

Tổng hợp 4-(trifluoromethyl)anilin (tạp A) và (Z)-2-cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]but-2-enamid (tạp B) của leflunomid

Nguyễn Hồng Thiên Thanh^{1*}, Lê Ngọc Tú¹, Nguyễn Nguyên Trúc¹

¹Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Leflunomid là thuốc được sử dụng điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp từ trung bình đến nặng và viêm khớp vảy nến. Tạp A và tạp B của leflunomid là tạp phân hủy, bắt buộc kiểm nghiệm theo USP 2025 và BP 2025. Tạp A và tạp B chuẩn vẫn chưa có trong danh mục chất chuẩn quốc gia. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu trong nước công bố quy trình tổng hợp các tạp này.

Mục tiêu: Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp A và B của leflunomid.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Tạp A được tổng hợp từ leflunomid bằng phản ứng thủy phân amid. Tạp B được tổng hợp từ leflunomid bằng phản ứng mở vòng isoxazol. Các sản phẩm sau khi tổng hợp được tinh chế; xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm và được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp HPLC-PDA.

Kết quả: Đề tài đã tổng hợp được tạp A và tạp B với hiệu suất lần lượt là 31,2% (1,8 g) và 72,3% (2,0 g). Sản phẩm thu được có độ tinh khiết sắc ký trên 98,5% tính theo nguyên trạng.

Kết luận: Tạp A và tạp B của leflunomid đã được tổng hợp và xác định độ tinh khiết, đạt yêu cầu để thiết lập chất đối chiếu.

Từ khóa: tạp chất liên quan A của leflunomid; tạp chất liên quan B của leflunomid; 4-trifluoromethylanilin; (Z)-2-cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]but-2-enamid

Abstract

SYNTHESIS OF 4-(TRIFLUOROMETHYL)ANILIN (IMPURITY A) AND (Z)-2-CYANO-3-HYDROXY-N-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]BUT-2-ENAMIDE (IMPURITY B) OF LEFLUNOMIDE

Nguyen Hong Thien Thanh, Le Ngoc Tu, Nguyen Nguyen Truc

Background: Leflunomide is a drug used to treat moderate-to-severe rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. Impurities A and B of leflunomide are degradation impurities that must be tested according to current USP and BP. However, the reference standards of these impurities are not yet included in the national list of reference standards. Up to now, there have been no domestic studies published on the

Ngày nhận bài: 23-10-2025 / Ngày chấp nhận đăng bài: 25-12-2025 / Ngày đăng bài: 15-01-2026

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Hồng Thiên Thanh. Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

E-mail: Thanhnguyenhong1199@ump.edu.vn

© 2026 Bản quyền thuộc về Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.

synthesis process of these impurities.

Objectives: To synthesize and determine the purity of impurities A and B of leflunomide.

Methods: Impurity A was synthesized from leflunomide by amide hydrolysis reaction. Impurity B was synthesized from leflunomide by isoxazole ring-opening reaction. These substances were purified by recrystallization method. Their structures were determined by spectroscopic methods and the purity was determined by HPLC-PDA.

Results: Impurities A and B of leflunomide were successfully synthesized with the yields of 31.2% (1.8 g) and 72.3% (2.0 g), respectively. The obtained products had the chromatographic purity of over 98.5% calculated on an "as is" basic.

Conclusion: Impurities A and B of leflunomide were successfully synthesized and determined for purity, met the requirements for use in testing impurities of leflunomide.

Keywords: leflunomide impurity; 4-trifluoromethylaniline; (Z)-2-cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]but-2-enamide

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm khớp dạng thấp là một bệnh lý tự miễn diễn tiến mạn tính phổ biến trên toàn cầu, gây tổn thương tại khớp, ngoài khớp, hay thậm chí là toàn thân ở nhiều mức độ khác nhau [1]. Bệnh có thể dẫn đến tàn phế do tình trạng phá hủy khớp gây nên nếu không được phát hiện sớm, điều trị kịp thời và đúng phác đồ. Hiện nay, trong số các nhóm thuốc điều trị viêm khớp dạng thấp, nhóm DMARDs (disease-modifying anti rheumatic drugs - thuốc chống viêm khớp tác dụng chậm) được xem là lựa chọn ưu tiên trên lâm sàng và leflunomid là một hoạt chất thuộc nhóm này [2]. Trong đa số trường hợp, người bệnh cần phải dùng thuốc trong thời gian dài, hoặc có thể là suốt đời, để kiểm soát bệnh ổn định [3]. Vì vậy, thuốc phải được kiểm nghiệm nghiêm ngặt về hàm lượng được chất và các tạp chất để đảm bảo hiệu quả lâm sàng và an toàn cho bệnh nhân. Hiện nay, Dược điển Anh (BP 2025) và Dược điển Hoa Kỳ (USP 2025) có quy định bắt buộc kiểm nghiệm tạp A và tạp B trong nguyên liệu và thành phẩm chứa leflunomid [4,5], đặc biệt là tạp A vì những độc tính đáng quan tâm trên gen và hệ tạo máu [6,7]. Tuy nhiên, chuẩn tạp A và tạp B vẫn chưa có trong danh mục chất chuẩn đối chiếu quốc gia. Tại Việt Nam, cho đến nay chưa có tác giả nào công bố quy trình tổng hợp tạp A và tạp B của leflunomid. Ở ngoài nước, cho đến nay chưa có quy trình tổng hợp tạp A đi từ nguyên liệu leflunomid được công bố chính thức trên các tạp chí quốc tế. Vào năm 1989, Stahly và Donald [8] đã công bố quy trình tổng hợp tạp A của leflunomid (4-trifluoromethylanilin) đi từ 4-(triethylsiloxy)-4-(trifluoromethyl)-2,5-cyclohexadien-1-on và ethyl

