

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN C IN SURVIVAL TABLETS

NGUYEN NGOC HUONG¹, CHU VAN MEN^{2,✉}, TRAN THI PHUONG¹,
PHUNG THI PHUONG¹, NGUYEN THI THANH HANG²

¹Department of Drug Quality Control and Toxicology, Vietnam University of Traditional Medicine

²Institute of Military Medical and Pharmaceutical Research, Military Medical University

✉Corresponding author: chuvanmen@vmmu.edu.vn

Received May 24th, 2026

Accepted September 25th, 2026

Abstract: This study was conducted to develop and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantification of vitamin C in survival tablets. The optimized chromatographic conditions consisted of a C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) column, a mobile phase of water containing 0,1% acetic acid and methanol (90 : 10, v/v), a flow rate of 0,5 mL/min, an injection volume of 10 μ L, and a detection wavelength of 245 nm. Samples were processed by single ultrasonic extraction with a 0,1% TFA solution in water for 15 minutes. The method was validated according to ICH guidelines and showed good system suitability and high specificity. The method exhibited a linear range of 0,25 – 500 μ g/mL with a correlation coefficient $R^2=0.9999$. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0,10 μ g/mL and 0,25 μ g/mL, respectively. The precision of the method was satisfactory, with intra-day and inter-day RSD values below 2%, and recovery rates ranging from 95 to 105% (RSD < 2%). These results confirm that the method is suitable for the determination of vitamin C content in survival tablets.

Keywords: Survival tablets, vitamin C, HPLC, method validation

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN C TRONG VIÊN NÉN SINH TỒN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

NGUYỄN NGỌC HƯỜNG¹, CHỦ VĂN MÊN^{2,✉}, TRẦN THỊ PHƯỢNG¹,
PHÙNG THỊ PHƯƠNG¹, NGUYỄN THỊ THANH HẰNG²

¹Bộ môn Kiểm nghiệm thuốc và Độc chất, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

✉Tác giả liên hệ: chuvanmen@vmmu.edu.vn

Nhận bài ngày 24 tháng 05 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 09 năm 2026

Tóm tắt: Nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Điều kiện sắc ký gồm cột C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pha động dung dịch acid acetic 0,1% – methanol (90 : 10, v/v), tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm 10 μ L và bước sóng phát hiện tại 245 nm. Mẫu được xử lý bằng phương pháp chiết siêu âm một lần với dung dịch TFA 0,1% trong 15 phút. Phương pháp đạt yêu cầu thẩm định theo yêu cầu của ICH với tính tương thích hệ thống và độ đặc hiệu cao. Phương pháp có khoảng tuyến tính từ 0,25 – 500 μ g/mL với hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 0,10 μ g/mL và 0,25 μ g/mL. Độ chính xác của phương pháp đạt yêu cầu với giá trị RSD trong ngày và khác ngày đều nhỏ hơn 2%, đồng thời độ thu hồi nằm trong khoảng 95 – 105% với RSD < 2%. Các kết quả khảo sát đạt yêu cầu về thẩm định, có thể áp dụng để xác định hàm lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn.

Từ khóa: Viên nén sinh tồn, vitamin C, HPLC, thẩm định phương pháp

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vitamin C là một hợp chất hữu cơ tan trong nước và tham gia vào nhiều quá trình sinh học. Hợp chất này thường được đưa vào các dạng bào chế như viên nén trong nhiều sản phẩm như thuốc, thực phẩm bổ sung và mỹ phẩm nhờ nhiều tác dụng đối với sức khỏe. Viên nén sinh tồn là một chế phẩm được bào chế nhỏ gọn để cung cấp năng lượng và dinh dưỡng thiết yếu thường được sử dụng cho các vận động viên, người leo núi, thám hiểm hay trong các trường hợp khẩn cấp như thiên tai bão lũ, sử dụng cho quân đội khi thực hiện nhiệm vụ ở môi trường khó khăn thiếu điều kiện nấu nướng. Thành phần chính của viên nén sinh tồn gồm sữa bột tách béo, đường, dầu thực vật, protein, vitamin và khoáng chất trong đó vitamin C chiếm hàm lượng lớn trong nhóm vitamin của viên nén sinh tồn [1].

Vitamin C là vitamin có tính khử mạnh và dễ bị oxy hóa bởi nhiệt độ, ánh sáng và môi trường [2, 3]. Vitamin C có tác dụng trong phòng và điều trị bệnh scorbut, chống oxy hóa, tăng sức đề kháng, ... [4 – 7] trong viên nén sinh tồn thì vitamin C có vai trò bổ sung vitamin thiết yếu, hỗ trợ duy trì chức năng miễn dịch và tăng cường hấp thu sắt, góp phần đảm bảo giá trị dinh dưỡng của sản phẩm, đặc biệt đối với người sử dụng trong điều kiện hoạt động thể lực cao hoặc hạn chế về nguồn thực phẩm [1]. Do đó, việc xác định chính xác hàm lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn có ý nghĩa quan trọng trong kiểm soát chất lượng và đảm bảo hiệu quả sử dụng. Hiện nay, trong các nghiên cứu trên nhiều nền mẫu khác nhau vitamin C thường được định lượng bằng phương pháp chuẩn độ, quang phổ UV-Vis, LC-MS/MS, HPLC [8 – 19]. Trong đó, phương pháp chuẩn độ và UV-Vis còn hạn chế về độ chọn lọc và độ nhạy khi áp dụng trên nền mẫu phức tạp, trong khi LC-MS/MS đòi hỏi thiết bị hiện đại và chi phí phân tích cao. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhờ có độ chính xác, độ nhạy và khả năng phân tích tốt đối với các nền mẫu phức tạp, đồng thời phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm thông thường. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào về định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn bằng phương pháp HPLC vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn bằng HPLC.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là vitamin C trong viên nén

sinh tồn (The Survival Tabs) được Mỹ sản xuất với các thành phần chính gồm: Saccharose, sữa bột tách béo, dầu thực vật, vitamin C, canxi, vitamin E, vitamin B2, vitamin B3, kẽm, sắt, kali, vitamin A, vitamin D3, ... trong đó hàm lượng vitamin C khoảng 3,2 mg/viên, khối lượng viên sinh tồn trung bình của 20 viên là 3,5494 g.

2.2. Nguyên vật liệu, thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ dùng: Hệ thống HPLC Waters detector PDA (Mỹ); cân phân tích Mettler Toledo MS105 (Thụy Sĩ) độ chính xác 0,01 mg; máy ly tâm lạnh Hettich MIKRO 220R (Đức); máy siêu âm Elmasonic SH – 40 (Đức); bộ lọc hút chân không dùng cho sắc ký; cột sắc ký YMC C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) (Nhật); micropipet; bình định mức tối màu và các thiết bị, dụng cụ khác.

