

Study and Discussion on the Determination Method of Selenium Content in Selenium Rich Agricultural Products

Jianhua Gong¹, Xuexue Miao^{2*}, Honglan Cheng³, Xiangui Chen⁴, Haoru Gong², Jianhong Deng⁵, Lu Liu⁴, Long Chen⁶, Yu Zhang³

¹Zhuzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhuzhou Hunan

²Hunan Rice Research Institute, Changsha Hunan

³Hunan Yuntian Testing Technology Co., Ltd., Zhuzhou Hunan

⁴Hunan Jialan Testing Technology Co., Ltd., Xiangtan Hunan

⁵Zhuzhou Xiangzhijou Agricultural Technology Development Co., Ltd., Zhuzhou Hunan

⁶Hunan Taihua Technology Testing Co., Ltd., Zhuzhou Hunan

Email: gjh1267@126.com, miaoxuexue410@163.com

Received: Jul. 24th, 2020; accepted: Aug. 7th, 2020; published: Aug. 14th, 2020

Abstract

China is one of the most serious selenium deficient countries in the world, and about 700 million people are in the state of selenium deficiency. Therefore, the research and application of exogenous selenium technology to improve the selenium content of agricultural products, especially the main grain, is particularly important for non-selenium rich areas. The determination of selenium content in agricultural products is an important link in the research and development of selenium rich technology. At present, hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) is the preferred detection method in China (GB 5009.93-2017). In this study, the effects of three wet digestion methods (A, B, C) widely used in atomic fluorescence spectrometry (AFS) on the detection results of selenium content in rice were analyzed and discussed. The results showed that: 1) The coefficient of variation (CV) of rice selenium content detected by Atomic Fluorescence Spectrometry with different wet digestion methods was the smallest, indicating that the method was stable on the whole. 2) Taking the total average value of selenium content of rice by three wet digestion methods as reference, we preliminarily believe that the process of "nitric acid + perchloric acid system, 80°C (60min)-heating to 100°C (60 min)-heating to 130°C (60 min), and 190°C acid driving temperature" (treatment C) has high accuracy. 3) There were significant differences ($P < 0.05$, the same below) or very significant ($P < 0.01$, the same below) between the three wet digestion methods in the same testing institution, which indicated that different wet digestion methods had an important impact on the detection results of atomic fluorescence spectrometry. 4) For the same wet digestion method, there are significant differences in the test results of three testing institutions, which indicate that the accuracy of selenium detection is affected by some operation details besides the influencing factors of wet digestion method. In addition to the possible differences of detection equipment, the more important thing is the accuracy of operation. This situation should be highly valued by the testing industry. It is suggested that the operation process should be further refined in the preparation (Revision) of testing standards.

*通讯作者。

Keywords

Selenium Rich Agricultural Products, Selenium Content, Atomic Fluorescence Spectrometry, Wet Digestion Method

富硒农产品硒含量检测方法的研究与探讨

龚建华¹, 苗雪雪^{2*}, 成红兰³, 陈先桂⁴, 龚浩如², 邓建红⁵, 刘璐⁴, 陈龙⁶, 张宇³

¹株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲

²湖南省水稻研究所, 湖南 长沙

³湖南省云天检测技术有限公司, 湖南 株洲

⁴湖南佳蓝检测技术有限公司, 湖南 湘潭

⁵株洲香之优农业科技发展有限公司, 湖南 株洲

⁶湖南泰华科技检测有限公司, 湖南 株洲

Email: gjh1267@126.com, miaoxuexue410@163.com

收稿日期: 2020年7月24日; 录用日期: 2020年8月7日; 发布日期: 2020年8月14日

摘要

中国是世界上缺硒最严重的国家之一, 约7亿人处在硒营养不足状态。因此, 研究和应用外源补硒技术, 提高农产品尤其是主粮的硒含量, 对非富硒地区而言显得尤为重要。农产品硒含量的测定是富硒技术研发的重要环节, 目前我国以氢化物-原子荧光光谱法为首选检测方法(GB5009.93-2017), 本研究以富硒稻米为对象, 分析和探讨了原子荧光光谱法中广泛应用的三种湿法消解方法(A、B、C)对稻米硒含量检测结果的影响。研究表明: 1) 原子荧光光谱法采用不同湿法消解方法检测的稻米硒含量的变异系数(CV), 处理B的CV平均数最小, 整体上说明该方法的稳定性较好。2) 以三种湿法消解方法的稻米硒含量总平均值0.926 mg/kg为参照, 我们初步认为, 以“硝酸+高氯酸系、80℃(60 min)-升温至100℃(60 min)-升温至130℃(60 min)消解升温流程、190℃赶酸温度”(处理C), 具有较高的准确性。3) 同一家检测机构对三种湿法消解方法的检测结果存在显著($P < 0.05$, 下同)或极显著差异($P < 0.01$, 下同), 说明不同的湿法消解方法对原子荧光光谱法的检测结果具有重要影响。4) 同一种湿法消解方法三家检测机构的检测结果均存在极显著差异, 说明硒检测的准确性除了湿法消解方法影响因素外, 还存在某些操作细节因素的影响, 除了可能存在的检测设备差异外, 更重要的是与操作的精准性有关, 这一情况应引起检测行业的高度重视, 建议在检测标准制(修)定中应进一步细化操作流程。

