BIBLIOTHEEK
RIJKSINSTITUUT VOOR
VISSERIJONDERZOEK

RIVO

CA 83-10

# HET ANTAGONISTISCH EFFECT VAN SELEEN OP DE TOXICITEIT VAN KWIK EN ANDERE ZWARE METALEN.
BEPALING VAN SELEEN.

EEN LITERATUURVERSLAG.

Arnold Toonen.

CA 83-10

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK
IJMUIDEN

# RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 — Postbus 68 — IJmuiden — Tel. (02550) 1 91 31


**Afdeling:** CHEMISCH ONDERZOEK

**Rapport:** CA 83-10

HET ANTAGONISTISCH EFFECT VAN SELEEN OP DE TOXICITEIT VAN KWIK EN ANDERE ZWARE METALEN.
BEPALING VAN SELEEN.

EEN LITERATUURVERSLAG.

**Auteur:** Arnold Toonen.

**Project:** 2-7137 "Kwikonderzoek".

**Projectleider:** H. Pieters.

**Datum van verschijnen:** Januari 1984.

**Inhoud:**


I SAMENVATTING.
II SELENIUM.
III BEPALING SELENIUM.
IV KWIK.
V KWIK EN SELENIUM.
VI CONCLUSIES.
VII WERKZAAMHEDEN.
VIII LITERATUURLIJST.



***DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.***


/MV


2293110

HET ANTAGONISTISCH EFFECT VAN SELEEN OP DE TOXICITEIT VAN KWIK EN ANDERE ZWARE METALEN.
BEPALING VAN SELEEN.

EEN LITERATUURVERSLAG.

# I SAMENVATTING/DOELSTELLING PROJECT.

Het doel van het onderzoek is de analyse van seleen (= selenium Se periodieksysteem nummer 34) in visserijprodukten. De interesse voor seleengehalten komt voort uit het antagonistisch effect van seleen op de toxiciteit van zware metalen, vooral kwik (Hg) en wel in de vorm van methylkwik, dat zeer giftig is. Seleen zelf echter is ook giftig in bepaalde concentraties (> 4 ppm in voedsel), maar is in kleine hoeveelheden belangrijk voor de stofwisseling.

LEONZIO (18) vond in vis uit de Middellandse Zee een nauwe correlatie tussen het Se- en het Hg-gehalte. De som gaf een lineair verband uitgezet tegen de leeftijd. KOEMAN (16, 17) vond in zeezoogdieren en zeevogels een 1 : 1 correlatie tussen Hg en Se in de spierweefsels. De vraag is gerezen of er ook verbanden te vinden zijn tussen de seleen- en kwikgehalten en de biologische parameters van zoetwatervis zoals snoekbaars en baars uit Nederlandse wateren en van zeevis uit de Noordzee. De Hg-gehalten van snoekbaars en baars zijn reeds bepaald en staan vermeld in rapporten van H. PIETERS et al (26, 27, 28).

Er zijn verschillende manieren om seleen in vis te bepalen. Gekozen is voor een derivatiseringsreactie. Na ontsluiting wordt seleen gekoppeld aan 2,3-diaminonaftaleen tot een benzopiazselenol en fluorometrisch bepaald.

## II Selenium.

### Inleiding:

Selenium is een half metaal dat wordt gebruikt in elektrische apparatuur zoals foto-elektrische cellen, transistors, etc., bij kleurstoffen voor plastics en in de rubber- en staalindustrie, enz. (24). Het komt van nature ook voor in betrekkelijk geringe, wijd over de aarde verspreid in van plaats tot plaats wisselende concentraties. Voedsel zoals vlees, nieren en zeedieren, rijst en graan bevatten relatief veel seleen in tegenstelling tot groenten en fruit (24). De laatste jaren neemt de lozing van seleen in zee toe en daarom wordt Se beschouwd als een mogelijke toekomstige zeevervuiling (23). Selenium is van belang voor organismen daar het in kleine hoeveelheden een rol speelt bij de vitamine E stofwisseling (0,05 - 0,1 ppm voedsel) (4, 24). Echter in grotere concentraties (> 4 ppm voedsel (24)) is selenium giftig en schijnt zelfs carcinogeen te zijn (23). In 1943 zou gebleken zijn bij een FDA (Food and Drug Administration/America)-onderzoek dat Se kankergezwellen zou veroorzaken in ratten. Uitvoerig verder onderzoek heeft dit echter niet bevestigd (24). Seleen biedt zelfs bescherming tegen bepaalde kankerverwekkende stoffen. Een seleniumtekort in voedsel leidt in vee tot ziekteverschijnselen, zoals spierzwakte, groeivertraging en zelfs de dood (white muscle disease). Dit heeft in Amerika op seleenarme bodems geleidt tot grote verliezen in de veefokkerij (4, 24). Seleentekorten in combinatie met vitamine E gebrek leidt in ratten en muizen tot lever necrose en pancreatische atropie, en dergelijke (4).

### Giftigheid:

De giftigheid van seleen is afhankelijk van verschillende factoren zoals concentratie, chemische vorm, vitamine E aanwezigheid, soort dier, leeftijd, geslacht, opname antagonisten, etc. De giftigheid is te verdelen in acute en chronische giftigheid. Bij de acute vergiftiging wordt de lever het eerst aangetast en bij een verlengde blootstelling leidt lever cirrhose snel tot de dood (4). Chronische vergiftiging leidt in vee tot de alkali disease, dat voorkwam in Amerika doordat de bodem een hoog seleengehalte bevatte en het vee planten at met een hoog seleengehalte (> 4 ppm). De verschijnselen zijn haaruitval, uitval van tanden, afbrokkeling van nagels en hoeven en verlammingsverschijnselen (4, 24). Ook in mensen zijn in Amerika vage verschijnselen waargenomen door seleenvergiftiging (zoals ook tandcaries, dat ook door hoge Se-gehalten veroorzaakt schijnt te worden). Ook is Se teratogeen, dat wil zeggen het heeft gevolgen voor het nageslacht door miskramen of afwijkingen bij babies (4). Se giftigheid zou worden veroorzaakt door storingen in het zwavelmetabolisme (Se en S zouden verwisseld kunnen worden) of doordat seleniet oxiderende eigenschappen heeft of $Se^{o}$ oxideert sulfhydryl enzymen (11).

### Metabolisme:

Se wordt snel opgenomen via het darmkanaal in de vorm van in water oplosbare verbindingen en verder snel door het bloed verspreid over het hele lichaam, in lever en nieren het meest (4, 24). Een grote dosis wordt ook weer uitgescheiden door middel van urine, faeces en de luchtwegen (23). Niet alleen de weefsels kunnen slechts een maximum Se opslaan, maar ook wordt het uitscheidingsmechanisme gestimuleerd door Se (4, 22). Het Se metabolisme in het lichaam is weer-

gegeven in figuur 1 (22).

De verschillende vormen van seleen (VI, IV en II) worden in het lichaam omgezet tot verschillende produkten die ofwel nodig zijn voor de stofwisseling of uitgescheiden, opgeslagen of gebonden worden.

Het seleen wordt eerst omgezet in Se IV en dan volgt de belangrijkste reactie van seleniet met gereduceerd glutathion (GSH) tot selenodiglutathion. Naast GSH reageren op dezelfde wijze: L-cysteïne, coenzym-A of mercaptoethanol, en andere. Het selenodiglutathion wordt verder omgezet door het enzym glutathion reductase en NADPH tot het waterstofselenide $H_2Se$. $H_2Se$ is niet stabiel en wordt verder omgezet tot het elementair seleen of gebonden aan eiwitten of metalen of omgezet tot dimethylselenide en dan verder tot het trimethylselenonium ion dat in geval van acute Se vergiftiging uitgescheiden wordt via urine en de luchtwegen.

Behoefte:

Seleentekorten leidt tot ziekten (white muscle disease) (4, 24). Se is een belangrijk micronutriënt en de behoefte is onder andere afhankelijk van het vitamine E gehalte in het voedsel. De benodigde hoeveelheid is bij ratten met een normaal vitamine E gehalte 0,04, kippen 0,08 om exudatieve diathese te voorkomen. Om white muscle disease te voorkomen is voor runderen 0,1 ppm nodig in het voedsel. Voor mensen is het onbekend.