2.2.2. Chất chuẩn, hóa chất và dung môi

Chất chuẩn: Acid ascorbic hàm lượng 100,1% (số lô: C0421031) được cung cấp bởi Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Acid acetic (glacial) (Merck), acid trifluoroacetic (Sigma Aldrich), acid formic (Fisher), ethanol (Merck, loại HPLC), methanol (Merck, loại HPLC), ortho – acid phosphoric (Merck).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10 mg chất chuẩn acid ascorbic cho vào bình định mức tối màu 10 mL, thêm 5 mL nước cất 2 lần, lắc siêu âm 5 phút để hòa tan hoàn toàn. Thêm nước đến vạch định mức thu được dung dịch chuẩn gốc vitamin C nồng độ 1 mg/mL, sử dụng trong ngày bảo quản lạnh ở 5°C tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn làm việc: Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng với nước cất 2 lần thành dung dịch chuẩn làm việc vitamin C nồng độ 500 μ g/mL. Dung dịch này được sử dụng để pha các dung dịch chuẩn có nồng độ phù hợp với điều kiện thí nghiệm thực tế.

Dung dịch thử: Cân 1 g bột viên nén sinh tồn cho vào bình định mức tối màu 20 mL; thêm dung môi pha mẫu và lắc siêu âm trong thời gian phù hợp. Sau đó ly tâm lạnh ở 5°C tốc độ 4500 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dung dịch phía trên (pha loãng nếu cần), lọc qua màng lọc 0,45 μ m tiến hành chạy sắc ký.



Hình 1. Mẫu viên nén sinh tồn

2.3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Vì vitamin C tan tốt trong nước, phân cực mạnh, dễ bị ion hóa do đó đề tài sử dụng vitamin C chuẩn nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ được pha từ dung dịch chuẩn làm việc tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký nhằm lựa chọn hệ pha động và thông số tối ưu. Nghiên cứu tiến hành khảo sát một số điều kiện sắc ký như sau: Dung môi pha động gồm acid acetic 0,1% (A); methanol (B) được khảo sát ở các tỷ lệ khác nhau và chạy theo chương trình đẳng dòng như sau: 100% (A); 90% : 10%; 70% : 30%; 50% : 50% (A : B, v/v). Đồng thời khảo sát loại acid bổ sung vào pha nước (acid acetic, acid formic, acid phosphoric) và nồng độ acid (0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%). Tốc độ dòng được khảo sát ở các mức 0,5 mL/phút; 0,7 mL/phút và 1 mL/phút. Các thông số sắc ký cố định gồm: Cột YMC C18 (250 x 4,6 mm, S-5 μm), thể tích tiêm mẫu 10 μL .

Yêu cầu: Ở mỗi điều kiện khảo sát thực hiện lặp lại 3 lần lựa chọn điều kiện mà thời gian lưu phù hợp, hình ảnh pic sắc nét nhất, diện tích pic lớn, pic cân đối với hệ số đối xứng $0,8 \leq As \leq 1,5$; tinh khiết pic dùng đầu dò PDA phải đạt Purity Angle < Purity Threshold, phổ so ở ba điểm trên pic trùng nhau, số đĩa lý thuyết $N \geq 2000$.

2.3.3. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Tiến hành khảo sát các điều kiện xử lý mẫu như dung môi chiết gồm: nước có bổ sung acid trifluoroacetic (TFA), methanol, ethanol; thời gian chiết (5, 15, 30, 60 phút); tỷ lệ bột/dung môi (1/10, 1/20, 1/40 g/mL); số lần chiết (1, 2, 3 lần), từ đó lựa chọn điều kiện đảm bảo hiệu suất cao nhưng vẫn tiết kiệm dung môi, thời gian và phù hợp với kinh tế kỹ thuật phòng thí nghiệm.

Yêu cầu: Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả được xử lý thống kê và đánh giá dựa trên hàm lượng vitamin C thu được kết hợp với hình dạng pic sắc ký để lựa chọn điều kiện tối ưu.

2.3.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH gồm: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác, độ đúng [20].

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

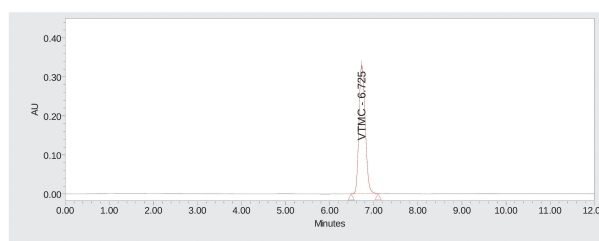
Các kết quả thực nghiệm được tính toán trên Microsoft Office Excel 2016, các so sánh thống kê thực hiện trên SPSS 27. Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Phân tích khác biệt trung bình One-way ANOVA được sử dụng để so sánh sự khác nhau giữa các nhóm. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát pha động

Hệ pha động dung dịch acid acetic 0,1% – MeOH (90 : 10, v/v) được lựa chọn làm pha động của phương pháp phân tích.



Hình 2. Sắc ký khảo sát pha động acid acetic 0,1% – MeOH (90 : 10, v/v)

Lựa chọn pha động acid acetic 0,1% – MeOH (90 : 10, v/v) cho hình ảnh sắc nét, diện tích pic lớn hơn các pha động khảo sát khác. Việc bổ sung acid giúp hạn chế ion hóa và ổn định vitamin C, đồng thời giảm tương tác

với các nhóm silanol tự do trên cột C18. Methanol giúp cải thiện khả năng rửa giải và làm pic sắc nét hơn, pha động cũng phù hợp với phần lớn các nghiên cứu về định

lượng vitamin C bằng HPLC khi pha động đều kết hợp giữa nước thêm acid và dung môi hữu cơ [17, 21 – 22].

Kết quả khảo sát loại acid thêm vào kênh nước

Bảng 1. Kết quả khảo sát loại acid thêm vào kênh nước

Loại acid thêm vào	t_R (Phút)	Spic ($\mu V.s$)	Hệ số bất đối xứng (As)	Số đĩa lý thuyết (N)	Purity Angle	Purity Threshold
Acid acetic	6,735	3026126	1,151	12657,52	0,054	0,254
	6,720	3025732	1,148	11963,31	0,047	0,254
	6,741	3024180	1,148	12361,10	0,044	0,251
Acid formic	6,785	3029327	0,966	6406,36	0,085	0,253
	6,783	3019879	0,976	6482,06	0,064	0,260
	6,779	3026574	0,978	6632,45	0,073	0,260
Acid phosphoric	6,877	3023334	1,02	8880,97	0,046	0,248
	6,721	3032155	1,01	8581,34	0,037	0,243
	6,827	3021688	0,985	8652,86	0,036	0,243

