

88C0010

中国预防医学科学院
硕士研究生毕业论文

人发作为生物监测样品可能性研究——
发样预处理对发中元素含量的影响

研究生：胡卫民

导师：郑星泉

汤徐箴

祝汉民

研究员

助研

助研

环 境 卫 生 监 测 所

一 九 八 八 年 七 月

X835

摘 要

本文评价了 I A E A 法、海鸥洗涤剂、E D T A N a₂ 溶液、稀硝酸溶液以及硫酸铜溶液等五种洗发方法对人发的外源性（外沾污）P b、C d、C r、H g 四种元素及鼠毛的内源性 C d、C r 两种元素的洗脱效果。结果表明：各种方法对外沾污的四种元素有不同程度的洗脱能力，对内源性 C d、C r 也有一定的洗脱影响；通过内、外源性元素和人发结合机理的初步探讨，表明人发中外沾污的元素和鼠毛中内源性元素都与毛发蛋白质结合。

采自不同个体的发样，按相同的程序进行外沾污或用 1 % 海鸥洗涤剂做洗发预处理时，各元素在不同个体发样的被沾污量和被洗脱的程度显著不同。

根据实验结果，我们认为，当头发的 P b、C d、C r、H g 四种元素的外源性沾污量很小，以致忽略不计时，可以直接测定其中四种元素的含量而不用洗发发样，以免造成洗脱量不同的个体差异；如果因样品较脏必须清洗时，可使用 I A E A 法或海鸥洗涤剂清洗发样以去除异物，最好采用淋洗方式，尽量缩短洗液和头发的接触时间。此时，可以利用头发中这四种元素的含量监测人发内的负荷量。但当外环境中元素对人发的沾污程度大时，上述各种方法的可用性值得推敲。头发不宜作为体内微量元素体负荷的指示器。

目 录

中文摘要

英文摘要

引 言

材料和方法

一、样品的制备

二、样品的测试

实验结果

一、各种发样预处理方法对头发中内外源性 Pb Cd Cr Hg 四种元素洗脱效果评价。

二、人发 pH 值个体差异及其与元素洗脱量的关系

三、内外源性 Cd 与头发结合机理的初探

讨论

一、各种洗发方法的可用性

二、内外源性元素和头发结合的机理

三、头发作为体内微量元素负荷指示器的可能性

结论

致谢

参考文献

A STUDY ON THE POSSIBILITY OF HUMAN SCALP HAIR USING AS A MEAN TO EVALUATE THE INTERNAL BURDEN -- THE EFFECT OF HAIR SAMPLE PRETREATMENT ON THE CONCENTRATION OF Cd, Cr, Hg, Pb IN HUMAN HAIR

ABSTRACT

The effect of hair pretreatment with either of acetone -- water (e.g. IAEA method), Hai-ou detergent, EDTANa₂, dilute nitric acid and cupric sulphate solution on the amounts of Pb, Cd, Cr, Hg in human scalp hair, and the content of endogenous Cr, Cd in rat hair have been studied. The results showed that the washing effects of different pretreatment solution on the four elements differ from each other, and the results from experiment with labeled elements (Cd-115m and Cr-51) also indicated that there were some influence on the endogenous Cr, Cd in the rat hair. A preliminary investigation on the mechanism of the combination of endogenous and exogenous elements with hair was also carried out, and it was concluded that both the exogenous elements in human scalp hair and endogenous elements in rat hair could combine with hair proteins.

Scalp hair, collected from different individual, treated with the same external polluted solution, and then washed by one percent Hai-ou detergent solution, were analyzed for elements contaminated and eluted. Results illustrated that the amounts of each element contaminated onto hair and eluted out from hair are significantly different among individuals.

According to our work, we considered that the contents of the four elements in the scalp hair should be determined directly without hair being washed in order to avoid producing the individual difference of the amount of the element washed, when the extent of the external contamination of human scalp hair is neglectable; If the hair sample is dirty to be needed washing, the IAEA method or Hai-ou detergent could be used to clean the sample to get rid of the foreign matter, especially in the case of Hg, Cr. But the best is to drip washing hair sample and to reduce the touching time of hair with washing solution as possibly as we can. Then the contents of the Pb, Cd, Cr, Hg in human scalp hair could be used as a monitor to internal body burden of human beings. However when the extent of the external contamination of human scalp hair is too large, it is uncertain to use the hair pretreatment methods mentioned above, and then it is not suitable to use scalp hair as an indicator to the internal body burden of trace element.