Functie:

Er is gebleken dat Se een onderdeel is van enzymen, bijvoorbeeld glutathione peroxidase (4). Vitamine E is nodig om de peroxidase van onverzadigde lipiden op bindingsplaatsen in intercellulaire membranen te voorkomen of te regelen. Glutathione peroxidase metaboliseert de gevormde lipoperoxiden verder (4) (Glutathion ontleedt ook $H_2O_2$ (3)). Er zijn reeds meer dan tien enzymen gevonden die Se bevatten. Met dit gegeven zijn de ziekteverschijnselen door Se-tekort te verklaren. Se-tekort leidt tot storingen bij de omzettingen van moleculen. Selenig zuur ($H_2SeO_3$) kan spontaan met vier thiol residu's reageren tot een selenotrisulfide en een geoxideerde thioldisulfide (4). Deze reactie is de belangrijkste oorzaak van de giftigheid van Se. Hierdoor kunnen bepaalde enzymen gedesactiveerd worden waardoor er een chaos ontstaat in de biochemie van cellen.

Antagonisme:

Het antagonistisch effect van Se op Hg wordt in onder andere paragraaf ~~III~~ V besproken.

Er is eigenlijk nog weinig bekend over het mechanisme van antagonisme van Se. Er is gebleken dat arseen een beschermende werking heeft tegen de chronische en acute giftigheid van Seleen. Hoewel arseen zelf ook giftig is, biedt het juist bescherming in combinatie met andere metalen (4). Het verhoogt onder andere de uitscheiding van Se. Se zelf echter beschermt tegen de giftigheid van cadmium, koper, kwik en methylkwik. Dit is gevonden in algen door de groei van de cellpopulatie te meten (11) na toevoeging van Cu, Hg en Se apart en Cu/Se en Hg/Se tesamen. Verder is dit gevonden in ratten voor Se/Pb (29) en in kwartels voor Se/Hg (15). Ook beschermt Se als selenaat in het voedsel tegen de giftigheid van thallium, dit geldt ook andersom (4). Er wordt kennelijk door Se en een metaal een complex ge-

bron

(22)



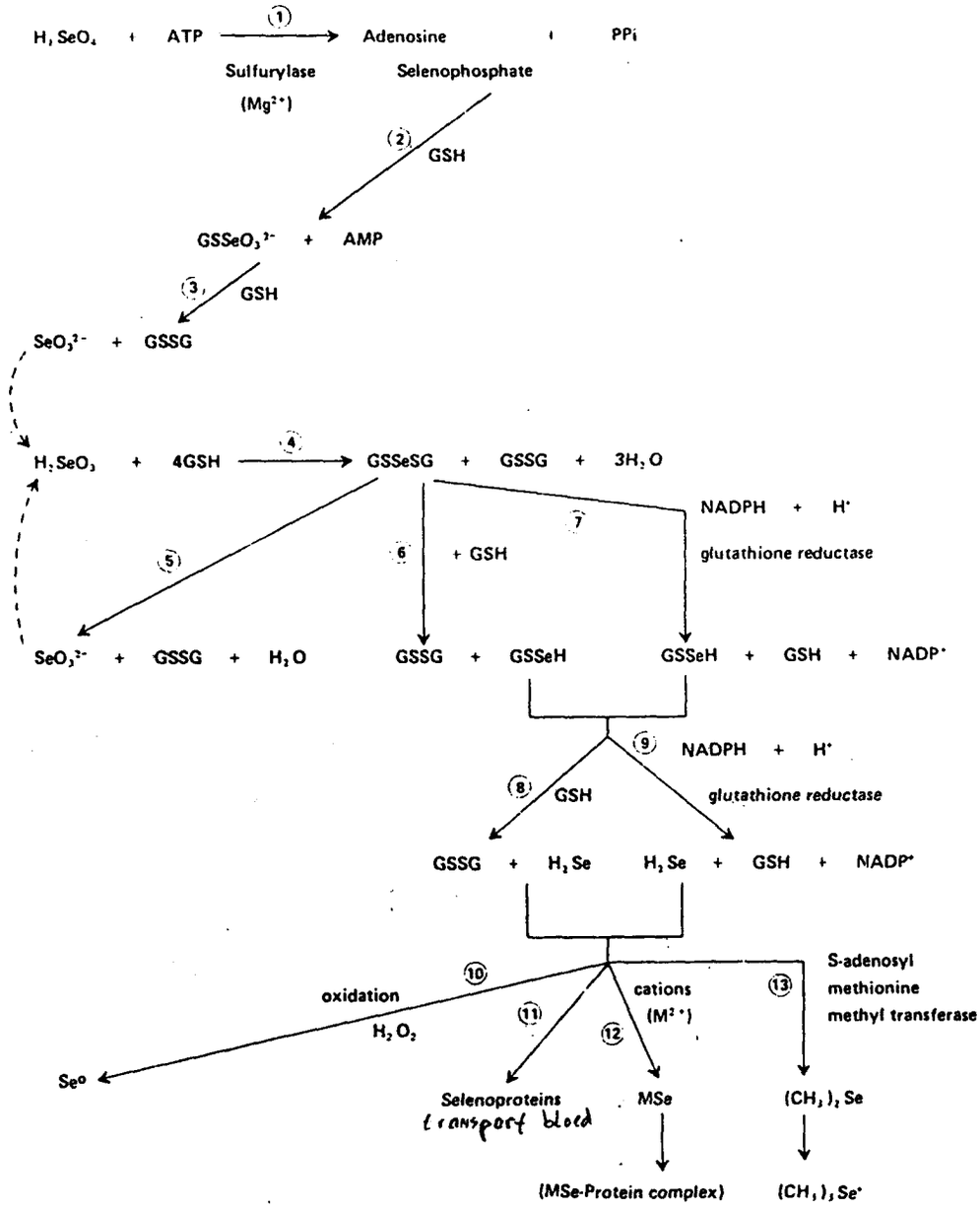



FIGURE 1 Mammalian metabolism of selenate and selenite. (Liver, Kidney)

vormd dat minder giftig is dan de stoffen apart.

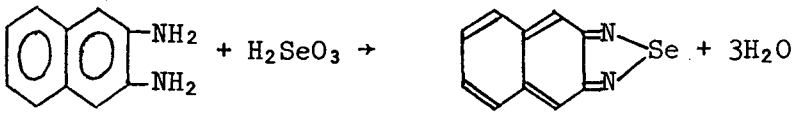
## III BEPALINGSMETHODE SELEEN.

Fluorometrische seleenbepaling in visserijprodukten volgens J.B. LUTEN en W. BOUQUET, TNO, IJmuiden, 1983.

Principe:

Ontsluiting van het monster gebeurt met salpeterzuur, perchloorzuur en zoutzuur (het zoutzuur dient om selenaat te reduceren tot seleniet). Het seleniet wordt gekoppeld aan 2,3 diaminonaftaleen (DAN) tot een 4,5 benzopiazselenol en dit wordt geëxtraheerd met cyclohexaan en fluorometrisch bepaald (excitatie 378 nm, emissie 520 nm)

Koppelingsreactie :




Bepaling:

1. Destructie : 1 gram gehomogeniseerd monster wordt afgewogen in een teflon kroes. Daaraan wordt $HNO_3$ toegevoegd en gedestrueerd in de stoof bij 150 °C gedurende 16 uur. Na afkoelen wordt $HClO_4$ toegevoegd en 1 uur in de stoof gezet bij 150 °C. Na koeling wordt weer verwarmd tot witte nevels ontwijken. Na koeling wordt HCl toegevoegd en verwarmd gedurende 2 uur bij 105 °C.

2. IJklijn : Uit een standaardoplossing worden minimaal drie verschillende hoeveelheden genomen die in de buurt van het concentratietraject van de monsters liggen. Toegevoegd wordt $HClO_4$ en HCl en aangevuld tot 15 ml.

3. Blanco : Als blanco wordt $HClO_4$ en HCl genomen en aangevuld tot 15 ml.

4. Reactie : Als alle oplossingen aangevuld zijn tot 15 ml, wordt EDTA toegevoegd, om eventuele storingen van andere metalen te vermijden en met 25 % $NH_4OH$ en 3m HCl wordt de pH op 1,2 ± 0,2 gebracht met een pH meter. Dan wordt DAN reagens toegevoegd en de oplossing kortstondig aan de kook gebracht.
Na koeling wordt geëxtraheerd met 4 ml cyclohexaan en 5 min. geschud.
De organische laag wordt daarna overgebracht in een centrifugebuis en gecentrifugeerd bij 200 rpm gedurende 30 min. Daarna kan de organische laag overgebracht worden in een cuvet en de fluorescentie gemeten worden.
Met de blanco wordt de meter op nul schaaldelen gezet en de destructieblanco en de monsters worden gemeten ten opzichte van de standaardoplossingen.