Từ bảng 1 cho thấy acid acetic cho số đĩa lý thuyết lớn nhất, do đó được lựa chọn để bổ sung vào pha động. Đối với acid formic, mặc dù pic tương đối đối xứng với giá trị As khoảng 0,9; số đĩa lý thuyết giảm đáng kể so với acid acetic, cho thấy hiệu suất cột thấp hơn. Đối với acid phosphoric, các thông số sắc ký đạt mức trung bình, tuy nhiên số đĩa lý thuyết vẫn thấp hơn so với acid acetic. Sự khác biệt về hiệu quả sắc ký có thể liên quan đến sự khác nhau về độ acid và pH của pha động khi sử dụng các acid khác nhau

Kết quả khảo sát nồng độ acid thêm vào kênh nước

Bảng 2. Kết quả khảo sát nồng độ acid thêm vào kênh nước

Phần trăm (%)	t_R (Phút)	Spic ($\mu V.s$)	Hệ số bất đối xứng (As)	Số đĩa lý thuyết (N)	Purity Angle	Purity Threshold
0,1	6,421	3001632	1,112	12162,13	0,048	0,256
	6,387	2998463	1,109	12564,26	0,051	0,247
	6,426	2981463	1,116	12354,14	0,046	0,248
0,25	6,406	3025314	1,091	12564,21	0,054	0,257
	6,386	3016214	1,102	12663,13	0,046	0,254
	6,416	3012634	1,087	12325,65	0,047	0,250
0,5	6,312	3012561	1,101	12622,25	0,058	0,261
	6,327	3021012	1,097	12513,71	0,061	0,258
	6,312	3012621	1,112	12237,37	0,064	0,255
1	6,393	2986314	1,086	11923,61	0,068	0,241
	6,382	2975614	1,080	11852,72	0,061	0,238
	6,396	2981469	1,087	11985,22	0,057	0,246

Kết quả bảng 2 cho thấy nồng độ acid không làm ảnh hưởng đến kết quả pic thu được. Do đó lựa chọn nồng độ 0,1% acid acetic thêm vào kênh nước. Khi tăng nồng độ acid có thể ảnh hưởng đến pha tĩnh gây hỏng pha tĩnh, giảm tuổi thọ cột, do đó trong HPLC nồng độ acid trong pha động thường được duy trì ở mức thấp nhằm đảm bảo kiểm soát pH hiệu quả mà không làm giảm tuổi thọ, hiệu suất cột. Việc lựa chọn 0,1% acid acetic là hợp lý vì nồng

độ đủ để ổn định vitamin C, không quá cao gây tương tác giảm hiệu năng cột mà các thông số vẫn đạt yêu cầu.

Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Khảo sát tốc độ dòng tại các mức 0,5 mL/phút; 0,7 mL/phút và 1 mL/phút nhằm đánh giá ảnh hưởng của tốc độ dòng đến thời gian lưu, diện tích pic và hiệu quả tách của vitamin C. Kết quả khảo sát được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng (mL/phút)	t_R (Phút)	Spic ($\mu V.s$)	Hệ số bất đối xứng (As)	Số đĩa lý thuyết (N)	Purity Angle	Purity Threshold
0,5	6,772	2995941	1,146	12651,75	0,033	0,251
	6,761	3012563	1,148	11523,23	0,034	0,251
	6,781	3002623	1,154	12356,57	0,057	0,286
0,7	4,904	2099000	1,056	9813,02	0,086	0,262
	4,872	2102654	1,037	9756,58	0,081	0,271
	4,886	2084513	1,088	9847,38	0,075	0,272
1	3,894	1601222	0,995	7513,56	0,080	0,265
	3,865	1612645	0,997	7589,12	0,087	0,261
	3,897	1595314	0,998	7567,39	0,078	0,263

Tốc độ dòng 0,5 mL/phút cho diện tích pic lớn, số đĩa lý thuyết cao do đó lựa chọn tốc độ dòng 0,5 mL/phút của phương pháp phân tích. Khi tăng tốc độ dòng từ 0,5 lên 1 mL/phút, thời gian lưu giảm rõ rệt, phản ánh đúng bản chất động học của quá trình sắc ký khi vận tốc pha động tăng làm giảm thời gian chất phân tích tương tác với pha tĩnh cùng với giảm thời gian tiếp xúc của chất phân tích với detector. Tuy nhiên, sự giảm thời gian lưu này đi kèm với sự suy giảm đáng kể số đĩa lý thuyết (từ > 12000 xuống khoảng 7500), cho thấy hiệu năng cột giảm khi vận tốc dòng tăng. Xu hướng này phù hợp với phương trình Van Deemter, theo đó hiệu quả tách phụ thuộc vào sự cân bằng giữa các yếu tố khuếch tán dọc và sự chuyển khối. Ở tốc độ dòng thấp (0,5 mL/phút), tương tác giữa pha động và pha tĩnh diễn ra đầy đủ, giúp giảm độ giãn pic và tăng số đĩa lý thuyết. Điều này được thể hiện qua giá trị N cao nhất và diện tích pic lớn nhất, chứng tỏ tín hiệu thu được ổn định và độ nhạy cao hơn. Sự suy giảm về hiệu năng tách, đặc biệt trong trường hợp mẫu có nền phức tạp như viên nén sinh tồn cần độ phân giải cao để tránh

nhieu. Trong nghiên cứu này tốc độ dòng 0,5 mL/phút mặc dù cho thời gian phân tích dài hơn nhưng không đáng kể so với tốc độ dòng 0,7 mL/phút và 1 mL/phút, bên cạnh đó còn tiết kiệm được dung môi, đảm bảo số đĩa lý thuyết cao, diện tích pic lớn cho khả năng tách tốt hơn trong nền mẫu phức tạp.

Từ các kết quả trên, điều kiện sắc ký để định lượng vitamin C được tổng hợp như sau: Cột sắc ký pha đảo YMC C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Pha động: acid acetic 0,1% - MeOH (90 : 10, v/v) theo chương trình đẳng dòng. Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút. Detector PDA: Phát hiện ở bước sóng 245 nm. Nhiệt độ cột: 25°C. Thể tích tiêm: 10 μ L.

