditions: this is the fed model, besides 4.5 g of food an amount of supplement is added to the tubes based on the instruction leaflet. Store the tubes at 4°C in the dark if necessary.
- Toy swallow *in vitro* digestion model under fed conditions: this is the fed model, different amount of toys, or scrapings is weighted in combination with 4.5 g of food. As internal standard paint scrapples (SRM paint) are used.
- Toy suck *in vitro* digestion model: this is a combination of stimulated saliva (fed model) and non simulated gastric, duodenal and bile juice (fasted model). Instead of 6 ml an amount of 21 ml saliva is added to the matrix (ratio juices is 3:2:2:1 respectively for saliva: stomach: duodenal: bile). After a certain time, based on input of risk assessor, the saliva is centrifuged (5 minutes at 2750 g) and 18 ml saliva supernatant is used in the rest of the digestion. Furthermore is 12 ml gastric juice added (pH of 2.5 ± 0.5), next 12 ml duodenal juice and 6 ml bile is added. The sample is centrifuged at 2750 g for 5 minutes and the chyme can be used for bioaccessibility determination.
- Toy suck-swallow *in vitro* digestion model: same as the suck model, only 18 ml saliva is used and is not centrifuged after incubation before gastric juice is added.

Quality control

All the measured pHs should be written down in the lab journals

Relating documents**RIVM reports**

Oomen AG, Brandon EFA, Swartjes FA, Sips AJAM (2006), How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis. Report no. 711701042, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Oomen AG, Rompelberg CJM, Brandon EFA, van de Kamp E, Duits MR, Versantvoort CHM, van Engelen JGM, Sips AJAM (2005) Consumer Product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants from toys and application in risk assessment. Report no. 320102004, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Oomen AG, Versantvoort CHM, Duits MR, van de Kamp E, van Twillert K (2004) Application of in vitro digestion models to assess release of lead and phthalate from toy matrices and azo dyes from textile. Report no. 320102003, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Oomen AG, van Twillert K, Hofhuis MFA, Rompelberg CJM, Versantvoort CHM (2003) Development and suitability of in vitro digestion models in assessing bioaccessibility of lead from toy matrices. Report no. 320102001, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Sips AJAM, Bruil MA, Dobbe CJG, van de Kamp E, Oomen AG, Pereboom DPKH, Rompelberg CJM, Zeilmaker MJ (2001) Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. Method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene. Report no. 711701012, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Peer reviewed publications

Brandon EF, Oomen AG, Rompelberg CJ, Versantvoort CH, van Engelen JG, Sips AJ. Consumer product *in vitro* digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol. 2006 Mar;44(2):161-71. Epub 2005 Dec 6.

Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. Food Chem Toxicol. 2005 Jan;43(1):31-40.

Oomen AG, Rompelberg CJ, Van de Kamp E, Pereboom DP, De Zwart LL, Sips AJ. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. Arch Environ Contam Toxicol. 2004 Feb;46(2):183-8.

- Oomen AG, Rompelberg CJ, Bruil MA, Dobbe CJ, Pereboom DP, Sips AJ. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Arch Environ Contam Toxicol. 2003 Apr;44(3):281-7.
- Oomen AG, Tolls J, Sips AJ, Groten JP. *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. Arch Environ Contam Toxicol. 2003 Jan;44(1):116-24.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, Verstraete W, Van de Wiele T, Wragg J, Rompelberg CJ, Sips AJ, Van Wijnen JH. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. Environ Sci Technol. 2002 Aug 1;36(15):3326-34.

Appendix E - S.O.P.: ARO/469: koningswaterdestructie van vaste en vloeibare monsters met behulp van een magnetron (CEM Mars5)

Inleiding

Doel en toepassingsgebied

Dit voorschrift beschrijft het uitvoeren van destructies met behulp van de magnetron CEM Mars 5. Het is van toepassing op het ontsluiten van vaste en vloeibare monsters. De ontsluiting geschiedt voor de bepaling van het gehalte aan elementen in deze monsters.