引 言

利用人体材料中微量元素的监测结果去评价环境对人体健康的影响。较单纯的环境媒介监测结果更为直观；较人体健康效应的监督更有预见性。⁽¹⁾

因而它已日趋广泛地被应用于生物监测工作中。和血、尿等人体生物材料相比，头发具有以下优点：头发的采集方便，对于被采样者没有身心痛苦，容易贮存和运输；其中大多数微量元素的含量均较血、尿中的含量为高。从而它的分析和定量更加精密和准确；体内微量元素一旦结合到头发中，不再受人体新陈代谢的影响，是一种可以反映以往接触的“记录丝”^(2, 3, 4)

(Recording filament)

因此，近几

年来，许多科学工作者开展了用发中的微量元素含量评价体负荷⁽⁵⁻¹⁰⁾量并探讨头发中微量元素与各种疾病及老年长寿之间的联系等，仅在国内第三届微量元素研讨会上，有关头发微量元素方面的研究论文就达45篇之多。

但是，头发作为人体微量元素体负荷指示器的应用一直存在着争论，其焦点之一在于如何去除头发上外源性的元素而精确测得其中心源性的微量元素含量。⁽¹¹⁾

国内外都致力于寻找一种有效的清除头发外源性元素的方法。虽然所报导的预处理方法很多，但对其效果的系统性评价较少。本文利用同位素示踪技术，对目前

常用的几种洗发方法，系统地评价了它们对头发内、外源性元素含量的影响；观察了国内常用的洗发剂（1%海鸥洗涤剂）洗发效果的个体差异；并对内、外源性元素和头发结合的特点进行了初步的探讨。力图澄清头发作为体内Pb、Cd、Cr、Hg四种元素体内负荷指示器的可能性。

实验材料和方法

一、样品的制备

1. 人发样品的采集和预处理

在前门红光美发厅收集女性混合发样品。用自来水淋洗去除沾附的脏物后，经105℃烘烤2小时，室温下放置1~2天后，用不锈钢剪刀将样品剪成0.5cm长，充分混合后，装入干净的聚乙烯塑料袋中，在干燥器中贮存备用。

三种人发样品的制品的制备：

1) 原始发样：取上述备用发样，不加任何人为的外源性沾污

(12)

2) 沾污发样：向人工模拟汗液中，加入不同体积的Pb、Cd、Cr、Hg四种元素的无机盐贮备溶液（1000ppm），制成含有上述各元素一定浓度的模拟汗液。按照10ml溶液/g头发的比例，分别向两种溶液中加入上述的原始样品，充

分搅拌后，室温下浸泡18小时。去掉浸泡溶液，将发样用自来水冲洗3次，于105℃下烘烤2小时，放入干燥器中贮存备用。
(15)

3) Cd—115m, Cr—51 沾污的发样。

制备含Cd, Cr为1000 PPb的模拟汗液，根据115m Cd, 51 Cr的比放强度，分别加入8.1mCi 115m Cd和0.045 mCi 51 Cr。充分搅拌后，按10ml/g发的比例向溶液中加入上述原始发样。浸泡18h后，取出发样，用蒸馏水淋洗3次，于105℃下烘烤2小时，贮存于干燥器中。

2 含内源性 115m Cd, 51 Cr的大鼠鼠毛样品

将20只5—6 W的Wistar种雌性大白鼠单只饲养于代谢笼中，把其正中背部的毛发除净（约3×5cm），以不使大白鼠的嘴及四肢触及为准；同时，分别注射含载体浓度为1000 PPb放射性强度为2μCi的115m Cd和51 Cr的生理盐水溶液（PH=7）每两天腹腔内注射一次，共5次。注射到大鼠体内总的放射性强度为10μCi/只，继续饲养直到拔毛区的毛发完全长出为止（约2~3 W）。剪下新生的毛发，全部放入2000ml的大烧杯中，加入适量的蒸馏水，用玻璃棒搅拌均匀后，倾掉水，于105℃烘烤2小时，放入干燥器中备用。

3. 可溶性毛发蛋白质溶液的制备

1) 毛发蛋白质的提取

(13) (14)
按照Baden 及Gillespie 等人的碱

性还原提取法提取毛发蛋白灰。提取液中含有： 0.2 M 羧基乙酸钾， 8 M 尿素， 0.2 M 1,3-丙二醇， $\text{pH} \approx 9 \sim 11$ 。按照 100 ml/g 发比例于 40°C 水浴中提取2小时。