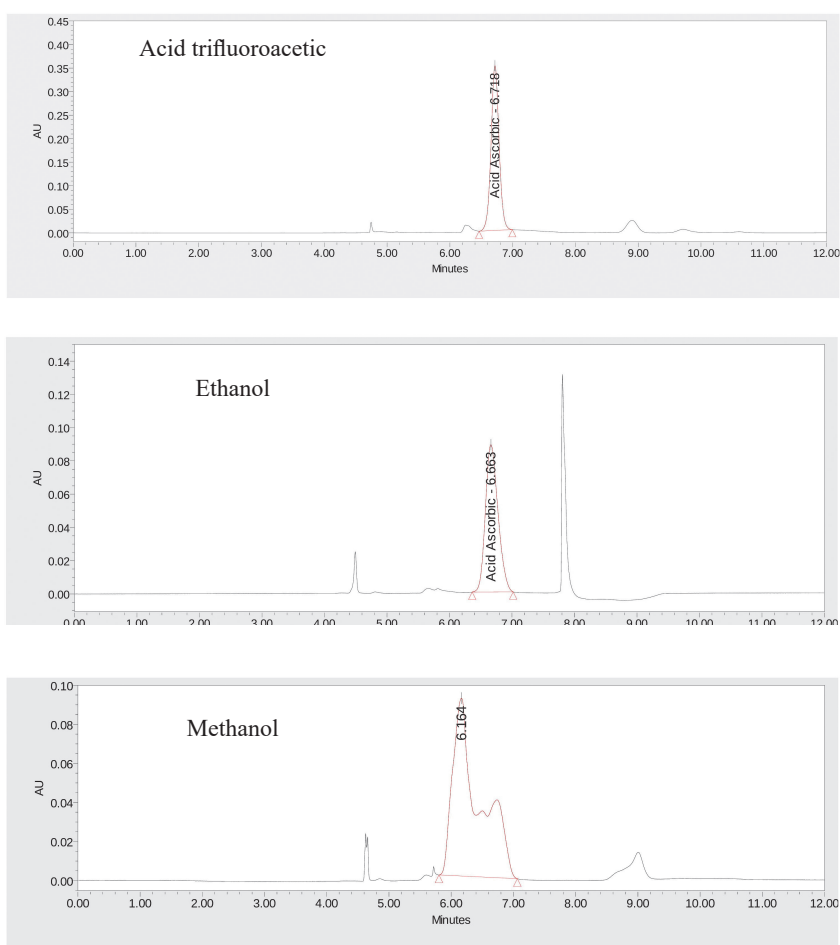
3.2. Kết quả khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Kết quả khảo sát dung môi chiết

Khảo sát dung môi chiết mẫu bao gồm: 0,1% trifluoroacetic, ethanol, methanol giúp đánh giá khả năng chiết vitamin C thông qua hàm lượng và hình ảnh của sắc ký đồ. Kết quả thể hiện tại bảng 4 và hình 3.

Bảng 4. Kết quả khảo sát dung môi chiết mẫu

Dung môi chiết	Khối lượng cân (g)	Nồng độ (µg/mL)	Hàm lượng (mg/g)	Trung bình (mg/g)	SD
0,1% TFA	1,0021	45,625	0,911	0,904	0,006
	1,0076	45,278	0,899		
	1,0082	45,440	0,901		
EtOH	1,0027	21,020	0,419	0,423	0,003
	1,0062	21,294	0,423		
	1,0035	21,360	0,426		
MeOH	1,0031	—	—	—	—
	1,0056	—	—		
	1,0021	—	—		



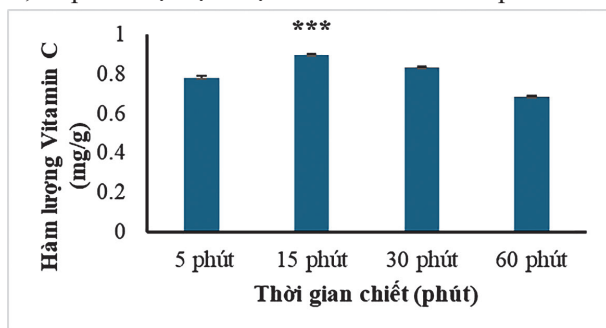
Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát dung môi chiết

Từ bảng 4 và hình 3 dung môi chiết 0,1% TFA cho hàm lượng chiết vitamin C từ viên nén sinh tồn là lớn nhất với hàm lượng trung bình 0,904 (mg/g); hình ảnh pic trên sắc ký đồ sắc nét; cân đối không chệch. Do đó lựa chọn 0,1% TFA làm dung môi chiết mẫu viên nén sinh tồn.

Dung môi chiết đóng vai trò quan trọng trong việc hoà tan và ổn định vitamin C khi phân tích từ nền viên nén sinh tồn. Một dung môi chiết phù hợp không chỉ cần đảm bảo khả năng hòa tan tốt vitamin C mà còn phải kiểm soát được các yếu tố gây phân hủy hoạt chất và loại bỏ các thành phần tạp không cần thiết trong nền mẫu. Dung môi nước 0,1% acid trifluoroacetic cho hàm lượng vitamin C cao nhất ($0,904 \pm 0,006$ mg/g), trong khi ethanol cho hàm lượng thấp hơn ($0,423$ mg/g $\pm 0,003$) và methanol cho sắc ký đồ không phù hợp. Về mặt hóa học, vitamin C là một hợp chất có tính khử mạnh, rất nhạy với quá trình oxy hóa, đặc biệt trong môi trường pH trung tính hoặc kiềm. Trong nghiên cứu này, TFA đóng vai trò acid mạnh, giúp kiểm soát pH hiệu quả, từ đó bảo vệ vitamin C trong suốt quá trình chiết và phân tích. Bên cạnh đó, TFA có khả năng biến tính và kết tủa protein. Trong mẫu viên nén sinh tồn vitamin C có thể bị giữ hoặc tương tác với nền mẫu, việc TFA gây kết tủa protein giúp giải phóng vitamin C khỏi nền mẫu, đồng thời loại bỏ các thành phần tạp, từ đó cải thiện đáng kể hình dạng pic sắc ký (pic sắc nét, không chệch). Bên cạnh đó ethanol mặc dù có thể gây kết tủa protein, nhưng tính phân cực trung bình khả năng hoà tan vitamin C thấp hơn và tăng hòa tan tạp chất. Methanol cũng có thể hòa tan vitamin C và tủa protein tuy nhiên methanol lại hòa tan nhiều tạp chất từ nền mẫu, làm tăng nhiễu và ảnh hưởng đến tín hiệu sắc ký, và không ổn định được vitamin C.

Kết quả khảo sát thời gian chiết siêu âm

Kết quả khảo sát thời gian chiết cho thấy tại thời gian 15 phút cho hàm lượng vitamin C chiết được lớn nhất. Do đó, 15 phút được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.



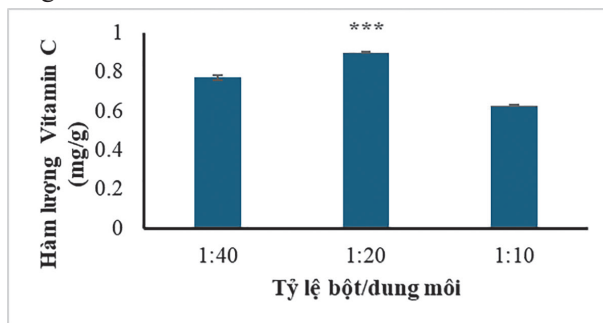
Hình 4. Ảnh hưởng thời gian chiết đến hàm lượng vitamin C