Principe

Destructie van een monster wordt uitgevoerd met behulp van een kunststof (Teflon, PFA) binnenvat, dat in een kunststof (advanced composite) houder is geplaatst en dat wordt afgesloten met een schroefdraadring (Ultem polyetherimide). De ontsluiting vindt plaats door verhitting van het monster samen met koningswater in een dergelijk gesloten vat met behulp van microgolffenergie (2450 MHz).

Veiligheid

Tijdens het uitvoeren van een destructie dient te allen tijde een labjas en een bril te worden gedragen. Gebruik van handschoenen wordt aangeraden. Koningswater is zeer corrosief en oxiderend.

Gebruik alleen materialen van CEM. Deze zijn op elkaar afgestemd.

De destructievaten moeten voor gebruik aan de buitenkant droog en vrij zijn van deeltjes; vloeistofdruppels of vaste stoffen zullen de microgolffenergie absorberen, waardoor de temperatuur plaatselijk erg hoog kan oplopen.

De maximale druk en temperatuur in een destructievat zijn resp. 350 psi en 240°C (bij de HP-500 plus destructievaten). Bij een te hoge druk of temperatuur beschadigt het destructievat.

Ontwikkel bij voorkeur een niet op druk gestuurd programma.

Destrueer nooit meer dan 0,5 g organisch monster wanneer de samenstelling en compositie onbekend zijn.

Microgolffenergie is schadelijk voor de gezondheid. Controleer de apparatuur regelmatig op microgolf-energielekkage. (Zie pag. 57 van de manual [1]).

Verhit de destructievaten nooit in een stoof of op een verwarmingsplaat.

Gebruik een destructievat nooit zonder houder ('sleeve').

Isoleer nooit de buitenkant van een destructievat; luchtcirculatie is nodig tijdens de destructie en voor het afkoelen na de destructie.

Gebruik bij iedere destructie een breekmembraan en plaats nooit meer dan één breekmembraan tegelijk. Wordt de druk in een destructievat tijdens een destructie hoger dan 200 psi, dan breekt dit membraan en valt de druk weg. De destructie moet dan als verloren worden beschouwd en met een aangepaste hoeveelheid monster en met een aangepast programma worden herhaald.

Plaats geen metalen voorwerpen in de microgolfoven.

Het volume in de destructievaatjes moet minstens 10ml zuur of 50ml Milli-Q water bedragen. En het totaalvolume in de destructievaatjes mag nooit meer als 90 ml bedragen.

De volgende chemicaliën mogen niet gedestruueerd worden:

Geconcentreerde basische oplossingen (bijv. natronloog: vorming van kristallen).

Geconcentreerde zoutoplossingen (vorming van kristallen).

Zuren met een hoog kookpunt (bijv. geconcentreerd zwavelzuur of fosforzuur).

Explosieven (bijv. TNT, nitrocellulose).

Drijfgassen (bijv. hydrazine, ammoniumperchloride).

Pyrofore chemicaliën (aan de lucht of doorgeringe wrijving ontbrandbare stoffen).

Hypergolische mengsels (vloeistoffen die ontbranden zodra ze met elkaar in aanraking komen, zoals: salpeterzuur met fenol, salpeterzuur met aceton en salpeterzuur met triethylamine).

Dierlijke vetten (de esters van glycerol zijn in staat om nitroglycerine te vormen).

Vliegtuigbrandstof (bijv. JP-1).

Acetylides.

Acroleïne.

Glycolen (bijv. ethyleenglycol, propyleenglycol).

Perchloraten (bijv. ammoniumperchloraat, kaliumperchloraat en perchloorzuur).

Esters (bijv. cellosolve-ethyleenglycolfenylester).

Vernis en lak.

Alkanen (bijv. butaan, hexaan).

Ketonen (bijv. aceton, methylethylketon).

Vloeistoffen die kunnen ontleden bij hogere temperaturen.