关键词

富硒农产品, 硒含量, 原子荧光光谱法, 湿法消解方法

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

硒于 1973 年被确定为人体必需的微量元素[1], 具有提高人体免疫力、防止脂质过氧化、消除重金属积累危害、帮助机体抵御病毒感染等生理生化功能[2]-[17]。长期食用低于 0.1 mg/kg 的含硒食物会导致人体硒缺乏反应症, 长期食用硒高于 1 mg/kg 的食物则可能会引起硒中毒[2]。根据中国营养学会所作的营养调查报告表明, 我国大部分地区属于缺硒地区, 仅靠天然食物中的硒不足以满足人体的正常需要[18]。因此, 近年来各地加大了富硒农产品的研发力度。根据 2018 年 4 月 1 日实施的中华人民共和国卫生行业标准 WS/578.3-2017《中国居民膳食营养素参考摄入量第 3 部分: 微量元素》, 成人日硒营养摄入量为 $400 \mu\text{g}/\text{d} > p \geq 60 \mu\text{g}/\text{d}$ 。据此, 阳静等[19]以膳食硒含量、日膳食量和人体血硒含量为特征指标, 提出了“配方补硒”的重要理念与方法, 探讨了发展超高含量富硒农产品的重要性, 进一步拓展了对富硒农产品的认识与应用空间, 为科学补硒提供了重要参考。

硒测定方法的研究始于 20 世纪 90 年代, 目前我国食品硒含量测定主要采用 GB5009.93-2017 (食品安全国家标准 - 食品中硒的测定)标准, 该标准以氢化物 - 原子荧光光谱法为第一法、荧光分光光度法为第二法、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)为第三法。由于氢化物 - 原子荧光光谱法操作简便, 且灵敏度高, 被认为是国标测硒中的首选方法。氢化物 - 原子荧光光谱法的关键环节是湿法消解, 而国家标准并未对消解升温程序和赶酸温度等操作流程作出详细规定。调查发现, 在实际检测工作中各检测机构采用的湿法消解方法存在较大差异, 而这种差异可能会影响到检测结果, 但目前尚未见相关研究报道。本研究旨在通过采用几种主流的湿法消解方法, 由多家检测机构对同一富硒稻米样品同时进行检测, 并对检测结果进行统计分析, 以验证不同湿法消解方法对稻米食品硒含量检测结果的影响, 为富硒农产品技术研发与生产应用的精准检测服务提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

供试样品: 2019 年稻鸭共作模式生产的富硒稻米(精米), 由株洲香之优农业科技发展有限责任公司提供。

检测机构: 三家专业检测机构参与本研究, 分别编号为 J1 公司、J2 公司、J3 公司。

取样方法: 由专家组成员共同现场取样与分样, 每种湿法消解方法均设置 5 个平行, 由上述专业检测机构独立完成检测。

2.2. 试验设计

采用 GB5009.93-2017 氢化物 - 原子荧光光谱法, 设计三种湿法消解处理方式, 处理 A: 所用酸系“硝酸+双氧水”, 消解升温程序: 110°C (150 min)升温至 160°C (120 min), 赶酸温度: 160°C ; 处理 B: 所用酸系“硝酸+高氯酸”, 消解升温程序: 100°C (90 min)-升温至 120°C (60 min), 赶酸温度: 160°C ; 处理 C: 所用酸系“硝酸+高氯酸”, 消解升温程序: 80°C (60 min)-升温至 100°C (60 min)-升温至 130°C (60 min), 赶酸温度: 190°C 。以电感耦合等离子质谱法(ICP-MS)为对照(处理 D)。尽管在 GB5009.93-2017 氢化物 - 原子荧光光谱法的湿法消解处理中规定使用铁氰化钾, 但在实践中发现使用铁氰化钾存在一定的弊端, 因此本试验中专家组一致确认不使用铁氰化钾。