Thời gian chiết là một thông số ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất chiết được đặc biệt khi áp dụng phương pháp siêu âm. Kết quả cho thấy hàm lượng vitamin C tăng cao khi kéo dài thời gian siêu âm từ 5 phút ($0,780 \pm 0,009$ mg/g) lên 15 phút ($0,897 \pm 0,005$ mg/g với $n = 3$), sau đó

lại giảm dần khi tiếp tục kéo dài đến 30 phút và 60 phút. Ở giai đoạn đầu (5 – 15 phút), sự gia tăng hàm lượng vitamin C có thể được giải thích bởi cơ chế của siêu âm. Hiện tượng tạo ra các vi bọt khí trong dung môi, khi các bọt này sụp đổ chúng giúp phá vỡ cấu trúc viên nén, làm tăng diện tích tiếp xúc và thúc đẩy quá trình khuếch tán vitamin C từ nền mẫu rắn vào dung môi. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian siêu âm vượt quá 15 phút, hàm lượng vitamin C lại giảm dần (còn $0,831 \pm 0,005$ mg/g ở 30 phút và $0,683 \pm 0,007$ mg/g ở 60 phút). Điều này cho thấy khi vitamin C đã được tách ra khỏi nền mẫu bắt đầu có sự phân hủy. Vitamin C vốn là một hợp chất không bền, dễ bị oxy hóa dưới tác động của nhiệt độ, oxy hòa tan và các gốc tự do. Trong quá trình siêu âm kéo dài nhiệt độ cao đồng thời làm tăng các thành phần khác hòa tan vào dung môi từ đó làm oxy hóa vitamin C. Bên cạnh đó, thời gian siêu âm dài cũng làm tăng nhiệt độ tổng thể càng làm tăng tốc độ phân hủy hoạt chất.

Kết quả khảo sát tỷ lệ bột/dung môi

Kết quả khảo sát tỷ lệ bột/dung môi được thể hiện trong hình sau:

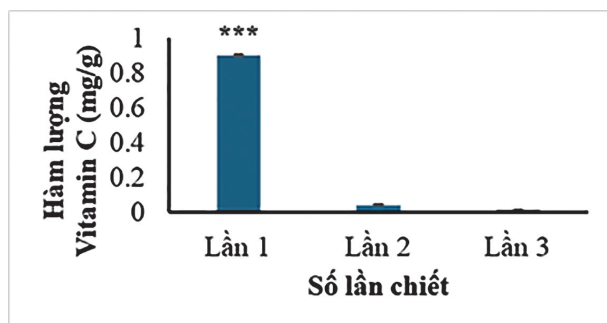


Hình 5. Ảnh hưởng tỷ lệ bột/dung môi đến hàm lượng vitamin C

Kết quả cho thấy ở tỷ lệ 1/20 (g/mL) cho hàm lượng chiết vitamin C cao nhất. Do đó, tỷ lệ này được lựa chọn cho nghiên cứu. Khi thay đổi tỷ lệ từ 1 : 40 đến 1 : 10 (g/mL), hàm lượng vitamin C tăng cao nhất $0,898 \pm 0,002$ mg/g tại tỷ lệ 1 : 20, sau đó giảm ở tỷ lệ 1 : 10 (g/mL). Ở tỷ lệ dung môi 1 : 40, mặc dù dung môi lớn tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình khuếch tán vitamin C từ pha rắn vào pha lỏng, nhưng nồng độ dung dịch thu được lại thấp do bị pha loãng, làm giảm độ nhạy của phép phân tích và dễ bị ảnh hưởng bởi nhiễu nền. Đồng thời khi chiết siêu âm, thể tích dung môi quá lớn cũng làm giảm mật độ tác động lên mẫu, từ đó hạn chế hiệu quả phá vỡ cấu trúc nền.

Kết quả khảo sát số lần chiết

Kết quả khảo sát số lần chiết được thể hiện trong hình sau:



Hình 6. Ảnh hưởng số lần chiết đến hàm lượng vitamin C

Kết quả khảo sát cho thấy phần lớn vitamin C được chiết ở lần chiết đầu tiên hàm lượng vitamin C chiết được $0,899 \pm 0,008$ mg/g với hiệu suất trung bình đạt 93,939%. Hàm lượng vitamin C thu được ở lần chiết thứ hai và thứ ba giảm đáng kể, với hiệu suất lần lượt là 4,389% và

1,672%. Trong điều kiện khảo sát, lần chiết thứ nhất thu được phần lớn lượng vitamin C có thể chiết được và các lần chiết tiếp theo chỉ chiết được một lượng tương đối nhỏ, về mặt thực tiễn việc thực hiện nhiều lần chiết không chỉ làm tăng thời gian thao tác, dung môi sử dụng mà còn làm tăng sai số trong quá trình xử lý mẫu, trong khi hiệu quả cải thiện là không đáng kể. Do đó, chiết 1 lần được lựa chọn.

3.3. Kết quả thẩm định phương pháp

Tính tương thích hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần lặp lại theo phương pháp đã xây dựng mẫu chuẩn vitamin C nồng độ 50 µg/mL được pha từ dung dịch chuẩn làm việc. Xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic, hệ số bất đối xứng, số đĩa lý thuyết kết quả thể hiện tại bảng 5.

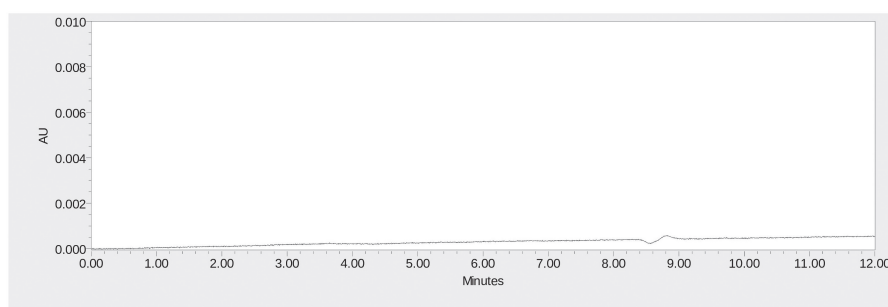
Bảng 5. Kết quả tính tương thích hệ thống

STT	t_R (phút)	Spic (µV.s)	Hệ số bất đối xứng (As)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	6,726	3076423	1,166	11398
2	6,726	3072677	1,170	11518
3	6,737	3072498	1,173	11510
4	6,741	3072498	1,163	11456
5	6,740	3055237	1,165	11365
6	6,741	3045971	1,164	11480
TB	6,730	3065884	1,167	11455
RSD (%)	0,108	0,401	0,332	0,538