Open de destructievaten in de zuurkast en alleen wanneer ze afgekoeld zijn tot beneden de 30°C en ze ontluicht zijn. Het ontluichten dient eerst te gebeuren wanneer de destructievaten afgekoeld zijn tot beneden de 60°C.

Chemicaliën en oplossingen

Tenzij anders vermeld zijn alle chemicaliën en oplossingen van analytisch zuivere kwaliteit. Het vermelden van merknamen betekent slechts dat destructie hiermee wordt uitgevoerd, niet bindend zijn en houdt geen uitsluiting in door het RIVM van equivalente chemicaliën.

Milli-Q water.

Salpeterzuur, 65% (w/v), p.a. Merck.

Zoutzuur, 37% (w/v), p.a. Merck.

Bijbehorende apparatuur en hulpmiddelen

Het vermelden van merknamen betekent slechts dat destructie hiermee wordt uitgevoerd, niet bindend is en houdt geen uitsluiting in door het RIVM van equivalente apparatuur.

Magnetron type CEM Mars5.

Carrousel voorzien van 14 houders met teflon vaatjes van 100ml type HP-500 plus.

ESP-1500 Plus Pressure sensor voor drukmeting.

EST-300 Plus Temperature Sensor, fiber optic probe voor temperatuurmeting.

Thermowell voor fiber optic probe.

PE houder 2 maal 7-gaats voor teflon binnenvaten.

Sleutel voor vastdraaien van de bout boven op de houder.

Breekmembraan, voor HP500, art. nr. 431300.

Breekmembraan tools: zuignapje voor het inbrengen en een naald voor het verwijderen van de breekmembranen.

Printer, Epson EX-800.

Zuur gespoeld glaswerk.

Procedure

Opstarten

Schakel de magnetron in. Op het display verschijnt na enige tijd het hoofdmenu.

Voor de bediening van de magnetron zie verder de handleiding.

Algemene opmerking

Weeg in het monitorvat het monster in, waarvan verwacht wordt dat dit de meeste gasontwikkeling zal geven (het monster met het hoogste organisch-stofgehalte).

Destrueer gelijksoortige monsters in dezelfde destructieserie.

Het maken van koningswater

Koningswater wordt gemaakt door geconcentreerd zoutzuur en geconcentreerd salpeterzuur in de verhouding 3:1 te mengen.

Destructievaatjes

Weeg een geschikte hoeveelheid monster af in de liner (nooit meer dan 0,5 g organisch materiaal).

Breng nadat het monster afgewogen is de massa op 3 g (zonder dat de balans eerst getarreed is) met Milli-Q.

Pipeteer vervolgens 7 ml koningswater in de liner.

Weeg nu de totale massa van de liner met inhoud. Met behulp van deze massa kan nadat de destructie uitgevoerd is het eventuele verlies worden bepaald.

Het plaatsen van de liners (de vaten 2 t/m 14)

In een carrousel passen 14 houders, 13 'gewone' houders (nr. 2 t/m 14), en het monitorvat. Zijn de vaten gevuld, plaats deze dan in de buitenvaten, doe de deksels en de disks (met de uitsparing naar boven) op de vaten, draai de blauwe ventnút met een nieuw breekmembraan redelijk vast op de schroefdraad en plaats deze in de houder met de ventilatieopening uitstekend door de smalste opening. Draai het vat zo dat de blauwe ventnút tegen de voorkant aankomt. Draai de bout boven op de houder handvast en geef dan met de sleutel (3.7) nog maximaal een halve slag. Zet de houder op juiste plaats in de carrousel.

Het monitorvat

Het monitorvat, altijd op positie nr. 1, heeft een afwijkende deksel, disk, houder en bout op de houder, zie figuur 5, pag. 10 van de manual [2].

