

PHÂN TÍCH ĐỒNG VỊ BÈN ($\delta^{13}\text{C}$) TRONG MẬT ONG Ở VIỆT NAM

Vũ Hoài, N.T.H. Thịnh, H.L.Anh, V.T.Anh, T.V.Châu, M.Đ.Kiên

Viện Khoa học và Kỹ thuật hạt nhân

179 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Email: vuhoai1211@gmail.com

Tóm tắt: Ứng dụng kỹ thuật đồng vị bền trong xác thực chất lượng thực phẩm đang là xu hướng phổ biến trên thế giới. Mục đích của nghiên cứu nhằm ứng dụng kỹ thuật đồng vị bền để đánh giá độ tinh khiết mật ong thông qua hàm lượng đường C4 có trong đó. Để phát hiện việc bổ sung đường vào mật ong, giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trong mật ong và chiết suất protein từ mật ong sẽ được phân tích trên hệ phổ kế tỉ số đồng vị (IRMS). Sự khác biệt giữa 2 giá trị trên không được vượt quá 1‰ theo tiêu chuẩn quốc tế. Các kết quả nghiên cứu bước đầu bổ sung dữ liệu đồng vị bền trong mẫu mật ong của Việt Nam vào cơ sở dữ liệu đồng vị thế giới. Hơn thế nữa, thông qua nghiên cứu cung cấp thêm cho cơ quan chức năng một công cụ để xác thực chất lượng mật ong đang lưu thông trên thị trường.

Từ khóa : Đồng vị bền; Carbon; IRMS; Mật ong; Xác thực chất lượng.

I. GIỚI THIỆU

Trong tự nhiên, cacbon có 2 đồng vị bền đó là: đồng vị bền ^{12}C chiếm 98,89 % và đồng vị bền ^{13}C chiếm 1,11%. Tuy nhiên, các quá trình hóa lý có thể làm thay đổi tỷ lệ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong từng thành phần của môi trường. Sự thay đổi dù là rất nhỏ về tỷ lệ đồng vị nặng so với đồng vị nhẹ này có thể truy nguyên các quá trình hóa học, vật lý và sinh học. Thành phần đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong các mẫu môi trường thường được xác định bằng khối phổ kế tỷ số đồng vị và được so sánh với tỷ lệ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong mẫu chuẩn Pee Dee Belemnite, thể hiện bằng sự khác nhau dưới dạng phần nghìn (‰) thông qua giá trị delta C-13 ($\delta^{13}\text{C}$).

Cây trồng cố định CO_2 từ không khí vào các mô thực vật thông qua quá trình quang hợp theo một trong ba chu trình: chu trình Calvin và Benson của các loại thực vật C_3 , chu trình Hatch Slack của các loại thực vật C_4 và chu trình Crassulacean Acid Metabolism của các loại thực vật CAM. Các loại thực vật khác nhau sẽ có giá trị $\delta^{13}\text{C}$ khác nhau. Các loại thực vật C_3 (nhãn, vải, cao su, hạt điều...) có giá trị $\delta^{13}\text{C}$ từ -33 đến -24‰. Các loại thực vật C_4 (mía, ngô...) có giá trị $\delta^{13}\text{C}$ từ -16 đến -10‰ và các loại thực vật CAM (dứa, xương rồng...) có giá trị $\delta^{13}\text{C}$ từ -11 đến -13,5 ‰ [1,2]. Chính vì vậy, khi ong hút mật của các loại thực vật khác nhau (từ chu trình C_3 , C_4 , CAM) thì các loại mật ong thu được sẽ có tỷ lệ đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ khác nhau. Việc bổ sung đường vào mật ong tinh khiết chủ yếu được sản xuất từ các loại cây C_4 (đường, mía...). Nó sẽ làm thay đổi thành phần đồng vị bền Cacbon của mật ong nhưng lại không thể làm thay đổi thành phần đồng vị bền cacbon trong protein của mật ong.