Berekening:

Het gehalte aan seleen wordt berekend met de formule

$$A = \frac{h_m - h_{bl}}{h_{st}} \cdot \frac{V.\ S}{m}$$ , waarbij

A = gehalte Se in mg/kg (ppm)

$h_m$ = uitslag monster

$h_{bl}$ = uitslag blanco

$h_{st}$ = uitslag standaard

v = volume van standaardoplossing gepipetteerd, in ml.

s = concentratie seleen standaardoplossing in mg/ml

m = gewicht monster in grammen.

Discussie:

De fluorescentie meting zal worden uitgevoerd met een AMINCO fluorocolorimeter 4-7440 met behulp van filters. Gebruik zal worden gemaakt van een filter dat doorlaat tot 380 nm voor de emissie en een filter dat onder 410 nm geen licht doorlaat voor de excitatie. Een nadeel van het werken met filters is dat het strooilicht, dat altijd voorkomt, in een veel mindere mate tegengehouden wordt. Hierdoor wordt de gevoeligheid en nauwkeurigheid een stuk minder. De detectiegrens van de methode van LUTEN & BOUQUET is 0,008 ppm, gedefinieerd als drie maal de standaardafwijking van de blanco. Als de blanco hoog is door strooilicht, zal de detectiegrens dus ook toenemen. Daar we werken in concentratiegebieden van 0 - 0,5 ppm Se in vis zal een verhoging ten gevolge van strooilicht wel meevallen, maar dit zal in de praktijk moeten blijken.

Omdat de DAN-oplossing lichtgevoelig is en onder invloed van licht wordt afgebroken moet de oplossing bewaard worden in een donkere fles bij 4 °C. Direct zonlicht dient te worden vermeden bij de voorbereidingen en de meting.

Voordelen van deze methode zijn de specificiteit voor seleen en de gevoeligheid, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid. Echter de reproduceerdbaarheid bij AAS is groter (24). OLSMAN (24) maakt een vergelijking tussen de opbrengst van de fluorimetrische en atoomemissie methode bij de bepaling van Se in vleeswaren. Laatstgenoemde techniek geeft in het algemeen "iets" (tot 20 %) hogere waarden.

Een onderzoek naar de recovery van de methode zou kunnen door standaarden de hele destructie te laten ondergaan en/of een standaard toe te voegen aan een vismonster en te bepalen hoeveel seleen wordt teruggevonden.

Ook zou standaard additie toegepast kunnen worden, maar omdat er vele monsters onderzocht en per monster meerdere standaards toegevoegd moeten worden zal dit in verband met de tijdsduur slechts één maal onderzocht worden.

Andere bepalingsmethoden van selenium:

Gaschromatografische bepaling:

Met deze methode kan tevens bepaald worden in welke vorm en hoeveelheid seleen aanwezig is in het monster (1).
Het monster wordt ontsloten door geconcentreerd $HNO_3$ dat alle Se II oxideert tot Se IV. Se VI blijft onaangetast en zal niet meebepaald

worden. Om het totale Se gehalte te bepalen moet eerst Se VI gereduceerd worden tot Se VI door het monster te behandelen met 6N HCl bij een temperatuur van 100 °C. Daarna wordt 2 m ureum toegevoegd en aangezuurd tot 6 N HCl bij 20 °C en gewassen met benzeen.
Na dit wordt alle Se IV omgezet met 4 nitrofenylenediamine bij 75 °C tot een 5-nitropiaselenol derivaat dat in benzeen wordt geëxtraheerd. Het benzeen moet worden gewassen met 1 N $NH_4OH$ en 1 : 1 (v/v) $MgSO_4$-Florisol (watervrij). Hierna kan de gaschromatografische bepaling volgen (1).
Het Se VI gehalte kan berekend worden uit het verschil tussen het gevonden Se-gehalte na totale ontsluiting met 6 N HCl 100 °C en het gehalte (= gehalte Se II + Se IV) na ontsluiting zonder 6N HCl 100 °C.
Een nadeel van deze methode is dat hij nogal arbeidsintensief is.

Atomic Absorption Spectrometrie:

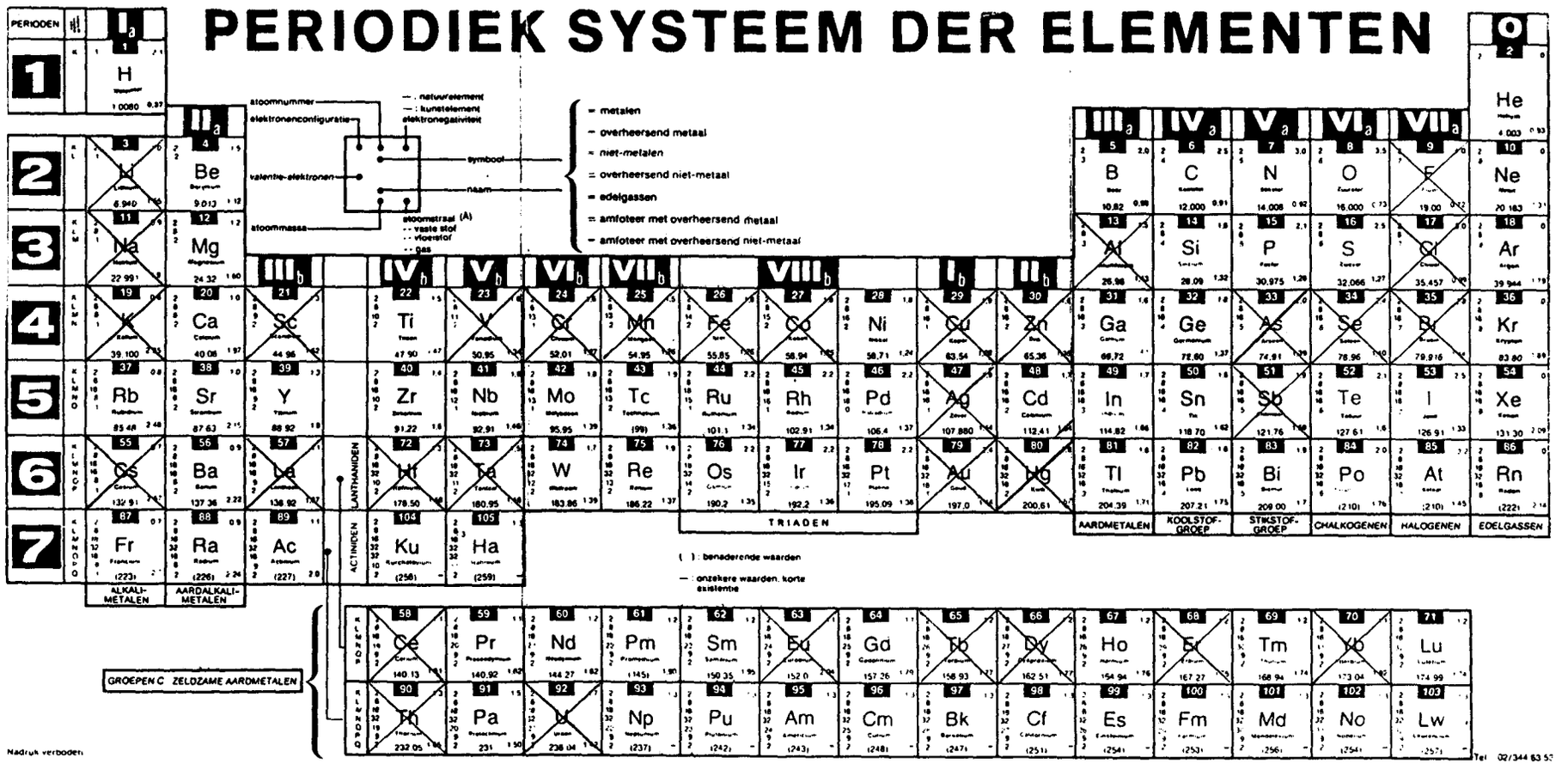
De gaschromatografische en fluorometrische bepalingen van seleen zijn nogal arbeidsintensief en in bepaalde gevallen onderhevig aan storingen (bijvoorbeeld van andere metalen of door verschillende matrices).

Ten opzichte van de colorimetrische methoden, is voor vlamloze AAS de absolute detectielimiet hoger, namelijk 20 ng/g, gedefinieerd als 2 x standaardafwijking blanco (σ) in tegenstelling tot LUTEN en BOUQUET; 8 ng/g gedefinieerd als 3 x (σ) blanco. (5). Ook een nadeel is de minder goede reproduceerbaarheid. De vlamloze techniek berust op de atomaire absorptie van het betreffende hydride van Se dat gevormd kan worden zowel na droge verassing als natte destructie (32).
Nadat het Se ontsloten is wordt natriumborohydride-oplossing toegevoegd en wordt $H_2Se$ gevormd. Dit wordt in een verhitte kwartsbuis geleid die in de lichtweg van een atoom absorptie spectrometer geplaatst is (λ absorptie = 196,0 nm).
Voor seleen wordt een natte destructie aangeraden (6).