Voordat het deksel op het vat geplaatst kan worden moet de Thermowell (glazenbuis) bevestigd worden. Duw de Thermowell met de opening naar boven van binnen uit door het deksel, laat deze ongeveer 1 cm uitsteken aan de bovenkant. Plaats de connector op de Thermowell en draai deze voorzichtig (handvast) op de schroefdraad. Zet het vat in het buitenvat en plaats de spacer en de disk op het deksel. Plaats het vat in de houder met de ventilatieopening uitstekend door de smalste opening en draai de handel voor het vat. Draai op de omhoogstaande schroefdraad de ESP-1500 Plus (3.3) en op de andere schroefdraad de blauwe ventnút met een nieuw breekplaatje. Draai het vat zo dat de blauwe ventnút tegen de voorkant aankomt. Draai de bout boven op de houder handvast en geef dan met de sleutel (3.7) nog maximaal een halve slag. Steek de EST-300 Plus (3.4) voorzichtig, door de opening in de bout op de houder, in de Thermowell totdat deze niet verder kan.

Zet de steunring over de houders wanneer de carrousel gevuld is. Zet de houder op juiste plaats in de carrousel.

Het starten en uitvoeren van een destructie

Open de deur door op de grote grijze knop boven op het apparaat te drukken. Wacht met het plaatsen van de carrousel totdat het witte plaatje onder in de oven stilstaat met de platte kant naar de voorkant gericht. Kijk in de open cirkel van de carrousel waar de platte kant zich bevindt en plaats de carrousel in de oven.

Draai de carrousel met de rotatieknop (rechtsonder op het numeriek toetsenbord) zodanig dat het drukvat linksachter in de hoek staat, druk dan nogmaals op de knop om het draaien te stoppen. Sluit de EST-300 Plus (3.4) aan door deze in de opening midden boven in de oven te duwen. Sluit de ESP-1500 Plus (3.3) aan rechtsboven en maak de slang vast in de houder boven in de oven.

Controleer of de slang van de ESP-1500 Plus en de EST-300 Plus niet gehinderd worden tijdens de rotatie door op de rotatieknop te drukken. De carrousel draait nu links- en rechtsom tot de aansluiting van de drukmeter. Druk nogmaals op de rotatieknop om het draaien te stoppen, monitorvat op positie links achter. Verhelp de eventuele problemen bij het draaien.

Sluit de deur.

Selecteer het te gebruiken programma. Voor koningswaterdestructies bij het LBM wordt het programma LBM_50 gebruikt.

Start het programma met de groene startknop.

Het laatst gebruikte programma is al geselecteerd na het opstarten, dit programma kan direct gestart worden door op de groene startknop te drukken.

Afsluiten en opwerken

Open de deur.

Koppel de ESP-1500 Plus (3.3) (eerst bovenkant dan zijkant) en de EST-300 Plus probe (3.4) los van het apparaat.

Til de carrousel uit de oven, plaats deze in de zuurkast en laat deze afkoelen.

Sluit de deur.

Print grafiek uit door op Print te drukken. Ga naar Print graph met - en druk op Select. Selecteer de uit te printen grafiek met +/- en druk op Select.

Zet de MARS 5 magnetron en de printer uit.

Ontlucht de vaatjes, in de zuurkast, door de ventnuten (blauwe schroefdoopjes) voorzichtig een beetje los te draaien. Pas op, er kunnen dampen ontsnappen.

Draai met de sleutel (3.7) de bout los.

Draai de ventnut eraf.

Haal het deksel eraf, voorzichtig bij vat nr. 1 i.v.m. de Thermowell.

Spoel met 80 ml Milli-Q water het destructaat kwantitatief over in zuur gespoelde potjes van 100 ml.

Het vervangen van een breekmembraan

Vervang voor iedere destructie de breekmembranen (3.8), zie figuur 1, pag. 5 van de manual [2].

Spoel de vaten zonodig met Milli-Q water om zuurresten te verwijderen.

Verwijder de blauwe ventnut; het breekmembraan bevindt zich in deze schroefdoop.

Verwijder het breekmembraan met behulp van de naald en droog zonodig de binnenzijde van de nut.