Nhờ có sự khác biệt về giá trị $\delta^{13}\text{C}$ giữa các loại thực vật C_3 , C_4 , CAM, việc xác định hàm lượng đường C_4 có trong mật ong đã ra đời. Năm 1989, kỹ thuật đồng vị được White & Winter nghiên cứu và xây dựng để phát hiện hàm lượng đường C_4 trong mật ong. Phương pháp này đã được hiệp hội hóa học phân tích Mỹ (AOAC) phê duyệt là phương pháp chính thức xác định hàm lượng đường C_4 trong mật ong. Sự khác biệt về giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trong mật ong và protein của nó không được vượt quá -1‰ tương ứng với lượng đường được bổ vào là không quá 7% theo quy định của quốc tế.

Hiện nay, đã có khá nhiều tác giả áp dụng phương pháp đồng vị C-13 để kiểm tra độ tinh khiết của mật ong. Trong số đó có tác giả Padovan cùng cộng sự (2007)[3] đã nghiên cứu lượng đường C_4 trong 30 mẫu mật ong thương phẩm tại Braxin. Kết quả cho thấy có 8/30 mẫu mật ong không tinh khiết với lượng đường C_4 thêm vào từ 7,3 đến 18,6%. Tại một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Simsek [4] và nhiều người khác đã sử dụng hệ khối phổ EA-IRMS để phân tích giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trong 31 mẫu mật ong của Thổ Nhĩ Kỳ và 43 mẫu mật ong thương mại. Các phân tích chỉ ra rằng giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của mật ong và thành phần protein của mật ong Thổ Nhĩ Kỳ có giá trị từ -23,30 đến -27,58 ‰ và từ -24,13 đến -26,76 ‰. Những giá trị $\delta^{13}\text{C}$ này trong các mẫu mật ong thương mại được xác định nằm trong khoảng từ -11,28 đến -25,54 ‰ và -

19,35 đến -25,61‰. Có 10 mẫu mật ong thương mại tương đương với 23% số mẫu bị phát hiện có lượng đường C₄.

Mục đích của bài báo là ứng dụng quy trình phân tích đồng vị bền $\delta^{13}\text{C}$ trong mật ong để kiểm tra một số mẫu mật ong của Việt Nam. Qua đó khẳng định tính thực tiễn phương pháp đối với thực trạng an toàn thực phẩm Việt Nam hiện nay.

II. THỰC NGHIỆM

1. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Mẫu mật ong được thu thập từ người nuôi ong trên cả nước theo mùa hoa năm 2018 và đầu năm 2019 như: hoa nhãn ở Hưng Yên, Sơn La, Nam Định; hoa cà phê ở Đắk Lắk; bạc hà ở Hà Giang, hoa cao su điều, keo ở Bình Phước. Các mẫu mật ong được lấy ở trong vụ hoa để đảm bảo mật ong không bị lẫn đường của người nông dân cho ăn trong khi dưỡng đàn ở đầu các vụ hoa hoặc lẫn hoa giữa các vụ.

Mẫu mật ong sau sẽ được thu thập vào các lọ thủy tinh có nắp kín, ghi rõ thời gian, địa điểm, ký hiệu mẫu. Mẫu sẽ được chuyển về ngay phòng thí nghiệm để bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Trước khi phân tích trên khối phổ kế tỉ số đồng vị (EA-IRMS), mẫu sẽ được lọc bỏ phần hoa và sáp ong còn lẫn bằng màng lọc có kích thước 0.1 mm. Một phần nhỏ (1g) được dùng để phân tích trực tiếp trên hệ EA-IRMS, một phần khác khoảng 30 g được đem đi kết tủa và tách protein.

2. Kết tủa protein trong mẫu mật ong cho phân tích $\delta^{13}\text{C}$

Quy trình tách Protein trong mẫu mật ong được áp dụng theo quy trình AOAC 998.12 của Hiệp hội Hóa học Phân tích Mỹ [5]. Quy trình thực hiện theo các bước như sau:

B1. Cân 10 g mật ong vào ống ly tâm dung tích 50 ml, thêm 4 ml nước khử ion và lắc đều cho đến khi hỗn hợp đồng nhất.