Naast deze methode kunnen ook nog toegepast worden AAS met vlam en AAS met grafietoven. Deze methoden zijn echter gevoelig voor storingen door andere metalen en complexe (organische) matrices, en worden daarom weinig toegepast.
Als ze wel toegepast worden dan met de standaard additie methode (5).
Een andere AAS methode is de methode met behulp van hydridevorming met vlam (10) (zonder vlam zie (32) en boven (6)).
Na het monster ontsloten te hebben wordt een 5 % (w/v) natriumborohydride in 0,1 % w/v natriumhydroxide oplossing (4 ml) geïnjecteerd in een reactievat en het hydride $H_2Se$, dat verdampt, wordt in de vlam geleid (lucht - acetyleen). De piek wordt gemeten met een recorder. Gecorrigeerd moet worden met een blanco én voor absorptie (niet automatisch) veroorzaakt door vlamturbulentie door waterstofontwikkeling (gemeten met een waterstof continuum lamp).

SUDDENDORF (32) meldt nog een bepaling voor Hg met behulp van Cold Vapour Generation A.A.S. waarbij Se stoort, evenals tellurium.
De opzet was om Se en Te te maskeren om Hg goed te kunnen bepalen.
In een reactievat werd een reducerende oplossing gedaan:
Aan geconcentreerd zwavelzuur (50 ml) werd toegevoegd 15 g NaCl, 15 g hydroxylaminesulfaat en 25 g tin(II)chloride in 500 ml water.
Per keer werd 25 ml hiervan gebruikt en 25 ml water toegevoegd.
Door het vat werd een luchtstroom geleid van 1,5 l/min. Via een

# PERIODIEK SYSTEEM DER ELEMENTEN

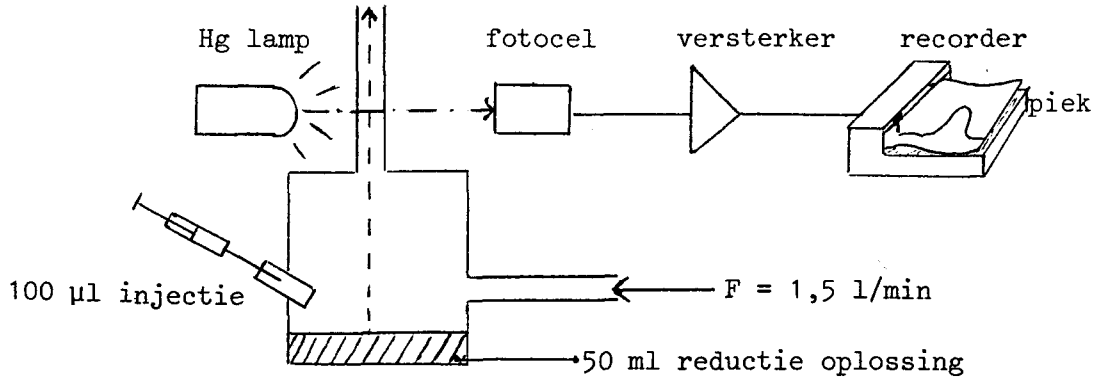



Nadruk verboden

Tel 02/344 63 53

septum werd het monster (met Hg) geïnjecteerd in het vat. De ontstane Hg damp werd langs een kwiklamp geleid (253,7 nm) en een piek werd gemeten via een recorder.

Schema:




Se en Te verminderen alleen de Hg absorptie als het Se of Te aanwesig was in de reductie oplossing voordat Hg geïnjecteerd was. Kennelijk werd Hg gebonden tijdens de reductie als selenide en was verdere reductie en verdamping niet meer mogelijk.
Ook het RIVO maakt gebruik van een gemodificeerde versie van de Vapour Generation A.A.S. voor de bepaling van kwik in vis (27). Men plaatst echter na het reactievat een goudfilter. De gevormde kwikdamp hecht zich aan het goud en vormt een amalgaan. Op deze manier wordt het kwik geconcentreerd. Na verhitting tot 450 °C van het goud zal het kwik weer verdampen en wordt het verder naar de meetcel geleid, waar een piek gemeten wordt met behulp van een recorder. Deze methode is gevoeliger en nauwkeuriger dan eerder beschreven methoden zonder concentrering op een goudfilter.

Neutron activation analysis (N.A.A.) (33).

N.A.A. is een techniek die steeds vaker gebruikt wordt voor de bepaling van selenium en vele andere metalen. Alle metalen die bepaald kunnen worden staan in bijgevoegd periodieksysteem aangekruist.

N.A.A. is een niet destructieve methode om vele metalen te kunnen bepalen, gebaseerd op een gecomputeriseerde analyse van het gammaspectrum, gemeten met een Ge-(of Li)detector, in korte tijd.
De monsters worden bestraald in een thermische neutronenflux van $10^{13}$ n/cm$^2$s. Daarna worden de diverse te bepalen metalen gescheiden (TJIOE (33) automatisch) en geteld wordt de isotopenstraling na een bepaalde tijd via het $\gamma$-spectrum. De straling neemt namelijk af met een bepaalde halveringstijd die bekend moet zijn en gemeten wordt bij een bepaalde frequentie uit het $\gamma$-spectrum dat karakteristiek is voor de isotoop van het te bepalen element.
Een nadeel van deze methode is dat elk metaal afzonderlijk gescheiden moet worden van alle andere metalen. De gevoeligheid is echter groter dan bij de andere methoden.

De fluorometrische methode werd toegepast door:
LUTEN (20), SMITH (31), MACKAY (21), RUITER (30), OLSMAN (24), OLSON (25), HOFFMAN (12), MAHER (23), FRIEDMAN (9), GANTHER (8).

De A.A.S. methoden door:
FREEMAN (7), GLOVER (10), EGAAS (5), RASTOGI (29), OLSMAN (24).

De N.A.A. techniek door:
KOEMAN (16, 17), LEONZIO (18), TJIOE (33).

Gaschromatografie door: CAPPON (1, 2).

De fluorometrische methode wordt het meest toegepast en is in de literatuur het meest terug te vinden. Gekozen is ook daarom voor de fluorometrische methode.

IV KWIK.

In zijn natuurlijke vorm komt kwik hoofdzakelijk voor als metallisch kwik ($Hg^o$) en als bestanddeel van mineralen zoals de rode sulfideverbinding cinnaber (HgS). Door snelle verdamping en verspreiding is kwik vrijwel altijd in zeer kleine hoeveelheden aanwezig in het milieu. In alle organismen wordt het dan ook aangetroffen, zij het meestal in zeer lage concentraties. Kwik is dus eigenlijk geen lichaamsvreemde stof, maar er zijn nog geen fysiologische processen bekend waarbij kwik nodig is (19).

De toevoer van kwik aan het milieu gebeurt door:

1. natuurlijke weg. Door vulkanen, geisers, erosie, komen jaarlijks duizenden tonnen aan het oppervlak. Er is dus altijd een natuurlijke hoeveelheid kwik in het milieu (19).
2. afvalprodukt industrie. Bijvoorbeeld bij de elektrolytische bereiding van chloor; aceetaldehyde bij plasticfabricage; bij de verwerking van hout in de papierindustrie, etc. (19, 25).
3. verbranding fossiele produkten. Hierdoor komt 90 % van het kwik in de atmosfeer terecht (26).
4. verbranding huisvuil. Zoals batterijen, TL-buizen, thermometers, en dergelijke.
5. illegale stortplaatsen van zware metalen. Hiervan komt uiteindelijk zo'n 70 % in het water terecht (19).
6. bestrijdingsmiddelen en ontsmettingsmiddelen, bijvoorbeeld in de bloembollen- en pootaardappelenteelt (26).