分别提取含内源性 115 mCi ， 51 Cr 的鼠毛及含外源性 115 mCi ， 51 Cr 的人发蛋白灰溶液。加适量的固体碘乙酸，暗处放置30分钟后，备用。

2) 蛋白灰溶液的透析

将上述两种蛋白灰溶液装入透析袋中。先于流动的自来水透析一天，然后对蒸馏水透析。每天至少换水两次，三天后，每日取透析的蒸馏水 200 ml 蒸发干燥后测定其中的放射性。直到放射性检测不出为止。停止透析，样品盛于试管中， 40°C 保存备用。

二、测试方法

1. 非放射性测定

1) 头发中 Pb 、 Cd 、 Cr 的测定

发样以高氯酸：硝酸为 $1:4$ 的混合酸湿消化。用 P-E 3030 原子吸收仪（石墨炉法 $\text{HGA}-400$ ）测定 Pb 、 Cd 、 Cr 的含量。同时测定日本 NIES 标准参考发样做为质量控制手段。

表1 P—E 3 0 3 0原子吸收仪(石墨炉
H G A—4 0 0)对三种元素检出限
(P P b)

元素	P b	C d	C r
检出限	0.5 7	0.1 3	0.2 7 1

表2 三种元素的测定条件

元 素	P b	C d	C r
干燥温度(℃),	1 2 0	1 2 0	1 2 0
时间(秒)	2 0	2 0	2 0
灰化温度(℃),	5 0 0	2 5 0	1200
时间(秒)	2 0	2 0	2 0
原子化温度(℃),	2300	2100	2500
时间(秒)	5	5	0
清除温度(℃),	2500	2500	2700
时间(秒)	3	3	3

2) 发Hg的测定

发样以硝酸: 硫酸(1+1): 盐酸为7:5:0.8的混合酸在70℃消化40分钟, 用上海590型冷原子吸收仪测定发Hg。仪器的最低检出限: 0.01 μgHg , 测定条件: 载气流量(空气或普氮): 80 ml/分; $\times 800$ 档。指针的最大指示数为样品测定的终点。

2. 放射性测定

外源沾污 ^{51}Cr , $^{115\text{m}}\text{Cd}$ 的人发样及内源性 ^{51}Cr 大鼠毛样品装入测量盒中, 使用卫生部工业卫生实验所自装备的低本底反康普顿效应 γ —谱仪测定样品中 γ 线的衰变数, 内源性 $^{115\text{m}}\text{Cd}$ 大鼠鼠毛用 β 计数器测定 β 线强度以每分钟计数(cpm)表示样品中的放射性强度。

3. 头发 pH 值的测定

将蒸馏水($\text{pH}=6.98$)装入25 ml的比色管中, 先平衡放置2小时后(pH 值的变化已稳定), 将头发装入其中, 直到浸泡液中 pH 值不变。用蒸馏水 pH 值的变化量 ΔpH 来表示头发 pH 值的大小。

4. 毛发蛋白质的分组, 定量及放射性强度的测定

将透析后的毛发蛋白质溶液过 $1 \times 30 \text{ cm}$ Sephadex G-75 (粒径范围40~120 μm) 的柱子, 以 Tris-HCl ($\text{pH}=8.9$) 缓冲溶液作为洗脱液, 流速大约0.3 ml/min,

接2.5 ml/管分部收集洗出液。

取上述分部收集液，用751型可见——紫外分光光度计，于280 nm，250 nm 波长处测定吸光度，绘制毛发蛋白质的洗脱曲线。

上述各管样品测量蛋白质浓度后，分别转移到小测量盘中，红外灯烘干后测量 β 线放射衰变数。得到 ^{115m}Cd 放射性强度的洗脱曲线。

实验结果

一、洗发方法对Pb、Cd、Cr、Hg洗脱效果的评价

洗脱效果的表示方法：

$$\text{洗脱比}(\%) = \frac{\text{原发样洗前元素含量} - \text{原发样洗后元素含量}}{\text{原样洗前的元素含量}} \times 100$$

$$\text{洗脱率}(\%) = \frac{\text{沾污样洗前元素含量} - \text{沾污样洗后元素含量}}{\text{沾污样洗前元素含量} - \text{原样洗前元素含量}} \times 100$$

1. Pb

1) IAEA法

国际原子能委员会 (IAEA) 于一九八四年首次全球性 “作为评价体内环境矿物元素污染物方法的头发分析协作研究会议” (11) 上提出了标准的洗发方法。即：丙酮—水—水—水—丙酮，每次 10 分钟 (简称 IAEA 法)