Plaats een nieuw membraan in de nut met het zuignapje. Controleer of het breekmembraan plat tegen de bovenkant ligt. Gebruik nooit meer dan één breekmembraan!

Schoonmaken

Handmatig schoonmaken van de vaten.

Spoel na iedere destructie de vaten en deksels met Milli-Q water, verwijder eventuele resten met een tissue en eventueel met aceton.

Breng 10 ml Koningswater (4.3) in de vaten en voer een destructie uit met het programma LBM_50 min.

De ESP-1500 Plus druksensor kan eventueel gereinigd worden. De schoonmaakprocedure hiervoor staat beschreven in de manual [1] pagina 56.

Onderhoud

De beheerder is verantwoordelijk voor het onderhoud en het (laten) uitvoeren van reparaties alsmede de registratie van het onderhoud/de reparaties in het logboek.

Naast het schoonmaken van de binnenkant van de magnetron direct na een destructie door de gebruiker, is verder geen onderhoud aan dit apparaat verbonden.

Indien gedurende een destructie de druk- en temperatuurregistratie goed verlopen is, is een goede werking van de magnetron gegarandeerd.

Storingen

Meld storingen aan de beheerder van het apparaat. Eenvoudige storingen kunnen door de beheerder van het apparaat worden verholpen, zie Maintenance Troubleshooting and service [1]. Grotere storingen moeten door de leverancier verholpen worden.

Referenties

[1] MARS 5, Operation Manual.

[2] HP-500 plus and XP-1500 plus, Vessel Accessory Sets, Instructions for use.

Appendix F - SOP LVM: De bepaling van Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sr, Tl, V en Zn met behulp van ICP-MS

Doel en toepassingsgebied

Deze SOP is toepasbaar voor de bepaling van aluminium (Al), arseen (As), barium (Ba) beryllium (Be), calcium (Ca), cadmium (Cd), kobalt (Co), chroom (Cr), koper (Cu), ijzer (Fe), kalium (K), lithium (Li), magnesium (Mg), mangaan (Mn), natrium (Na), nikkel (Ni), fosfor (P), lood (Pb), antimoon (Sb), strontium (Sr), thallium (Tl), vanadium (V) en zink (Zn) in drink- en grondwater en watertypen van gelijke aard voor zover de maximale matrixconcentraties niet worden overschreden.

De monsters moeten helder zijn.

De maximaal toegestane matrixconcentraties voor alle elementen zijn:

400 mg/l Mg; 1000 mg/l Cl en 400 mg/l Ca.

Afwijkende specifieke maximale matrixconcentraties zijn vermeld in Tabel 1.

Tabel 1: Toegestane specifieke maximale matrixconcentratie

Element/ isotoop	Maximum mg/l	Maximum mg/l	Maximum mg/l	Maximum mg/l
⁴⁴ Ca	Sr 2			
⁵¹ V	Cl 250			
⁵² Cr	C 100	Cl 1000		
⁵⁷ Fe	Mg 50	Ca 200		
⁵⁹ Co	Ca 200			
⁶⁰ Ni	Ca 200			
⁶⁵ Cu	Mg 50	S 400	Ca 400	Ba 1
⁶⁶ Zn	Mg 50	S 400	Ba 1	
⁷⁵ As	Cl 250			
¹¹⁴ Cd	Mo 0.1	Sn 0.004		

Monsters waarvoor de bovengrens (Tabel 1) wordt overschreden, dienen verdund te worden gemeten; de aantoonbaarheidsgrens neemt dan evenredig toe met de verdunningsfactor.

Voor monsters met verwachte hoge matrix- en/of elementconcentraties worden de verdunningsfactoren berekend.

Voor deze berekening kan zowel met een volledige als met een verkorte (zonder controles) en eventueel sterk verdunde meetserie worden gewerkt. Voor elk te bepalen element wordt zo de optimale verdunningsfactor berekend, waarbij gekozen is voor vaste verdunningsfactoren van 1-, 2-, 5-, 10-, 25- en of 100-maal.