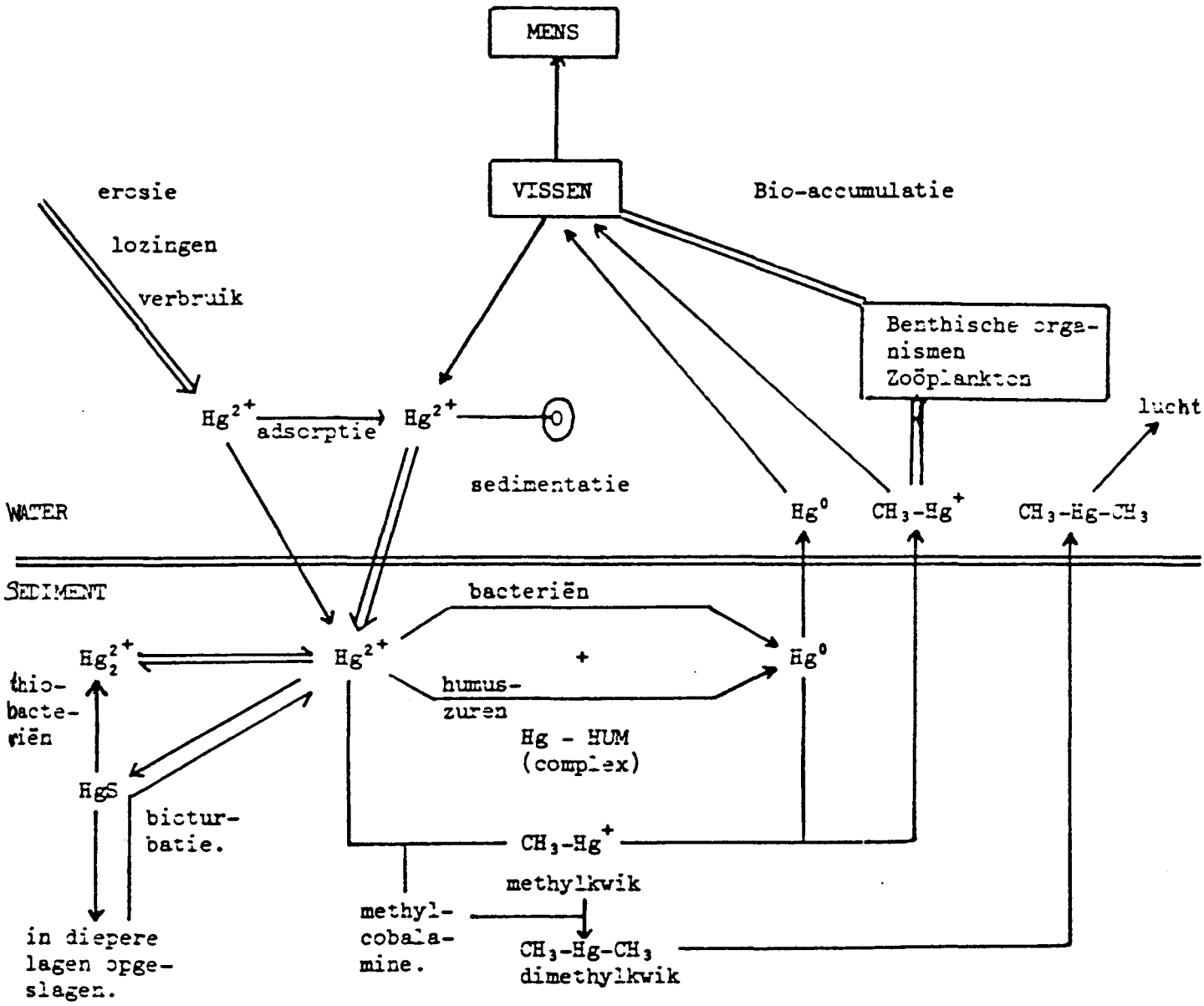
Na lozing van kwik zal het zich niet snel verspreiden en plaatselijk in verhoogde concentraties aanwezig blijven in het bodemsediment. Hierdoor treedt een nalevering op van Hg in het water uit de bodem. Daarom zal in waterorganismen die veel water over hun kieuwen krijgen, het Hg zich opstapelen (= accumulatie). De vergiftiging die optreedt is overigens niet alleen afhankelijk van de concentratie en tijd van blootstelling maar vooral van de chemische vorm van kwik en de mate, waarin kwik door seleen en/of metallothioneïne gebonden wordt (19, 26).

De giftigheid van kwik:

Metallisch kwik kan niet via het darmkanaal in het lichaam worden opgenomen. Echter de damp wel via de longen en bloed.
Anorganische en organische kwikverbindingen worden wel goed opgenomen. Methylkwik is het meest giftig van deze verbindingen.
Vooral het zenuwstelsel en de hersenen zijn gevoelig voor kwik met als gevolg: misselijkheid, blindheid, doofheid, algehele verlamming; dit zijn de verschijnselen van de Minamataziekte (19, 24).
Bij chronische vergiftigingen kunnen ook de nieren aangetast worden. Kwik beïnvloedt de doorlaatbaarheid van kalium door de celwanden en heeft een grote affiniteit voor S-H groepen van eiwitten. Ook heeft het gevolgen voor het nageslacht, omdat kwik de placenta kan pas-

SCHEMA: BIOLOGISCHE CYCLUS VAN KWIK Bron (26)

opslag in sediment en mobilisatie.

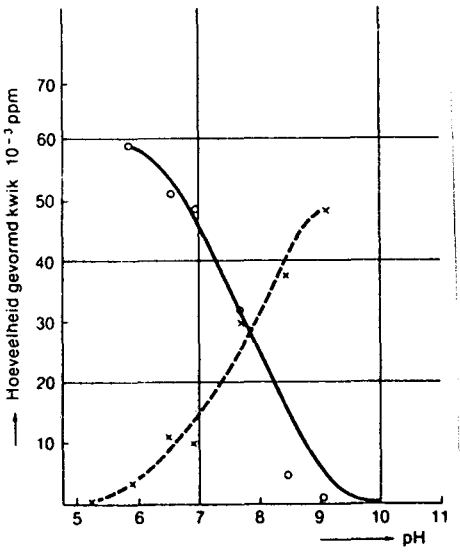


seren en ook de geslachtscellen genetisch kan aantasten (24). In vissen vertonen de eerste beschadigingen zich in de kieuwen waardoor de ademhaling en osmoregulatie verstoord wordt (19).

Kwik kringloop:

Het kwik dat zich in het bodemsediment opgeslagen heeft of wel door natuurlijke ofwel door menselijke oorzaak, wordt door micro-organismen zoals schimmels en bacteriën, omgezet in methylkwik dat via het water in waterorganismen komt (zie schema). In roofvissen kan zo de kwikconcentratie nog hoger oplopen omdat ze aan het eind van een voedselketen staan. Door de opslag in het sediment kan jaren nadat lozingen hebben plaatsgevonden nog steeds een hoge kwikbelasting aanwezig zijn door nalevering vanuit de bodem (19, 26).

De mate waarin methylkwik gevormd wordt in de bodem is ook afhankelijk van de pH. Bij een lage pH zal er meer monomethylkwik gevormd worden. Doordat vele meren en wateren de laatste tijd steeds meer verzuren, komt er ook meer methylkwik in het water, wat weer een hoge belasting geeft.(Zie figuur 2).