B2. Thêm 2 ml dung dịch Na₂WO₄ 10% và 2 ml dung dịch H₂SO₄ 0,335M vào ống thủy tinh 4ml rồi lắc đều hỗn hợp.

B3. Hỗn hợp được lắc đều sau đó được cho thêm vào ống ly tâm dung dịch mật ong trước đó.

B4. Lắc trộn đều hỗn hợp mẫu rồi gia nhiệt tại 80°C trong bể điều nhiệt cho đến khi xuất hiện kết tủa dưới đáy ống và phần dung dịch trong ống trở nên trong suốt. Nếu không xuất hiện kết tủa hoặc huyền phù xuất hiện trên bề mặt ống và dung dịch không trong suốt thì thêm vào dung dịch 5ml axit H₂SO₄ 0,335M rồi gia nhiệt lại. Lặp lại bước này cho đến khi xuất hiện kết tủa và dung dịch trở nên trong suốt.

B5. Thêm nước khử ion vào ống ly tâm đến 50ml, lắc đều rồi ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút.

B6. Dùng Pipet hút bỏ phần dung dịch trong suốt.

B7. Lặp lại 5 lần B5 và B6.

B8. Gạn kiệt nước rồi chuyển kết tủa vào lọ thủy tinh, sấy ở nhiệt độ 75°C trong 6h.

B9. Chuyển mẫu vào lọ đựng mẫu chuyên dụng, bảo quản trong bình hút ẩm chờ phân tích trên khối phổ kế tỉ số đồng vị (EA-IRMS).

3. Phân tích $\delta^{13}\text{C}$ trên khối phổ tỷ số đồng vị

Phương pháp phân tích được thực hiện trên hệ phổ kế tỉ số đồng vị (EA-IRMS) do hãng IsoPrime cung cấp đặt tại phòng thí nghiệm Thủy văn đồng vị của Viện KHKTHN:



Hình 1. Khối phổ kế tỉ số đồng vị tại phòng thí nghiệm Thủy văn đồng vị Viện Khoa học và Kỹ thuật Hạt nhân.

Mẫu được chuyển vào cột phản ứng có nhồi chất xúc tác oxit Crom và oxit Coban. Oxi tinh khiết được bơm vào cột để đốt cháy mẫu hoàn toàn ở nhiệt độ 1030°C và chuyển mẫu thành khí CO_x . CO_x được khí mang He dẫn qua cột khử chứa đồng tinh khiết ở nhiệt độ 650°C và bị chuyển hóa thành CO_2 . Khí này được tách nước và làm sạch khi đi qua cột bẫy nước, cột sắc ký và dẫn vào khối phổ kế IRMS. Dòng khí mang He được cấp liên tục cho EA-IRMS và kéo theo khí CO_2 vào buồng ion hóa, các khí này được chuyển thành các ion trong môi trường chân không 10^{-5} đến 10^{-8} mBar. Ion sau khi được tạo thành sẽ được gia tốc trong điện trường của khối phổ kế. Dòng ion gia tốc sẽ bị uốn cong bởi một từ trường ngoài theo định luật Lorenz với bán kính quỹ đạo phụ thuộc vào số khối của các ion nếu điện tích của chúng chỉ là $1+$. Các ion sau đó sẽ được thu vào các cốc Faraday để đếm số điện tích trên các kênh có số khối là 44 và 45. Thông tin được tạo ra sẽ được phân tích theo phần mềm chuyên dụng và lưu trữ trong máy tính.

Thành phần đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ được thể hiện thông qua giá trị $\delta^{13}\text{C}$ tính bằng phần nghìn (‰) và được so sánh với chuẩn gốc. Giá trị $\delta^{13}\text{C}$ được tính theo công thức:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000 \quad [1.1]$$

Trong đó: R_{sample} là tỷ lệ mole của đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong mẫu cần đo
 R_{standard} là tỷ lệ mole của đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong mẫu chuẩn

Mẫu chuẩn sử dụng trong phép phân tích $\delta^{13}\text{C}$ là mẫu VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) có tỷ lệ mole $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ là 0,0112372.