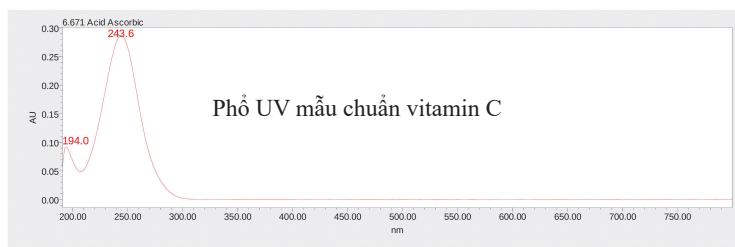
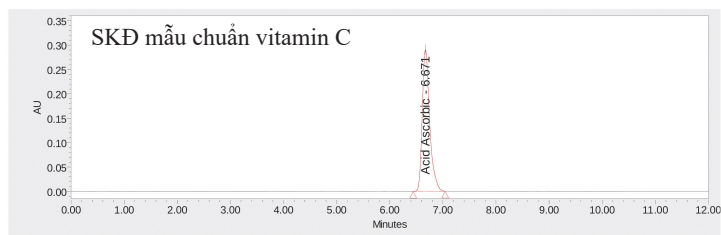
Giá trị RSD (%) của thời gian lưu là 0,108% nhỏ hơn 1%, các thông số Spic, As và N đều nhỏ hơn 2%. Hệ số bất đối xứng (As) trung bình 1,167 nằm trong khoảng 0,8 – 1,5; số đĩa lý thuyết (N) trung bình 11455 lớn hơn 2000 cho thấy hệ thống phù hợp để định lượng vitamin C với tính tương thích cao.

Độ đặc hiệu

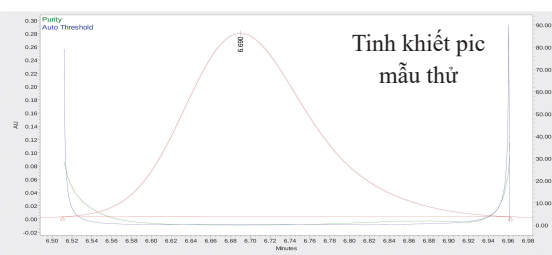
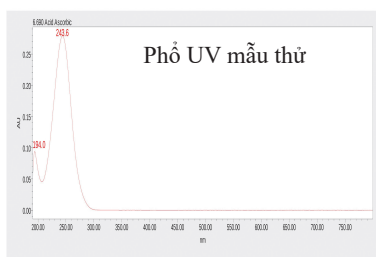
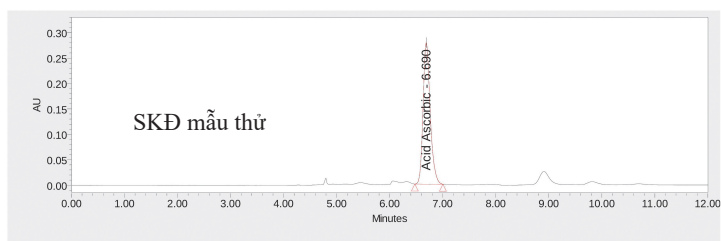
Tiến hành sắc ký đồng thời dung môi, mẫu chuẩn vitamin C nồng độ 50 µg/mL, mẫu thực, mẫu thực thêm chuẩn vitamin C nồng độ 50 µg/mL kết quả được thể hiện tại các hình sau.



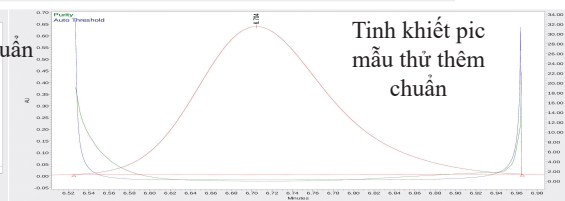
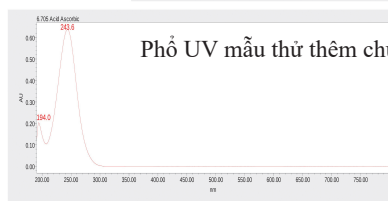
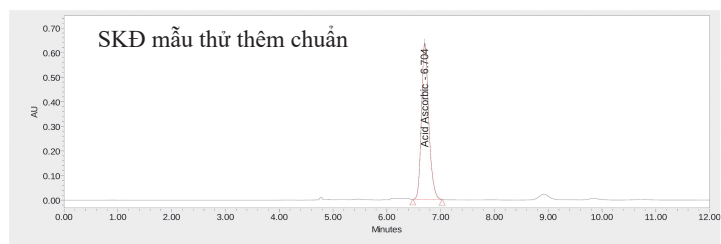
Hình 7. Sắc ký đồ dung môi



Hình 8. Sắc ký đồ và phổ UV mẫu chuẩn



Hình 9. Sắc ký đồ mẫu thử, phổ UV, tinh khiết pic mẫu thử

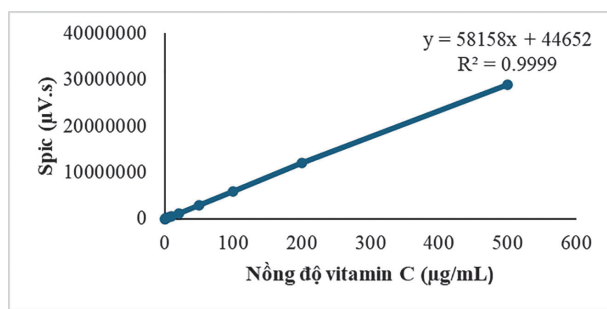


Hình 10. Sắc ký đồ, phổ UV, tinh khiết pic mẫu thử thêm chuẩn

Từ các hình trên cho thấy trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic vitamin C trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ của mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic vitamin C trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Phổ UV của pic mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn tương tự phổ UV của pic mẫu chuẩn. Tinh khiết pic khi sử dụng detector PDA cho thấy pic ở mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn đều tinh khiết. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có độ đặc hiệu cao.

Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Khoảng tuyến tính của phương pháp từ 0,25 – 500 µg/mL ($R^2 = 0,9999$) được thể hiện trong hình sau.