2.3. 数据处理

试验数据采用 Excel 2003 进行数据整理和方差分析, 采用 Excel 的 TDIST 函数进行多重比较(LSD), 采用变异系数(CV)分析检测方法的稳定性。

3. 结果与分析

3.1. 检测数据的有效性分析

由表 1 可知, 各检测机构采用不同检测方法测得的稻米硒含量, 样本标准差在 0.012~0.062, 且任一两次独立测定结果的绝对差值与其平均数的比值为 3.4%~15.6%, 满足在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值 20%的要求, 说明重复性较好, 检测结果有效。

Table 1. Test results and validity analysis table of selenium content in rice (mg/kg)

表 1. 稻米硒含量检测结果与有效性分析表(mg/kg)

检测机构	检测方法	米样-1	米样-2	米样-3	米样-4	米样-5	平均值	标准差	最大差值: 平均数(%)
J1 公司	A	0.825	0.803	0.895	0.841	0.918	0.856	0.048	13.43
	B	0.891	0.922	0.915	0.914	0.918	0.912	0.012	3.40
	C	0.871	0.943	0.928	1.015	0.944	0.940	0.051	15.32
	D	1.080	1.190	1.090	1.020	1.070	1.090	0.062	15.60
J2 公司	A	0.986	1.004	1.025	0.991	1.001	1.001	0.015	3.89
	B	0.950	0.945	1.029	0.999	0.968	0.978	0.035	8.59
	C	0.894	0.911	0.862	0.896	0.888	0.890	0.018	5.50
	D	1.028	1.111	1.118	1.057	1.082	1.079	0.038	8.34
J3 公司	A	0.801	0.876	0.851	0.908	0.915	0.870	0.046	13.10
	B	0.923	0.932	0.987	0.943	0.951	0.947	0.024	6.76
	C	0.930	0.904	0.947	0.957	0.959	0.930	0.023	5.86
	D	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2. 不同检测机构的数据分析

由表 2、表 3、表 4 可知, 三家检测机构的检测结果在不同处理间均存在极显著差异($P < 0.01$, 下同)。多重比较表明, J1 公司处理 D (ICP-MS 方法)的硒含量最高, 极显著高于其它处理; 处理 B 和 C 均极显著高于处理 A, 但 B、C 间无显著差异。J2 公司处理 D (ICP-MS 方法)的硒含量最高, 极显著高于其它处理; 处理 A 显著高于处理 B ($P < 0.05$, 下同)、极显著高于处理 C; 处理 B 极显著高于 C 处理。J3 公司处理 B 的硒含量最高, 极显著高于处理 A, 但处理 C 间无显著差异; 处理 C 极显著高于处理 A。

Table 2. Analysis of variance of test results of rice selenium content by J1 company

表 2. 稻米硒含量 J1 公司检测结果方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.150	3	0.050	25.0**
组内	0.036	16	0.002	
总	0.185	19		

注: **表示方差分析达极显著水平($P < 0.01$), *表示方差分析达显著水平($P < 0.05$), 下同。

Table 3. Variance analysis of test results of rice selenium content J2 company**表 3.** 稻米硒含量 J2 公司检测结果方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.091	3	0.030	37.7**
组内	0.013	16	0.001	
总	0.104	19		

Table 4. Variance analysis of test results of rice selenium content J3 company**表 4.** 稻米硒含量 J3 公司检测结果方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.018	2	0.009	9.0**
组内	0.013	12	0.001	
总	0.031	14		

3.3. 不同检测方法的数据分析

采用湿法消解方法 A (处理 A), 不同检测机构测得的稻米硒含量存在极显著差异(表 5), 其中: J2 公司 > J3 公司 > J1 公司, J2 公司检测值极显著高于 J1 公司和 J3 公司, 而 J1 公司和 J3 公司之间差异不显著。采用湿法消解方法 B, 不同检测机构测得的稻米硒含量存在显著差异(表 6), 其中: J2 公司 > J3 公司 > J1 公司, 且相互之间在 $P = 0.01$ 水平上均有统计学意义。湿法消解方法 C, 不同检测机构测得的稻米硒含量存在显著差异(表 7), 其中: J1 公司 > J3 公司 > J2 公司, J1 公司和 J3 公司检测值极显著高于 J2 公司, 而 J1 公司和 J3 公司之间差异不显著。采用 ICP-MS 方法, 不同检测机构测得的稻米硒含量间无显著差异(表 8), 平均稻米硒含量较原子荧光光谱法的湿法消解方法 A、B、C 分别高 19.27%、14.68%、17.47%, 说明 ICP-MS 方法的检测结果偏高。因此, 在富硒农产品技术研发的检测工作中, 以采用原子荧光光谱法较好。