Các mẫu chuẩn quốc tế được sử dụng cho chương trình kiểm soát chất lượng phân tích tỷ số $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ trong mật ong là: IAEA CO-8 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -5,75‰), IAEA CO-9: ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -47,1‰) và IAEA-CH-3 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -22,72‰). Các mẫu chuẩn này được kẹp cùng mẫu phân tích đều ở trước, giữa và sau khi phân tích 1 mê 10 mẫu mật ong và mẫu protein để đảm bảo độ chính xác của kết quả phân tích.

Sử dụng cân phân tích có độ chia nhỏ nhất $1\mu\text{g}$, với sai số $\pm 2\mu\text{g}$ để cân 100 đến 200 μg các mẫu mật ong và protein của nó, gói mẫu vào các con nhộng thiếc và đem phân tích tỷ số đồng vị $\delta^{13}\text{C}$ trên hệ khối phổ kế EA-IRMS tại phòng thí nghiệm Thủy văn đồng vị. Các công việc kiểm soát và đảm bảo chất lượng phân tích (QA/QC) được nhóm nghiên cứu tham khảo các tài liệu [6, 7, 8].

Hàm lượng đường C₄ (đường mía, đường ngô) trong mẫu mật ong được tính theo công thức [9] sau:

$$\text{Đường C}_4 (\%) = [(\delta^{13}\text{C}_P - \delta^{13}\text{C}_H)/(\delta^{13}\text{C}_P - \delta^{13}\text{C}_S)] \times 100 \quad [1.2]$$

Trong đó:

- $\delta^{13}\text{C}_P$ là tỷ số đồng vị các bon trong mẫu protein (‰)
- $\delta^{13}\text{C}_H$ là tỷ số đồng vị các bon trong mẫu mật ong (‰)
- $\delta^{13}\text{C}_S$ là giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trung bình của chất tạo ngọt (đường ngô, mía) (‰)

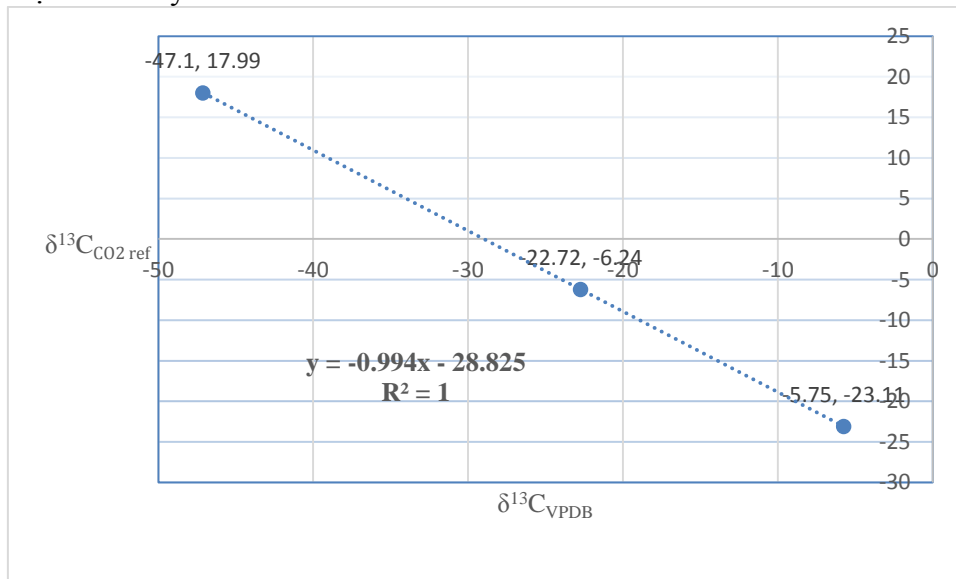
Tổ chức AOAC khuyến cáo sử dụng trị $\delta^{13}\text{C}$ trung bình của đường sản xuất từ cây C₄ là -9,7 ‰ để tính hàm lượng đường C₄ trong công thức (1.2) trên. Các sản phẩm mật ong được coi là không tinh khiết khi nó chứa hàm lượng đường C₄ (ngô, mía) lớn hơn hoặc bằng 7% [3, 5].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kiểm tra độ chính xác của phương pháp