Hình 11. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ vitamin C

Sau khi khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

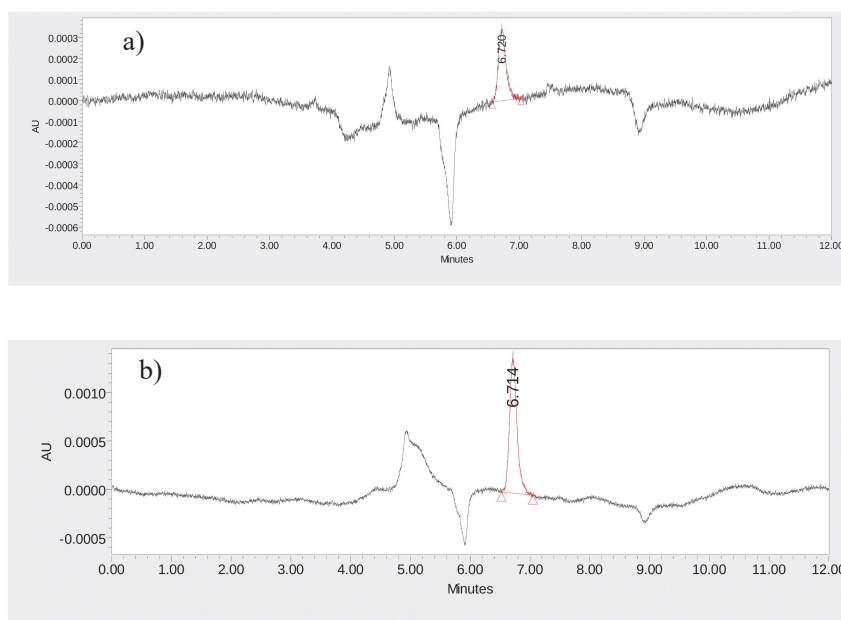
cho thấy khoảng tuyến tính cho khoảng nồng độ rộng. Do đó khoảng nồng độ 2 – 200 µg/mL được lựa chọn làm khoảng đường chuẩn làm việc định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn. Việc lựa chọn khoảng đường chuẩn này nhằm đảm bảo nồng độ các dung dịch mẫu sau xử lý nằm trong phạm vi đường chuẩn, đồng thời đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính và độ chính xác của phép định lượng. Đường chuẩn thu được có phương trình $y = 59307x + 3042,6$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$, cho thấy mối tương quan tuyến tính rất chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ vitamin C.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Sắc ký với nồng độ chuẩn vitamin C giảm dần bằng phương pháp đã xây dựng theo đôi chiều cao pic và nhiễu kết luận LOD ($S/N \approx 3$), LOQ ($S/N \approx 10$) của phương pháp. Kết quả thể hiện tại bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định LOD và LOQ

STT	Nồng độ (µg/mL)	Spic (µV.s)	S/N
1	0,1	5890	3,11
2		6268	4,03
3		5731	3,20
4	0,25	15260	10,84
5		14986	9,90
6		15985	11,48



Hình 12. Sắc ký đồ tại LOD (a) và LOQ (b)

Từ kết quả bảng 6 và hình 12 cho thấy tại nồng độ 0,25 µg/mL có S/N khoảng 10, tại nồng độ 0,10 µg/mL có S/N khoảng 3. Do đó LOD, LOQ của phương pháp lần lượt là 0,10 µg/mL và 0,25 µg/mL.

Độ chính xác

Tiến hành tiêm sắc ký 6 lần mẫu thử riêng biệt được

chuẩn bị theo quy trình, xác định hàm lượng vitamin C trong một viên nén sinh tồn. Lặp lại cả quy trình trên vào 2 ngày tiếp theo trên 6 mẫu và quy trình xử lý tương tự (độ chính trung gian). Kết quả RSD (%) về hàm lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn trong 3 ngày liên tiếp của mẫu phân tích được thể hiện ở bảng sau.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ chính xác

Ngày	Mẫu thử	Khối lượng cân (gam)	Spic (µV.s)	Hàm lượng (mg/viên)	Trung bình (mg/viên)	SD	RSD (%)
1	1	1,0035	2666682	3,177	3,164	0,021	0,661
	2	1,0054	2682260	3,190			
	3	1,0076	2670474	3,169			
	4	1,0052	2651942	3,154			
	5	1,0070	2635358	3,129			
	6	1,0043	2659704	3,166			
2	7	1,0025	2700592	3,221	3,179	0,031	0,978
	8	1,0031	2648363	3,157			
	9	1,0068	2672808	3,174			
	10	1,0061	2685455	3,191			
	11	1,0028	2682899	3,199			
	12	1,0056	2636108	3,134			
3	13	1,0058	2662808	3,165	3,174	0,020	0,618
	14	1,0087	2655621	3,148			
	15	1,0026	2676361	3,192			
	16	1,0036	2684761	3,198			
	17	1,0021	2648143	3,159			
	18	1,0058	2675142	3,180			
RSD (%) của 3 ngày							0,751

Bảng 8. Phân tích ANOVA kết quả hàm lượng vitamin C giữa các ngày

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
N1	6	18,985	3,164167	0,00044		
N2	6	19,076	3,179333	0,000968		
N3	6	19,042	3,173667	0,000383		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,000705	2	0,000352	0,590101	0,566637	3,68232
Within Groups	0,008958	15	0,000597			
Total	0,009662	17				

Dựa vào bảng 7 cho thấy kết quả RSD trong ngày và liên ngày (ngày 2, ngày 3) lần lượt là 0,661%; 0,978%; 0,618% (< 2,0%) và RSD của 3 ngày là 0,751% (< 3,0%), phân tích thống kê so sánh giữa các ngày cho $F < F_{crit}$ và giá trị

$P_{value} > 0,05$ (bảng 8) cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, từ đó quy trình định lượng đạt độ chính xác.

Độ đúng

Độ đúng được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vitamin C vào nền mẫu thực viên nén sinh tồn ở các mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ có sẵn trong mẫu thực, mỗi mức thêm chuẩn lặp lại 3 lần xác định độ thu hồi. Kết quả được thể hiện tại bảng 9.

Bảng 9. Kết quả đánh giá độ thu hồi

Mẫu	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Spic ($\mu\text{V.s}$)	Lượng chuẩn tìm lại ($\mu\text{g/mL}$)	Thu hồi (%)	Độ thu hồi trung bình (%)	SD	RSD (%)
80%	37,90	4915968	37,799	99,733	99,650	0,590	0,592
		4926304	37,973	100,193			
		4899998	37,530	99,023			
100%	45,45	5439322	46,623	102,582	101,729	0,829	0,815
		5414981	46,213	101,679			
		5394699	45,871	100,926			
120%	55,10	5955044	55,319	100,398	100,287	1,630	1,626
		5896421	54,331	98,604			
		6002786	56,124	101,859			

Kết quả cho thấy độ thu hồi trung bình ở các mức thêm chuẩn 80%, 100%, 120% lần lượt là 99,650%; 101,729%; 100,287% (nằm trong giới hạn từ 95 – 105%) và có giá trị $\text{RSD}\% < 2,0\%$, cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về đúng.

4. BÀN LUẬN

Vitamin C được định lượng bằng nhiều phương pháp như chuẩn độ, UV-Vis, HPLC và LC-MS/MS. Trong đó, HPLC có ưu điểm về khả năng phân tách và độ chọn lọc, phù hợp với nền mẫu phức tạp. Romeu-Nadal và cộng sự (2006) định lượng vitamin C trong sữa người bằng HPLC với pha động acid acetic 0,1% – methanol (95 : 5, v/v), tốc độ dòng 0,7 mL/phút và thời gian lưu khoảng 3,9 phút [25]. Alhat và Kokate (2019) cũng sử dụng cột C18 (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm) để định lượng vitamin C trong viên sủi, phát hiện tại 255 nm và đạt yêu cầu về độ tuyến tính, độ đúng và độ chính xác [19]. Trong nghiên cứu này, điều kiện được tối ưu với pha động nước chứa 0,1% acid acetic – methanol (90 : 10, v/v), tốc độ dòng 0,5 mL/phút và bước sóng 245 nm. Sự khác biệt về điều kiện sắc ký do đặc điểm nền mẫu viên nén sinh tồn chứa nhiều thành phần như sữa bột tách béo, đường, dầu thực vật, protein, vitamin và khoáng chất.