Table 5. Variance Analysis of rice selenium content in wet digestion method A**表 5.** 湿法消解方法 A 的稻米硒含量方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.064	2	0.032	20.338**
组内	0.019	12	0.002	
总	0.083	14		

Table 6. Variance Analysis of rice selenium content in wet digestion method B**表 6.** 湿法消解方法 B 的稻米硒含量方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.011	2	0.005	5*
组内	0.008	12	0.001	
总	0.019	14		

Table 7. Variance Analysis of rice selenium content in wet digestion method C

表 7. 湿法消解方法 C 的稻米硒含量方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.008	2	0.004	4*
组内	0.014	12	0.001	
总	0.022	14		

Table 8. Variance analysis of selenium content in rice by ICP-MS

表 8. ICP-MS 方法的稻米硒含量方差分析表

变异来源	SS	v	MS	F
组间	0.0003	1	0.0003	0.115
组内	0.021	8	0.003	
总	0.021	9		

A、B、C 三种湿法消解方法的稻米硒含量分别为 0.909 mg/kg、0.946 mg/kg、0.923 mg/kg，总平均值为 0.926 mg/kg。由于上述三种方法均为实际检测中常用的方法，如果以总平均值 0.926 mg/kg 估算为真值，而处理 C 的平均值与之基本相同或最为接近，故此，可以认为湿法消解方法 C 的检测结果更接近真值。

3.4. 检测方法的稳定性分析

原子荧光光谱法采用不同湿法消解方法检测的稻米硒含量的变异系数(CV)，可在一定程度上反映检测方法的稳定性，同时也说明了检测机构对某种方法的熟练或精准控制程度。由表 9 可知，处理 B 的 CV 平均数最小，整体上说明该方法的稳定性较好；C 处理的 CV 值中，J2 公司与 J3 公司基本一致，但 J1 公司检测的 CV 值明显偏高，说明 J1 公司在使用该方法时存在操作细节上的问题；A 处理 CV 值 J2 公司很小，而 J1 公司和 J3 公司基本一致且较大，说明在使用该方法时 J2 公司把握得更精准。

Table 9. Variation coefficient of selenium content in rice samples

表 9. 稻米样本硒含量变异系数分析表

处理	A	B	C	平均
J1 公司	5.65	1.33	5.46	4.15
J2 公司	1.51	3.62	2.01	2.38
J3 公司	5.34	2.60	2.44	3.46
平均	4.17	2.52	3.30	3.33

4. 讨论与结论

在日常硒元素的检测服务中，各检测机构都是执行国家有关检测标准，但在原子荧光光谱法的湿法消解方法上存在一定的差别，如本研究中 A、B、C 三种湿法消解方法分别来自不同检测机构主要的使用方法。本研究表明，不同检测机构采用同一种湿法消解方法对稻米硒含量的检测结果具有显著差异，其中：J2 公司处理方法 A、B 的硒含量值均最高，而处理 C 方法最低；J1 公司处理 A、B 方法的硒含量值

均最低, 而处理 C 方法最高; J3 公司三种处理方法的硒含量值排序均居中。出现这种差异的原因, 除了可能存在的检测设备差异外, 更重要的是与操作的精准性有关。其所以特别强调操作的精准性, 是因为在组织本次联合研究之前, 曾对同一批产品送 4 家检测机构分别进行检测, 其稻米硒含量数据差异非常大(表 10)。表 10 中的检测“机构 4”采用的原子荧光光谱法, 其湿法消解方法与本试验中的处理 C 方法相同, 但检测数据较本试验处理 C 低 73%; 而采用 ICP-MS 方法的三家检测机构的稻米硒结果(同一个样品), “机构 1”较本试验高 27%, “机构 2”和“机构 3”分别较本试验低 27%、19%, 这种差异对于科学研究而言是不可接受的。因此, 在食品硒含量检测中, 进一步细化操作流程至关重要。

Table 10. Test results of selenium content in Rice by four testing institutions

表 10. 四家检测机构对稻米硒含量的检测结果

检测机构	检测方法	硒含量(mg/kg)			平均	较本试验对应方法平均值±%
		米-1	米-2	米-3		
机构 1	ICP-MS	1.4	1.39	1.34	1.38	27
机构 2	ICP-MS	0.736	0.826	0.802	0.79	-27
机构 3	ICP-MS	0.89	0.87	0.88	0.88	-19
机构 4	原子荧光	0.25	0.245	0.245	0.25	-73