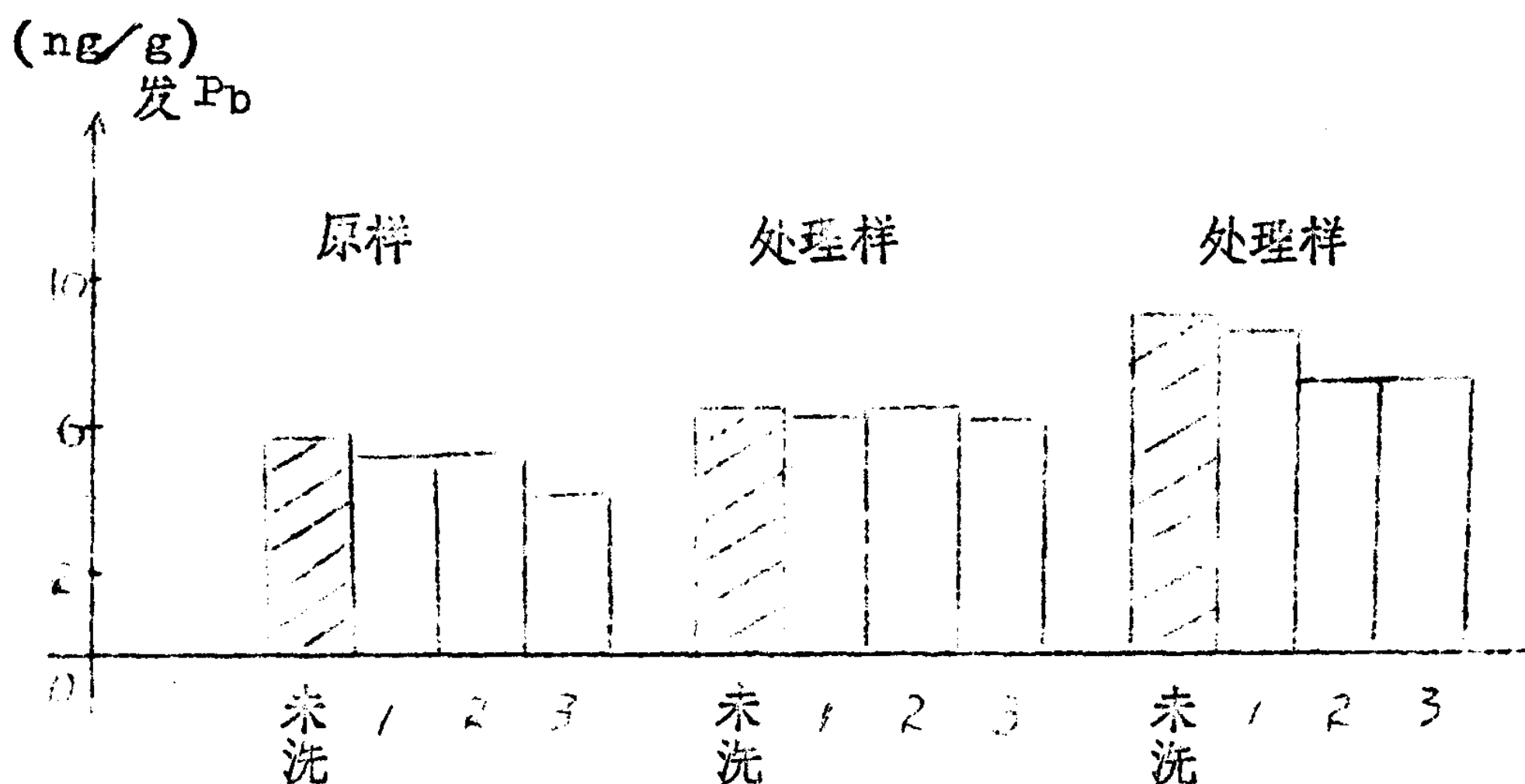


图 1 IAEA 法对发 Pb 的洗脱影响

图 1 是 IAEA 法对三种不同程度外源性 Pb 沾污发样的洗脱结果。洗发前，三种样品的含 Pb 量不同 ($P < 0.05$)。

原始样品用 IAEA 法洗发 1~2 次，含 Pb 量和洗前的含量没有差别 ($P > 0.05$)，洗发 3 次后，发 Pb 降到 4.4 PPM ($P < 0.05$)，洗脱比为 16%。