Trước khi phân tích trên hệ phổ kế tỉ số đồng vị, các thông số về độ ổn định (stability)

và độ tuyến tính (linearity) của hệ phải được kiểm tra bằng khí chuẩn CO₂. Độ lệch chuẩn giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của 10 lần phân tích mẫu khí chuẩn là < 0,03 ‰ và 0,04 ‰ đối với lần lượt độ ổn định và độ tuyến tính. Khi đạt đủ điều kiện về độ ổn định và tuyến tính, tiến hành xây dựng đường chuẩn của phương pháp dựa trên mối tương quan giá trị $\delta^{13}\text{C}$ các mẫu chuẩn: IAEA CO-8 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -5,75‰), IAEA CO-9: ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -47,1‰), IAEA-CH-3 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: -22,72‰) và khí chuẩn CO₂ tinh khiết ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2 \text{ ref}}$). Kết quả đường chuẩn theo phương trình bậc nhất được trình bày ở hình 2:



Hình 2. Đường chuẩn tương quan giá trị $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2 \text{ ref}}$ và giá trị chứng nhận $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ có giá trị tương quan $R = 1$

Để kiểm chứng độ chính xác của đường chuẩn, nhóm nghiên cứu đã sử dụng mẫu chuẩn NBS 19 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$: 1,95‰) để phân tích như mẫu thường, kết quả ở bảng 1 cho thấy sai số nhỏ hơn 0,02 (‰), qua đó chứng minh đường chuẩn đáng tin cậy.

Bảng 1. Kết quả đo mẫu chuẩn NBS 19 dựa trên đường chuẩn tương quan.

Tên mẫu	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Sai số (‰)
NBS 19 -1	1,93	0,02
NBS 19 -2	1,94	0,01
NBS 19 -3	1,94	0,01

2. Kết quả

Có tất cả 11 mẫu mật ong bao gồm 9 mẫu mật ong thu được từ các nhà nuôi ong và 2 mẫu mật ong thương phẩm trên thị trường: Mật ong Coffee Đắc Lắc và mật ong hoa nhãn Hưng Yên được nhóm nghiên cứu thu thập và phân tích. Mỗi mẫu mật ong và mẫu protein được phân tích lặp 3 lần trên EA-IRMS và lấy kết quả trung bình. Kết quả chi tiết của các mẫu này được trình bày chi tiết ở bảng.

Bảng 2: Kết quả phân tích tổng hợp các mẫu mật ong

(A: mật ong pha đường C₄, P: mật ong nguyên chất)

Tên mật ong	$\delta^{13}\text{C}$ Mật ong (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	Đường C ₄ (%)	Chất lượng mật ong
MẬT ONG HOA NHÃN NAM ĐỊNH	-32,44 ± 0,18	-32,49 ± 0,17	0,21	P
MẬT ONG HOA NHÃN KHOÁI CHÂU	-27,56 ± 0,28	-27,32 ± 0,26	0	P
MẬT ONG COFFEE ĐẮKLẮK	-19,32 ± 0,18	-20,12 ± 0,14	7,65	A
MẬT ONG BẠC HÀ ĐỒNG VĂN	-25,71 ± 0,07	-25,48 ± 0,10	0	P
MẬT ONG NHÃN V1	-32,54 ± 0,01	-32,52 ± 0,03	0	P
MẬT ONG NHÃN V2	-32,08 ± 0,11	-32,04 ± 0,10	0	P
MẬT ONG KEO BÌNH PHƯỚC	-33,42 ± 0,05	-33,56 ± 0,07	0,58	P
MẬT ONG CAO SU ĐIỀU	-30,45 ± 0,06	-30,55 ± 0,12	0,48	P
MẬT ONG HOA NHÃN HƯNG YÊN	-31,88 ± 0,04	-31,92 ± 0,14	0,20	P
MẬT ONG TÁO	-31,14 ± 0,15	-31,21 ± 0,21	0,34	P
MẬT ONG HOA TẠP	-31,65 ± 0,06	-31,26 ± 0,09	0	P