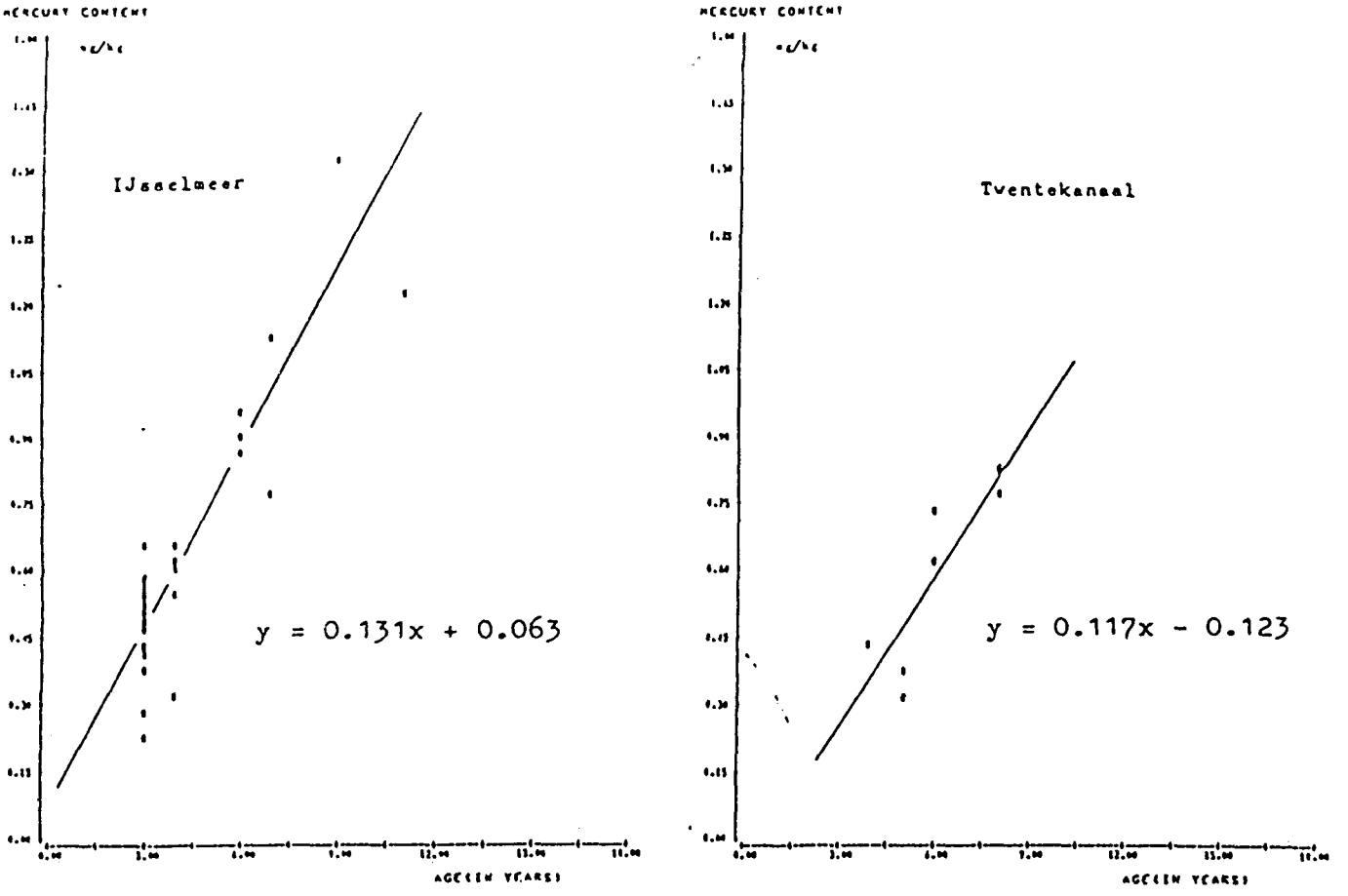

(19)

Boven: Fig. 2 Het uiteindelijke produkt van het methyleringsproces door bacteriën in slib kan zowel monomethylkwik (O) als dimethylkwik (X) zijn.

Accumulatie van kwik:

Vissen en andere zeezoogdieren hebben de neiging om kwik op te slaan in voornamelijk spierweefsel. Vele onderzoekers (26, 27, 28, 34, e.a.) vonden nauwe correlaties tussen de biologische parameters, zoals leeftijd, lengte, gewicht en de Hg gehalten in spierweefsel. Bij toenemende parameters vond men toenemende gehalten. Men past hierop het statistisch model toe van de lineaire regressie en vindt correlatiecoëfficiënten (R) van 0,7 tot 0,9. Het Hg gehalte neemt dus lineair toe met de leeftijd. De hellingshoek van de grafiek van het verband tussen de biologische parameters en de Hg gehalten is evenredig met het gemiddelde van de snelheden van kwikophoping in het spierweefsel. En de hellingshoek is afhankelijk en dus een maat voor de kwikbelasting van het gebied per soort (28). (voorbeeld in figuur 3).

Fig 3 Increase of mercury content with increasing age of pike-perch. (28)




Antagonisme:

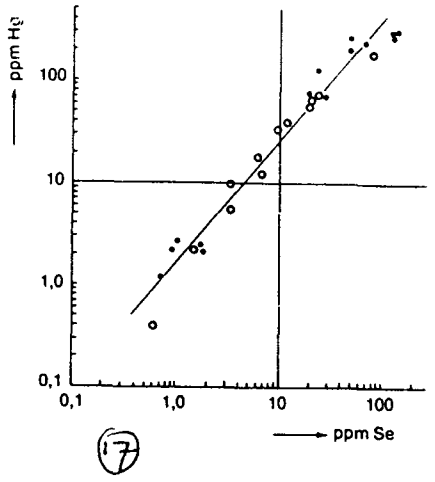
Er is echter een soort bescherming tegen de giftigheid van kwik en methylkwik. In een groot aantal dieren kan er bij een toename van kwik in het milieu door kwik, maar ook door zink en cadmium, de synthese opgewekt worden van een speciaal relatief klein eiwit dat bestaat uit 61 aminozuren, waarin veel thiol (SH)-groepen zitten. Dit eiwit heet metallothioneïne (MT) en de vele thiolgroepen, die immers zware metalen binden, veroorzaken de effectieve ontgiftigende werking van M.T. (19) (zie figuur 4).

(19)

Figuur 4

De aminozuurvolgorde van een metallothioneïne uit de lever van de mens. Aan het grote aantal cysteïnes dankt het eiwit zijn kwikbindende werking.

Verder heeft ook selenium dus een beschermende werking tegen de giftigheid van kwik. Waarschijnlijk door de vorming van een complex (zeezoogdieren 1 : 1 complex, figuur 5), dat minder giftig is dan het metaal in vrije vorm of als methylkwik (24).




Rechts: Fig. 5. Kwik en selenium komen in de lever van verschillende zeezoogdieren in gelijke hoeveelheden voor. (o: dolfijnen en bruinvissen; •: zeehonden). (Uit: J. H. Koeman e.a., Nature, 245 (1973), pag. 385).

Enkele cijfers over kwik en normen:

In de Minamata baai (Japan) deed zich in de jaren 1950 - 1960 een grote kwikvergiftiging door afvallozing voor. Men vond concentraties tot 50 mg/kg in vis. Sindsdien is de belangstelling voor kwik en z'n giftigheid sterk toegenomen. In Zweden vond men gehalten van 3,1 mg/kg in schol in verontreinigde gebieden. In niet verontreinigde gebieden vindt men 0,1 - 0,2 mg/kg in vis. In Nederland werden gehalten gevonden van 0,05 - 1,8 mg/kg in zoetwatervissen. In verscheidene landen is de norm op 1 mg/kg gesteld voor vis in Canada en Japan echter 0,5 ppm (19, 24, 27). Die norm is gebaseerd op de Hg ionen in het bloed van Minamata-patiënten, waarbij geen toxische effecten waarneembaar waren: 200 µg/l. Dit getal werd nog eens gedeeld door een veiligheidsfactor van 8 en hieruit berekende men een "aanvaardbare" dagelijkse dosis kwik en herleidde dit tot de maximale concentratie in vissen (19).

## V KWIK EN SELENIUM.

Inleiding:

De belangstelling voor Se vloeit voort uit het feit dat in vissen hoge kwikgehalten gemeten werden. Er werd een limiet van 0,5 - 1 ppm (8, 9) gesteld door de F.D.A. in Amerika. Hierdoor werd de vangst voor consumptie verboden van verschillende zeevissen zoals zwaardvis& tonijn die vaak deze limiet overschreden. Deze vissen kwamen echter voor in niet verontreinigde gebieden, terwijl ze wel veel kwik accumuleerden. Er is echter aangetoond dat de giftigheid van kwik en methylkwik als giftigste vorm, verlaagd kan worden door selenium (8, 9, 15, 29, en andere). GANTHER et al (9) en FRIEDMAN et al (8) melden zelfs dat respectievelijk tonijn als voedsel voor kwartels en zwaardvis als voedsel voor ratten beschermend werkt tegen de giftigheid van methylkwik. Dit kwam door de hoge seleengehalten in deze vissen, terwijl zelfs ook de kwikgehalten in deze vissen hoog waren (1 ppm Hg en Se). Door dit antagonisch effect is er veel onderzoek gedaan naar relaties tussen Hg en Se gehalten in

vissen (7, 18, 20, 21), zeezoogdieren en vogels (16, 17, 31). KOEMAN (16, 17) vond een nauwe correlatie in dolfijnen en zeehonden. Hg en Se kwamen in een 1 : 1 verhouding voor in de levers van deze dieren.

Antagonisme:

In 1967 werd het effect van antagonisme door Se tegen kwikintoxicaties voor het eerst ontdekt in ratten en later ook bevestigd in Japanse kwartels (24). Ook omgekeerd bleek kwik een antagonistisch karakter te hebben tegen Se-intoxicaties. Vissen bleken echter veel kwik te accumuleren uit het water en voedsel. Ook in zwaardvis en tonijn kwamen hoge kwikgehalten voor (> limiet 0,5 ppm FDA); (zelfs opgezette exemplaren van honderd jaar oud uit musea (24)). Aangezien deze vissen geen verschijnselen van kwikvergiftigingen vertoonden, werd gedacht aan een antagonist en dit bleek seleen te zijn (8, 9).

Verscheidene auteurs vonden dat Se in zwaardvis als voedsel voor ratten (8), Se in tonijn als voedsel voor kwartels (9), Se als seleniet toegevoegd aan kwartels (15) en Se toegevoegd aan ratten (29), beschermende effecten had tegen kwikintoxicaties. De dieren die Se en Hg toegediend kregen, vertoonden minder en minder snel gebreken en sterfte door Hg vergiftiging dan de dieren die alleen Se of Hg kregen.
In algen belemmerden kwik en seleen afzonderlijk de groei, maar tesamen toegediend minder (11). Voor oesters en eitjes van karpers echter was de combinatie Hg/Se giftiger dan afzonderlijke elementen (13). Er werd kennelijk een complex gevormd dat de eitjes van karpers belette uit te komen door te reageren met S-H groepen in het buitenste membraan.