对含 Pb 50 ppb 的模拟汗液沾污的发样，IAEA 法洗发 10

3次后,发Pb的含量和洗前的无差别($p > 0.05$);含Pb 500 ppb的模拟汗液沾污的发样,经IAEA法洗1~2次后,发Pb降至7.6 ppm,较洗前发Pb水平(9.2 ppm)为低($P < 0.05$)。

三种样品经IAEA法洗发3次后,发Pb含量分别为4.4 ppm, 6.0 ppm, 7.6 ppm,三者之间有显著性差别($P < 0.05$)。后二者比原样洗前发Pb水平(5.2 ppm)高。这说明,IAEA法对于人工外沾污的Pb只能部分除去,洗脱率在40%。

2) 海鸥洗涤剂

室温下利用海鸥洗涤剂浸洗头发是国内较常用的一种预处理方法。但用于发Pb测定的报导较少。本实验对头发外沾污Pb的洗脱结果如图2、图3所示。

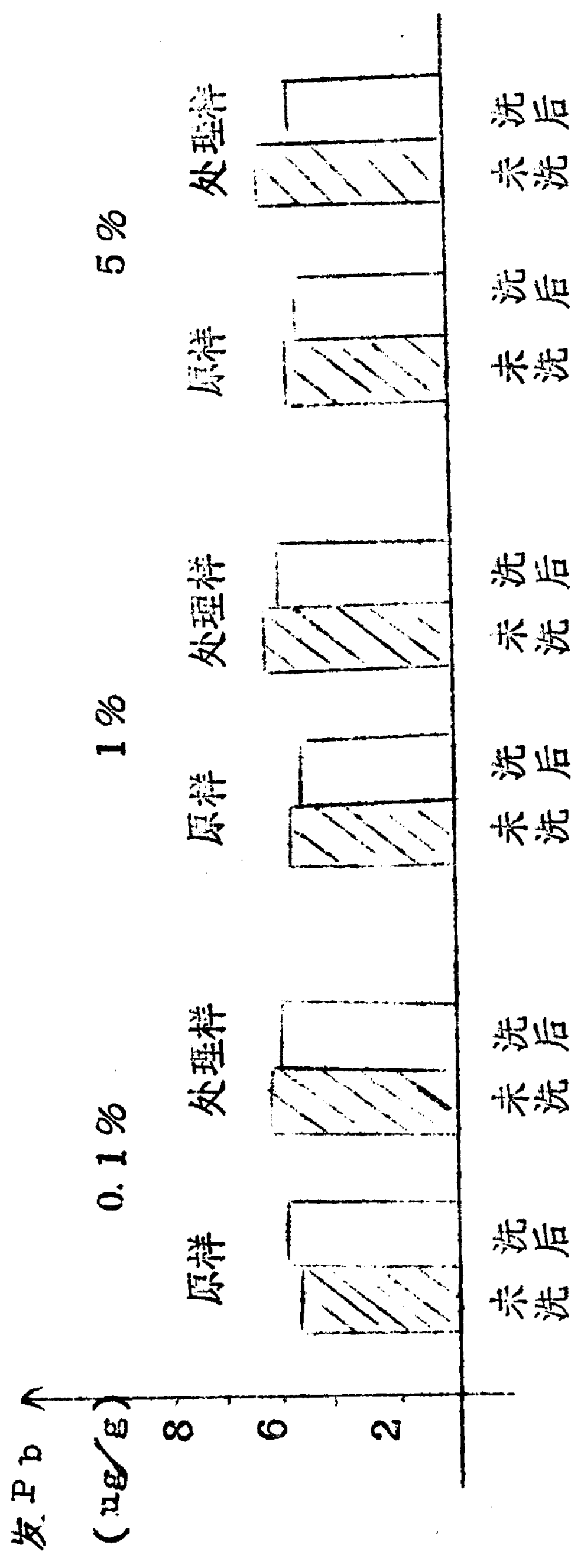


图2 海鸥洗涤剂对发 Pb 的洗脱影响

国内使用海鸥洗涤剂常用的浓度有0.1%、1%、5%。图2所示的是三种浓度海鸥洗涤剂对两种发样的洗涤结果。

用0.1%、1%、5%三种浓度的海鸥洗涤剂在室温下洗涤原始发样30分钟以后，发Pb的含量依次为5.6ppm、5.0ppm、5.1ppm ($P>0.05$)，说明三种浓度的洗脱能力没有差别；和洗前的发Pb (5.2ppm) 相比，对原发Pb没有影响。