Về xử lý mẫu, Spínola và cộng sự (2012) sử dụng môi trường acid trong phân tích vitamin C bằng UHPLC-PDA trên nền rau quả, cho thấy việc kiểm soát môi trường acid

có vai trò trong hạn chế sự phân hủy vitamin C [22]. Trong nghiên cứu này, dung dịch 0,1% TFA được lựa chọn làm dung môi chiết do cho hàm lượng vitamin C thu được cao nhất và pic sắc ký cân đối, phù hợp với đặc điểm nền viên nén sinh tồn. Do nền mẫu khác biệt so với các nghiên cứu trước, quy trình xử lý mẫu cần được khảo sát, tối ưu riêng và kết quả nghiên cứu phù hợp với các công bố trước về khả năng áp dụng HPLC để định lượng vitamin C trong các nền mẫu khác nhau.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn bằng HPLC với điều kiện sắc ký gồm cột sắc ký C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μm), pha động hỗn hợp dung dịch acid acetic 0,1% – MeOH (90 : 10, v/v); tốc độ dòng 0,5 mL/phút; thể tích tiêm 10 μL ; nhiệt độ cột 25°C; detector đặt tại bước sóng 245 nm. Mẫu được xử lý bằng chiết siêu âm với dung dịch TFA 0,1% trong 15 phút. Phương pháp được thẩm định với tính tương thích hệ thống; độ đặc hiệu cao; khoảng tuyến tính của phương pháp từ 0,25 – 500 $\mu\text{g/mL}$ cho hệ số $R^2 = 0,9999$; LOD, LOQ của phương pháp lần lượt là 0,10 $\mu\text{g/mL}$ và 0,25 $\mu\text{g/mL}$; độ chính xác cao khi cho giá trị $\text{RSD}\%$ trong ngày và ở các ngày đều nhỏ hơn 2%; độ thu hồi nằm trong giới hạn từ 95 – 105% và có giá trị $\text{RSD}\% < 2,0\%$; cho thấy quy trình phân tích phù hợp để định lượng vitamin C trong viên nén sinh tồn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <https://thesurvivaltabs.com/>.
2. Bộ Y tế (2018), Dược Điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học.
3. Bộ Y tế (2007), Hóa Dược tập 1, Nhà xuất bản Y học.
4. Bộ Y tế (2007), Dược Lý Học tập 2, Nhà xuất bản Y học.
5. Correia, G., & Magina, S. (2023), Efficacy of topical vitamin C in melasma and photoaging: a systematic review, *Journal of cosmetic dermatology*, 22(7), 1938–1945.
6. Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011), Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective, *Free radical biology & medicine*, 51, 1000–1013.
7. N. Smirnoff (2018), Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals, *Elsevier Inc*, 122, 116–129.
8. Feszterová, M., Mišiaková, M., & Kowalska, M. (2023), Bioactive vitamin C content from natural selected fruit juices, *Applied Sciences*, 13(6), 3624.
9. L. T. Abe-Matsumoto, G. R. Sampaio, and D. H. M. Bastos (2020), Is titration as accurate as HPLC for determination of vitamin C in supplements?, *Am J Analyt Chem*, vol. 11, no. 07, pp. 269–279.
10. Sudhir, A., Sowmya, P. T., & Surekha, T. P. (2024), Determination of ascorbic acid in bulk and vitamin-C tablets using manganese in aqueous acidic perchlorate media, *Pharm Pharmacol Int J*, 12(2), 41–43.
11. Sowmya, P. T., Sudhir, A., Rai, K., & Deepakumari, H. N. (2020), Iodometric determination of ascorbic acid in bulk and Vitamin-C tablets using potassium iodate, *Pharmacol. Int. J*, 8, 159–161.
12. De Silva, D. S. P. C. N., Nonis, P. C. M., & Jayasundara, U. K. (2025), Method development and validation of vitamin C formulations using zeroth order uv-visible spectrophotometry, *European Journal of Applied Sciences–Vol*, 13(1).
13. Andaririt, D. R., Purnaningtyas, S. R. D., & Wijayanto, A. (2025), Validation of the uv-vis spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid content in beverage preparations based on a standard vitamin C calibration curve, *Open Access Health Scientific Journal*, 6(2), 249–257.
14. Borrás, E., Schrupf, L., Stephens, N., Weimer, B. C., Davis, C. E., & Schelegle, E. S. (2021), Novel LC-MS-TOF method to detect and quantify ascorbic and uric acid simultaneously in different biological matrices, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1168, 122588.
15. Xing, Y., Zhao, B., Yin, L., Guo, M., Shi, H., Zhu, Z., Zhang, L., He, J., Ling, Y., Gao, M., Lu, H., Mao, E., & Zhang, L. (2021), Vitamin C supplementation is necessary for patients with coronavirus disease: an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry finding, *J Pharm Biomed Anal*, vol. 196, 113927.
16. Kakitani, A., Inoue, T., Matsumoto, K., Watanabe, J., Nagatomi, Y., & Mochizuki, N. (2014), Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS, *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 31(12), 1939–1948.
17. Ibrahim, F., El-Enany, N., El-Shaheny, R. N., & Mikhail, I. E. (2015), Development and validation of a new HPLC method for the simultaneous determination of paracetamol, ascorbic acid, and pseudoephedrine HCl in their co-formulated tablets. application to in vitro dissolution testing, *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 31(9), 943–947.
18. Salah El-Din, S. H., Mahmoud, A. M., & Morsi, A. (2025), Eco-friendly RP-HPLC method for simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in nano-formula and pharmaceutical dosage forms, *BMC chemistry*, 19 (1), 1–9.
19. Alhat Babita, R., & Kokate Shekhar, V. (2019), Method development and validation for simultaneous estimation of l-glutathione and vitamin-C in effervescent tablet by RP-HPLC, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 9, no. 4, pp. 348–353.
20. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2025). ICH Q2(R2)/Q14 - Analytical Procedure Development and Validation, ICH, Geneva.
21. Ismailayli, N., Hermanto, D., Andayani, I. G. A. S., Honiar, R., Zuryati, U. K., Mariana, B., & Shofiyana, L. M. (2020), Determination of ascorbic acid content using the reverse phase–high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method, *Al-kimia*, 8(2), 168–176.
22. Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J. S., & Castilho, P. C. (2012), An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(4), 1049–1058.
23. Yuan, J. P., & Chen, F. (1998), Degradation of ascorbic acid in aqueous solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5078–5082.
24. Wagner, B. A., & Buettner, G. R. (2023), Stability of aqueous solutions of ascorbate for basic research and for intravenous administration, *Advances in redox research*, 9, 100077.
25. Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2006), Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 830(1), 41–46.