Số liệu cho thấy độ lệch chuẩn của giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trong 3 lần đo đều nhỏ hơn 0,3 ‰ chứng tỏ sự ổn định của hệ phân tích tỷ số đồng vị. Bảng số liệu cho chúng ta thấy giá trị đường C₄ trong các mẫu mật ong thu thập trực tiếp tại các hộ nuôi ong đều có giá trị thấp dưới 7%. Trong khi đó 1 trong 2 mẫu mua ngoài thị trường đó là mẫu mật ong Coffee Đắc Lắc lại có giá trị cao hơn 7%, điều đó chứng tỏ mật ong đã được pha thêm đường vào trong mật.

KẾT LUẬN

Phương pháp phân tích đồng vị bền $\delta^{13}\text{C}$ trong mẫu mật ong trên khối phổ kế tỉ số đồng vị nhằm xác định hàm lượng đường C₄ có trong mẫu mật ong vẫn là 1 phương pháp tin cậy nhằm xác thực chất lượng của mẫu mật ong trên thị trường. Tuy nhiên, phương pháp kể trên chưa thể phân biệt được mật ong pha với đường được thủy phân từ tinh bột cây C₃. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu sẽ nghiên cứu sâu hơn nhằm cải thiện khắc phục hạn chế của phương pháp nhằm giúp các cơ quan chức năng có 1 công cụ xác thực chính xác để giảm thiểu sự cạnh tranh không lành mạnh trong kinh doanh và bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Korth W. & Ralston J. 2002. Techniques for the detection of adulterated honey [monograph on the Internet]. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No 02/047.

2. Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P. & Marchini J.S. 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry* 82, 633–636.
3. Padovan, G.J., Rodrigues, L.P., Leme, I.A., Jong David, D., Marchini, J.S., 2007. Presence of C4 sugars in honey samples detected by the carbon isotope ratio measured by IRMS. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 2:134-141.
4. Tübtak Ume A. Simsek, M. Bilsel, A. C. Goren, 2012. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, Volume 130, Issue 4, Pages 1115–1121.
5. Association of Analytical Communities (AOAC) official methods of analysis method 998.12: C-4 plant sugars in honey, internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC Int. Gaithersburg MD (USA). 1999, Chap. 44, 27–30.
6. Rogers et al. 2013. Modification of AOAC Official Method 998.12 to Add Filtration and/or Centrifugation: Interlaboratory Comparison Exercise. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 96, no 3, 607.
7. Rogers, K.M., Somerton, K., Rogers, P., & Cox, J. (2010) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2370–2374. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4642>
8. Tosun, M., 2013. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chemistry*, 138:1629- 1632.
9. White, J.W., 1992. Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C4 plant sugars in honey: collaborative study and evaluation of improved protein preparation procedure. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 75:543-548.

STABLE CARBON ISOTOPE RATIO ANALYSIS ($\delta^{13}\text{C}$) OF HONEY IN VIETNAM

Vu Hoai, N.T.H.Thinh, H.L.Anh, V.T.Anh, T.V.Chau, M.D.Kien

Institute for Nuclear Science and Technology

179 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ha Noi

Email: vuhoai1211@gmail.com

Abstract: Application of stable isotope techniques in food quality authentication is a widespread in the world nowadays. The objectives of this research were to develop a stable isotope technique to distinguish natural honey and honey added sugar through the amount of C4 sugar. To detect the addition of sugar to honey, the value of $\delta^{13}\text{C}$ in honey and protein extracted from honey was analyzed on the isotope ratio system (IRMS). The difference between this must not exceed 1‰ according to international standards. The research results initially added stable isotope data in Vietnam's honey samples to the world isotopic database. Moreover, it provides the authorities with a tool to authenticate the quality of honey circulating in the market.

Key words: Stable isotope; Carbon; IRMS; Honey; Quality authentication.