三种浓度的洗液对于沾污样室温下洗发30分钟，发Pb含量没有差别，与洗前发Pb水平相比，没有明显下降。

国内使用海鸥洗涤剂洗发时间不等，一般在60分钟~90分钟之间。图3可见，1%海鸥洗涤剂30~90分钟对发Pb的洗发效果相差无几。

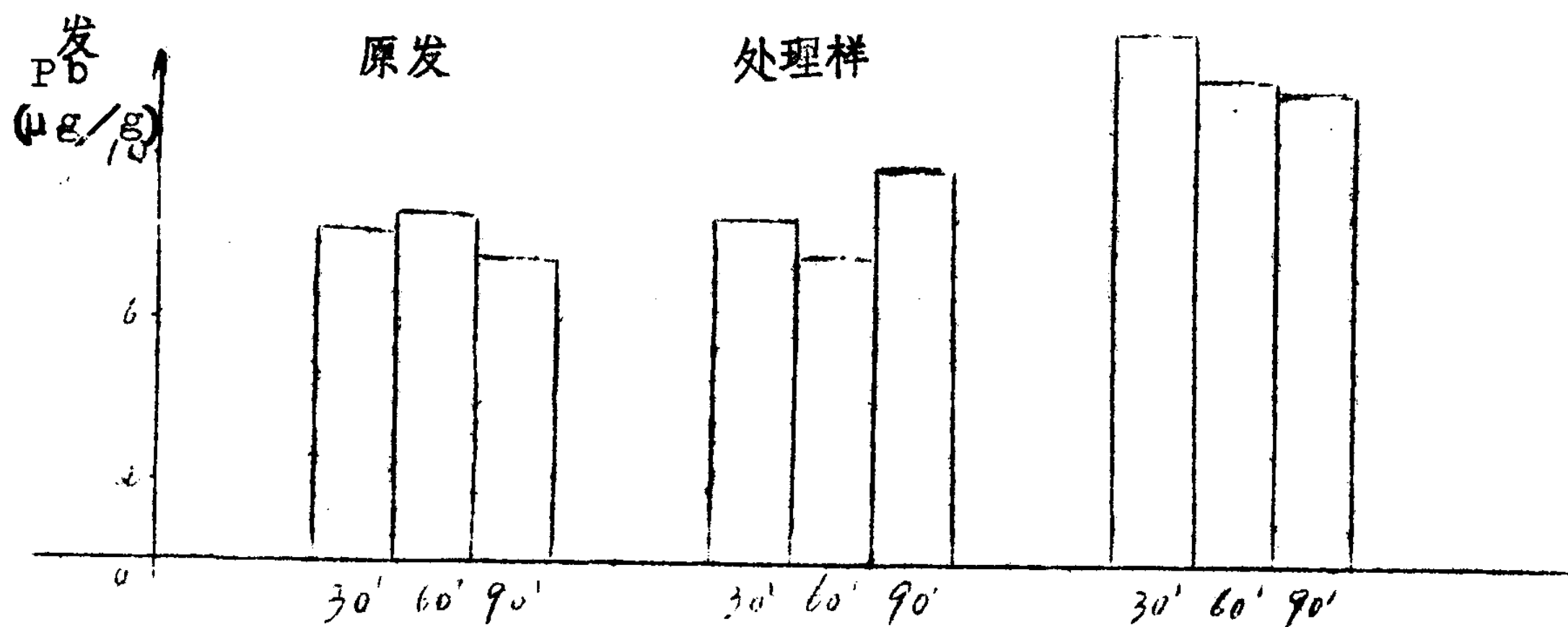


图3 1%海鸥洗涤剂不同时间对发Pb的影响

实验结果表明：海鸥洗涤剂对发Pb的去除能力很低。

3) EDTANa₂ 溶液

国外有人使用近沸騰的 EDTANa₂ 溶液做头发外沾污 Pb 的洗脱液在近沸騰下对发 Pb 的洗脱结果如图 4 所示。

由图可见，原发样经 30 分钟洗发后，发 Pb 下降约 40%，增加洗发次数，发 Pb 水平的变化趋于恒定。表明剩余的发 Pb 和头发结合的较紧密，不能被 EDTANa₂ 洗脱。

沾污样品，经一次洗发后，发 Pb 呈明显的下降。三次洗后发 Pb 仍比经 EDTANa₂ 3 次洗后原样的发 Pb 水平高 ($P < 0.05$)。这说明，浸泡沾污的样品，Pb 与头发结合较紧密，EDTANa₂ 对于沾污程度不同的发样，不能使之洗脱到相同的水平。由于实际得到的发发样，存在着不同程度的外界沾污，在这种情况下，EDTANa₂ 的洗发效果不令人满意。