Verbanden van Hg en Se:

Vanwege het antagonistisch effect van Se op de giftigheid van Hg worden ook de Se-gehalten naast de Hg-gehalten bepaald en een verband gezocht tussen deze twee. Aangezien vissen kwik accumuleren en dit opslaan in de weefsels worden er nauwe correlaties gevonden tussen de Hg-gehalten en biologische parameters zoals lengte, leeftijd en gewicht. Daarom worden ook verbanden gezocht tussen Se en de biologische parameters en Hg-gehalte.

Lineaire verbanden tussen het Hg-gehalte en de parameters zijn al vaak gevonden (8, 26, 27, 28, 34), omdat de met de leeftijd stijgende gehalten een gevolg zijn van de accumulatie van Hg in vissen en andere dieren. LEONZIO (18) vond echter een lineair verband tussen de som van het Hg- en Se-gehalte (molair) en de leeftijd van vis (striped mullet) uit de Middellandse Zee. Hij vond dat een laag Hg-gehalte gepaard ging aan een hoog Se-gehalte en vice versa en onderzocht daarna de lineairiteit tussen Se + Hg en de leeftijd. In zwaardvis uit de N.W. Atlantische Oceaan werd ook een nauwe correlatie gevonden tussen de leeftijd en het kwikgehalte en ook tussen de leeftijd en de som van het kwik- en seleengehalte (7). Tussen het Hg- en Se-gehalte wordt een parabolisch verband gevonden (figuur 6). Ook in de levers van baars wordt iets dergelijks waargenomen (20). Ook MACKAY (21) vond in zwarte marlijn (roofzeevis) uit niet verontreinigde Australische wateren hoge Hg- en Se-gehalten. Hij vond een nauwe correlatie tussen Hg- en Se-gehalten en tussen Hg- en Se-gehalten en de lengte van de vis. In het algemeen wordt in zoetwatervis 2 tot 3 maal meer Hg gevonden dan Se en in zeevis 2 maal meer Se (8). KOEMAN vond een zeer nauwe 1 : 1 verhouding (16, 17) tussen Hg- en Se-gehalten in zeezoogdieren zoals dolfijnen, bruinvissen en zeehonden. Er werden gehalten gevonden die opliepen tot 300 ppm kwik. Met de leeftijd van de dieren steeg het Hg- en Se-gehalte in de levers en hersenen, eerst snel en dan langzaam (parabolisch). In vissen wordt geen 1 : 1 verband gevon-

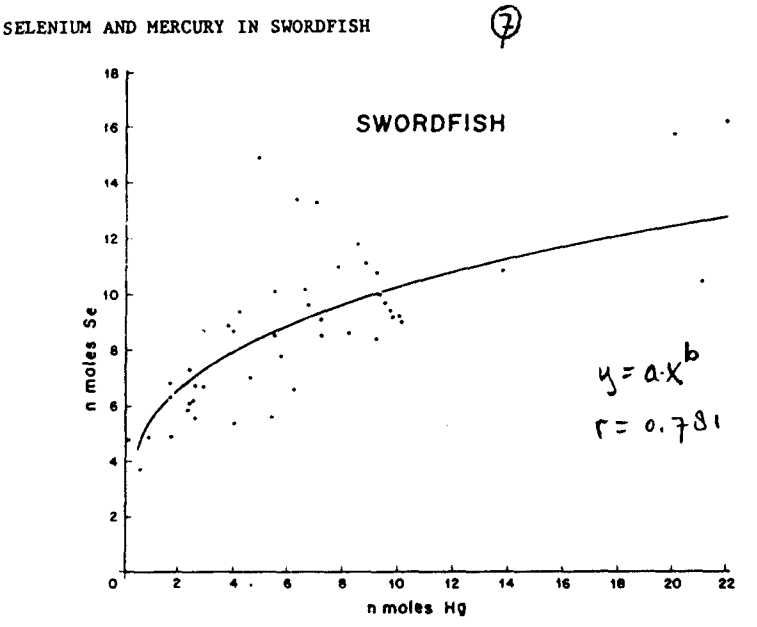



Figure 6 The molar relationship of selenium and mercury in swordfish.

den voor de absolute gehalten van Hg en Se, maar wel in de toename van Hg- en Se-concentraties in tonijn (9, 16).

Mechanisme:

Over het mechanisme van de ontgiftiging van Hg door Se is nog weinig bekend. Uit de verbanden tussen Hg en Se worden enige conclusies getrokken. LEONZIO (18) concludeerde uit z'n resultaten dat de betreffende vis een aantal Se receptoren (bijvoorbeeld in de vorm van zwavel) bezit dat stijgt met de leeftijd. Hg kan deze receptoren bezetten en Se verdringen, afhankelijk van de Hg-concentratie. LEONZIO geeft echter geen resultaten in tabellen; alleen lijnen in grafieken en correlatie-coëfficiënten die vrij laag zijn (0,3 - 0,8) wat duidt op een slecht lineair verband in tegenstelling tot verbanden tussen Hg en de lengte van de vis (0,7 - 0,9, (28)).
KOEMAN (16) vond in zeezoogdieren een 1 : 1 verhouding van Se en Hg. In vissen die de zeezoogdieren consumeren echter, is veel meer Se dan Hg aanwezig. In de dieren zelf wordt dus de 1 : 1 verhouding gecreëerd. In de vissen is ook veel meer kwik in de vorm van methylkwik (1) aanwezig, terwijl er in de zeezoogdieren echter weinig methylkwik is. Het kwik wordt dus op een andere manier gebonden. Doordat er evenveel Hg als Se aanwezig is wordt er waarschijnlijk een complex gevormd waarin de atomaire verhouding van Hg en Se 1 : 1 is en dat in het bindweefsel gebonden is aan eiwitten via zwavelatomen.

In zeezoogdieren lopen de Hg- en Se-concentraties op tot 300 ppm en in vissen slechts tot 1 - 4 ppm (bijvoorbeeld in zwaardvis (7)). In vissen wordt ook een 1 : 1 verband waargenomen in de toename van de Hg- en Se-concentraties (9) tussen tonijn met een hoog Hg- en laag Hg-gehalte. Dit zou wijzen op een basispeil Se (bijvoorbeeld nodig voor enzymen zoals glutathion peroxidase en vitamine E metabolisme, etc.) en dat Se wordt geaccumuleerd naarmate Hg wordt

geaccumuleerd. Dat Hg en Se in een 1 : 1 complex schijnen gebonden te worden betekent niet dat Se slechts een equivalente hoeveelheid Hg neutraliseert, echter Se werkt al als antagonist indien toegediend in kleinere hoeveelheden dan Hg (9). Kwik zou ook giftiger kunnen zijn door het verstoren van het seleenmetabolisme. Se zou dan een grotere neiging hebben om een Se - Hg complex te vormen dan in bijvoorbeeld enzymen en verbindingen die het vitamine E-metabolisme regelen (24). Bij vitamine E deficiënte ratten is de optimale hoeveelheid seleen aan nauwe grenzen gebonden wat zou kunnen betekenen dat indien de vitamine E voorziening niet goed is, er een grotere gevoeligheid voor zowel een kwik- als seleenbelasting optreedt. Ook als er een seleentekort is in het voedsel zal het organisme gevoeliger zijn voor een zware metalenintoxicatie. Een mogelijk mechanisme voor het antagonistisch karakter wordt gesuggereerd door J.W. COPIUS PEEREBOOM (3): de valenties van mangaan, cadmium en kwik zouden de autoxidatie van dopamine versterken onder de produktie van het toxische superoxyde anion $O_2^-$, of $H_2O_2$ of het hydroxylradicaal $OH^{\cdot}$. Glutathion peroxidase (met Se als onderdeel) breekt $H_2O_2$ af en geeft zo een bescherming tegen de giftigheid van de produkten. Indien er dus een seleentekort is, is het organisme extra gevoelig voor de giftigheid van zware metalen doordat deze de autoxidatie reactie bevorderen en een verlaagde antioxidantactiviteit optreedt door een te lage glutathione peroxidaseactiviteit.