通过三种湿法消解方法检测稻米硒含量的对比研究, 我们初步认为, 采用“硝酸 + 高氯酸”酸系、80℃(60 min)-升温至 100℃ (60 min)-升温至 130℃ (60 min)消解升温流程、190℃赶酸温度, 具有较高的准确性。

参考文献

- [1] Zhao, Z.J., *et al.* (2013) Matrix Selenium on Selenium Effect and Quality of Lettuce. *Journal of Shanxi Agricultural Science*, **1**, 57-59.
- [2] Dumont, E., Vanhaecke, F. and Cornelis, R. (2006) Selenium Speciation from Food Source to Metabolites: A Critical Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**, 1304-1323. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>
- [3] Hoffmann, F.W., Hashimoto, A.C., Shafer, L.A., *et al.* (2010) Dietary Selenium Modulates Activation and Differentiation of CD4+ T Cells in Mice through a Mechanism Involving Cellular Free Thiols. *British Journal of Nutrition*, **140**, 1155-1161. <https://doi.org/10.3945/jn.109.120725>
- [4] Hoffmann, P.R. (2007) Mechanisms by Which Selenium Influences Immune Responses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **55**, 289-297. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0036-4>
- [5] Carlson, B.A., Yoo, M.H., Shrimali, R.K., *et al.* (2010) Role of Selenium-Containing Proteins in T-Cell and Macrophage Function. *Proceedings of the Nutrition Society*, **69**, 300-310. <https://doi.org/10.1017/S002966511000176X>
- [6] 林志高. 元素与人体免疫力[C]//中国微量元素科学研究会. 中国微量元素科学研究会第十四届学术研讨会论文集(一). 香港: 香港新闻出版社, 2007: 53-54.
- [7] Arthur, J.R., Mckenzie, R.C. and Beckett, G.J. (2003) Selenium in the Immune System. *The Journal of Nutrition*, **133**, 14578-14598. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1457S>
- [8] Arvilommi, J.R., Mckenzie, R.C. and Beckett, G.J. (1983) Selenium in the Immune System. *Infection and Immunity*, **41**, 185-189. <https://doi.org/10.1128/IAI.41.1.185-189.1983>
- [9] Dunstan, J.A., Brack, L., Hale, J., *et al.* (2007) Supplementation with Vitamins No Effect C, E, Beta-Carotene and Selenium Has on Anti-Oxidant Status and Immune Responses in Allergic Adults: A Randomized Controlled Trial. *Clinical & Experimental Allergy*, **37**, 180-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02657.x>
- [10] 管小琴, 陈显兵. HBV 感染对人体 T 细胞免疫功能影响的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(4): 552-555.
- [11] Wood, S.M., Beckham, C., Yosioka, A., *et al.* (2000) β -Carotene and Selenium Supplementation Enhances Immune

Response in Aged Humans. *Journal of Integrative Medicine*, **2**, 85-92. [https://doi.org/10.1016/S1096-2190\(00\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S1096-2190(00)00009-3)

- [12] 孙恩杰, 徐辉碧. 一种新的含硒酶——磷酸过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 生命的化学, 1991, 11(2): 1-3.
- [13] 赵涛. 微量元素硒与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2004, 21(6): 64-65.
- [14] Steinbrenner, H., Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., *et al.* (2015) Dietary Selenium in Adjuvant Therapy of Viral and Bacterial Infections. *Advances in Nutrition*, **6**, 73-82. <https://doi.org/10.3945/an.114.007575>
- [15] Harthill, M. (2011) Review: Micronutrient Selenium Deficiency Influences Evolution of Some Viral Infectious Diseases. *Biological Trace Element Research*, **143**, 1325-1336. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8977-1>
- [16] Broome, C.S., Mc Ardle, F., Kyle, J.A., *et al.* (2004) An Increase in Selenium Intake Improves Immune Function and Poliovirus Handling in Adults with Marginal Selenium Status. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 154-162. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.154>
- [17] Hori, K., Hatfield, D., Maldarelli, F., *et al.* (1997) Selenium Supplementation Suppresses Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication *in Vitro*. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **13**, 1325-1332. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1325>
- [18] 李以暖, 薛立义. 富硒保健食品硒含量标准的探讨[J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(5): 18.
- [19] 阳静, 龚建华, 欧立军, 邓建红, 杨永红, 邓雅文, 粟文俊. COVID-19 防治与硒营养关系研究与探讨[J]. 农业科学, 2020, 10(5): 263-272.