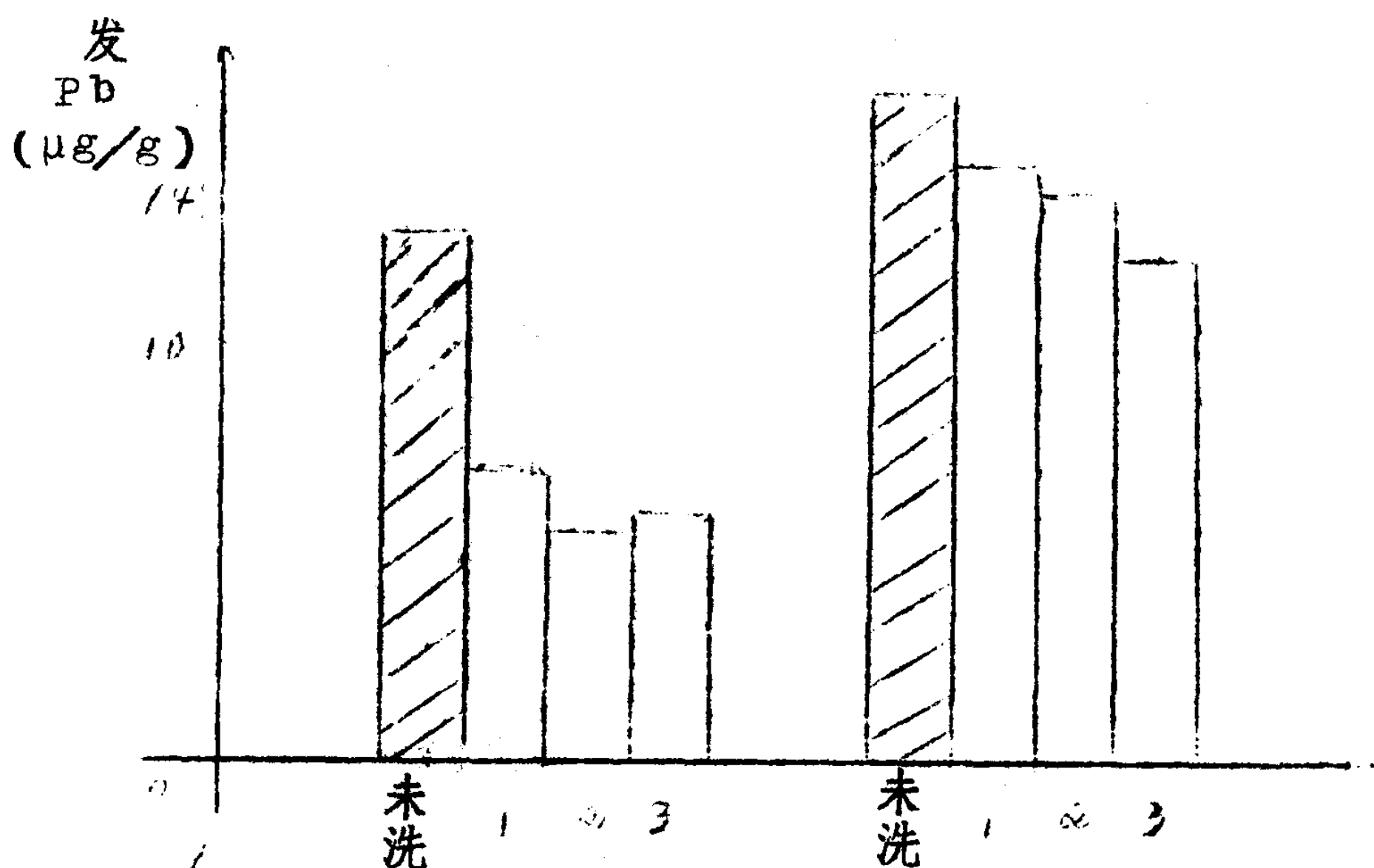


图4 EDTANa₂ 对发 Pb 的洗脱影响

4) 稀硝酸溶液

稀酸作为头发外源性Cd、Zn、F的去除方法国内外曾有人报告。本实验中观察对Pb的洗脱情况，结果示于图5。

原始样品洗涤一次后，发Pb由原来的12.6 ppm降至2.2 ppm。但增加发样的洗涤次数，Pb的洗脱量逐渐降低。这一方面说明硝酸对发Pb有较强的去除能力。另一方面显示了剩余的Pb与头发结合的牢固。