Een ander mechanisme zou kunnen zijn: Hg(II) en $SeO_3^{2-}$ reageren met elkaar na metabolisme en vormen dan complexen die niet zo snel reageren met S-H-groepen als Hg(II) of $SeO_3^{2-}$ alleen (11).
Het gevormde Hg/Se complex schijnt niet giftig te zijn.
Cu/Se en Sd/Se complexen echter zijn nog enigszins toxisch (24).
Ook in mensen werd een 1 : 1 verhouding tussen Hg en Se gevonden bij de bevolking van een mijnstreek (24) waar een verhoogde kwikopname optrad. De veronderstelling was dan ook dat de co-accumulatie van seleen en kwik een proces van natuurlijke zelfbescherming is.

## VI CONCLUSIES.

Er is een opslag van kwik in de weefsels en andere organen in vissen en zeezoogdieren (maar ook in mensen) door accumulatie. Door een ingebouwde veiligheidsfactor in de vorm van seleenaccumulatie wordt kwik ontgiftigd door de vorming van een atomair 1 : 1 Hg - Se complex dat niet of minder giftig is dan de elementen afzonderlijk (16, 24).

Receptoren voor Se stijgend met de leeftijd en verdringing door Hg is niet zo aannemelijk. gezien de slechte correlatiecoëfficiënten gevonden door LEONZIO (18) en andere waarnemingen zoals betere lineaire verbanden tussen Hg-gehalten en de lengte van de vis, etc.

Er is al een basispeil Se aanwezig (9). Se is nodig in de stofwisseling. Se wordt geaccumuleerd naarmate Hg geaccumuleerd wordt. Ook zal de bescherming van glutathion peroxidase door het afbreken van giftig $H_2O_2$ een rol spelen naast de complexering. Het $H_2O_2$ is ontstaan uit de autoxidatie van dopamine, die versterkt wordt door Hg (3). Indien er geen Se wordt geaccumuleerd, dus in het geval van een Se-tekort in het voedsel, wordt er geen Hg gecomplexeerd. Dan zal Hg Se wegnemen uit enzymen en andere verbindingen zodat het Se-metabolisme verstoord wordt en glutathion peroxidase geen giftige

produkten zoals giftige oxideradicalen en -ionen gevormd onder invloed van zware metalen waaronder kwik, kan afbreken.

## VII WERKZAAMHEDEN.

| | Maand: van: | tot en met: |
|---|---|---|
| Literatuurstudie | september | - oktober 1983 |
| Literatuurverslag schrijven | oktober | - december 1983 |
| Opzetten en onderzoek naar analysemethode selenium | november | - december 1983 |
| Bepaling seleen in zoetwatervis (snoekbaars) | december 1983 | - februari 1984 |
| Bepaling seleen in zeevis (bot) | februari | - april 1984 |
| Bepaling kwik in zeevis | maart | - mei 1984 |
| Eindverslag schrijven | maart | - mei 1984 |
| Voordracht | | 14 mei 1984 |
| Verdediging praktisch werk | | 2 juni 1984 |

## VIII LITERATUURLIJST.

(alfabetisch naar schrijvers).


1. Cappon, C.J. & J.C. Crispin Smith - Mercury and Selenium Content and Chemical Form in Fish Muscle. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10, (1981) 305-319.
2. Cappon, C.J. & J.C. Crispin Smith - Chemical form and distribution of Mercury and Selenium in edible seafood. Journal of Analytical Toxicology, 6, 10-21 (1982).
3. Copius Peereboom, J.W. - Spoorelementen, neurotoxiciteit en gestoord gedrag. Chemische Magazine, augustus 1983, No. 31, 323-324.
4. Diplock, A.T. - Metabolic aspects of Selenium action and toxicity. Critical Reviews in Toxicology, 4 (1976), No. 3, 271-328.
5. Egaas, E. & K. Julshamn - A method for the determination of Selenium and Mercury in fish products using the same digestion procedure. At. Absorpt. Newslett., 17 (1978), 135-138.
6. Ellen, G., G. v.d. Bosch-Tibbesma & F.F. Douma - Zware metalen rapport Nr. 8, Keuringsdienst van Waren, Friesland.
7. Freeman, H.C., G. Shum & J.F. Uthe - The Selenium content in swordfish in relation to total mercury content. Journal of Environmental Science & Health, A 13 (3), 235-240 (1978).
8. Friedman, M.A., L.R. Eaton & W.H. Carter - Protective effects of freeze dried swordfish on methylmercury chloride toxicity in rats. Bull. of Env. Contamn. & Toxic. 007-4861/78/0019-0436.

9. Ganther, H.E. & M.L. Sunde - Effect of tuna fish and selenium on the toxicity of methylmercury. Volume 39 (1974). Journal of food science-1.

10. Glover, J.W. - Concentrations of Arsenic, Selenium and ten heavy metals in school shark and gummy shark from South-eastern Australian waters. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 1979, 30, 505-510.

11. Gotsis, O. - Combined effects of Selenium/Mercury and Selenium/Copper on the cell population of the Alga (*Dunaliella minuta*). Marine Biology, 71, 217-222 (1982).

12. Hoffman et al. - Precise Fluorometric Microdetermination of Selenium in agricultural Materials. J. Assoc. of Anal. Chem., 51 (1968), 1039-1042.

13. Huckabee, J.W. & N.A. Griffith - Toxicity of Mercury and Selenium to the eggs of carp. Trans. Amer. Fish. Soc. (1974), No. 4.

14. Iwata, H., et al. - Degredation of methylmercury by Selenium. Life Sciences, Vol. 31 (1982), 859-866.

15. Kling, L.J. & J.H. Soares Jr. - Mercury metabolism in Japanese Quail II. Poultry Sci., 57 (1978), 1286-1292.

16. Koeman, J.H., et al. - Mercury and Selenium in marine mammals and birds. The Science of the total environment, 3 (1975), 279-287.

17. Koeman, J.H., et al. - Mercury-Selenium correlations in marine mammals. Nature, Vol. 245, October 19 (1973).

18. Leonzio, C., et al. - Complementary accumulation of Selenium and Mercury in fish muscle. Science of the total environment, 24 (1982), 249-254.

19. Lock, R.A.C. - Kwik in het milieu. Natuur en techniek, 49, 2 (1981), 142-159.

20. Luten, J.B., et al. - Mercury and Selenium in marine- and freshwater fish. J. food Sci., 45, 3 (1980), 416-419.

21. Mackay, N., et al. - Selenium and heavy metals in black Marlin. Marine Pollution Bulletin (Volume 4), 4 (1975), 57-61.

22. Magos, L. & M. Webb - The interactions of Selenium with Cadmium and Mercury. Critical Reviews in Toxicology, blz. 1-42. November 1980.

23. Maher, W.A. - Selenium in marine organisms from Se. Vincent's Gulf, South Australia. Marine Pollution Bulletin (Volume 14), 1, 35-36 (1983).

24. Olsman, W.J. & A. Ruiter - Toxische elementen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong, I, II, III. Voedingsmiddelentechnologie, 9 nov. (1977/78), nr. 45 (10), 10 (11), 27 (11).

25. Olson, O.E. - Fluorometric Analysis of Selenium in plants. J. Assoc. of Anal. Chem., 52 (1969), 627-634.

26. Pieters, H. & N. Wassenaar - Kwikgehalten in snoek en snoekbaars uit het Oude Veer (N. Holland). RIVO-rapport CA 81-06 (1981).

27. Pieters, H., N. Wassenaar & J. Geerdes - Totaal kwikbepaling en een kwikonderzoek in rode aal in Nederland. RIVO-rapport CA 81-03 (1981).

28. Pieters, H., J. Speur & N. Wassenaar - Total Mercury content in fish from Dutch waters in relation to biological parameters and pollution level. Mar. Env. Qual. Committee, C.M. 1983/E: 19.

29. Rastogi, S.C., J. Clausen & K.C. Sricastava - Selenium and Lead: Mutual detoxifying effects in rats. Toxicology, 6 (1976), 377-388.

30. Ruiter, A., et al. - Bepaling zware metalen in vismeel. TNO-rapport Nr. 0-136 (1975).

31. Smith, T.G. & F.A.J. Armstrong - Mercury and Selenium in ringed and bearded seal tissues from Arctic Canada. Inl. arct. Inst. North America, 31-478, blz. 75-84.

32. Suddendorf, R.F. - Interference by Selenium or Tellurium in the determination of Mercury by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. Anal. Chem. (1981), 53, 2234-2236.

33. Tjioe, P.S., de Goeij & Houtman - Automated chemical seperations in routine activation analysis. J. of radioanalytical chem., Vol. 16 (1973), 153-164.

34. Walker, T.J., et al. - Effects of length, locality and tissue type on Mercury and Cadmium content of the commercial Scallop from Port Phillip Bay, Victoria. Aust. J. Mar. Freshwater Res. (1982), 33, 547-552.