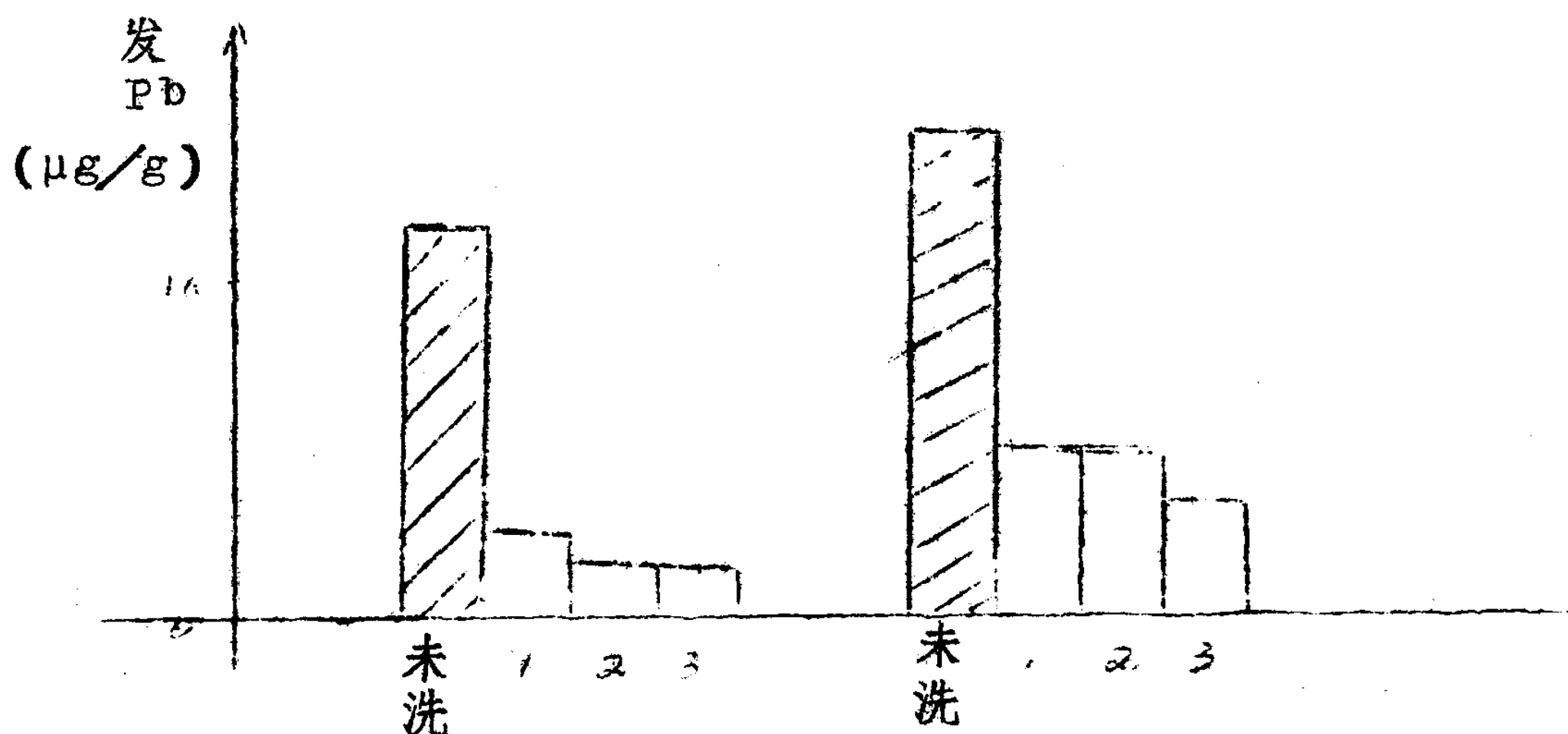


图5 稀硝酸对发Pb的洗脱影响

沾污发样经一次洗发后，发Pb降到4.8 ppm。已经低于未沾污发Pb水平(12.6 ppm)，但增加洗发次数，每次去除Pb量减少，而且剩余的发Pb量较原样洗后三次的高($P < 0.05$)。可见，模拟汗液浸泡发样后，与头发结合牢固的Pb的部份含量也增加了，而对于不同沾污程度的发样，稀硝酸不能使之洗脱到相同水平。

5) 硫酸铜溶液