glycinat hydroclorid. Đối với tạp B, trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp B bằng phản ứng mở vòng isoxazol của leflunomid [9-11]. Từ những lý do trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tổng hợp tạp A và tạp B của leflunomid ở quy mô phòng thí nghiệm, xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết sản phẩm tổng hợp bằng phương pháp HPLC-PDA để có thể ứng dụng kiểm nghiệm tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm chứa leflunomid.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tạp A (4-(trifluoromethyl)anilin) và tạp B ((Z)-2-cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]but-2-enamid) của leflunomid.

2.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu leflunomid có số lô F006FPE-23002, hàm lượng 100,7% tính theo nguyên trạng, sản xuất bởi công ty Formosa Laboratories INC - Đài Loan, hạn dùng 20/08/2028.

2.2.2. Dụng cụ và trang thiết bị

Bản mỏng silicagel GF₂₅₄, cân phân tích Sartorius ENTRIS124I-1S, máy khuấy từ gia nhiệt IKA, máy cô quay chân không Buchi R210S, hệ thống HPLC - PDA Waters Alliance e2695, cột sắc ký C₁₈ Knauer (250 × 4,6 mm; 5 μm), máy quang phổ hồng ngoại Bruker, máy quang phổ UV-Vis

Shimadzu UV - 1900i, máy sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ Shimadzu LCMS - IT-TOF, máy cộng hưởng từ hạt nhân 600 MHz Bruker Advance II. Các dụng cụ thủy tinh đạt yêu cầu về độ chính xác sử dụng trong phân tích.

2.2.3. Dung môi và hóa chất

Natri hydroxyd (NaOH), isopropyl alcol, acid hydrochloric (HCl), *n*-hexan, cloroform, dicloromethan, ethanol, toluen, acid acetic, ethyl acetat, *n*-butanol, triethylamin, hydrogen peroxyd và acid phosphoric đạt tiêu chuẩn phân tích (Labchem). Methanol và acetonitril (ACN) đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng (Merck).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tổng hợp và tinh chế tạp A của leflunomid

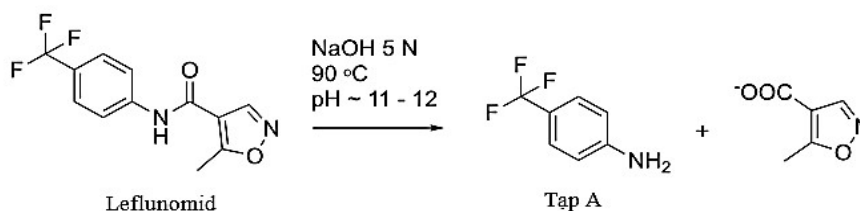
Quy trình tổng hợp tạp A của leflunomid theo Stahly và Donald [8] sử dụng những nguyên liệu khó tìm như 4-(triethylsiloxy)-4-(trifluoromethyl)-2,5-cyclohexadien-1-on hay ethyl glycinat hydroclorid, việc tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng điều chế có hạn chế nhất định khi không tiến hành được với lượng lớn,

khả năng điều chế phụ thuộc nhiều vào chất lượng bản mỏng và hệ dung môi khai triển, dung môi phản hấp phụ. Dựa trên cơ chế phản ứng, đề tài đã đưa ra quy trình tổng hợp tạp A như sau:

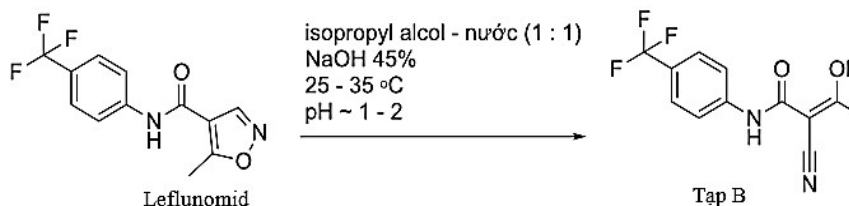
4-(Trifluoromethyl)anilin được tổng hợp dựa trên phản ứng thủy phân amid của leflunomid trong môi trường kiềm (Hình 1). Trong khi tổng hợp, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng được khảo sát như nồng độ natri hydroxyd tham gia phản ứng, nhiệt độ phản ứng và pH kiềm hóa. Sản phẩm thô được tinh chế thu được sản phẩm, kí hiệu là A.

2.3.2. Tổng hợp và tinh chế tạp B của leflunomid

Dựa theo nghiên cứu của Ching-Peng Wei và cộng sự [9], tạp B được tổng hợp bằng phản ứng mở vòng isoxazol của leflunomid trong môi trường kiềm (Hình 2). Trong khi tổng hợp, tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng như nồng độ natri hydroxyd tham gia phản ứng, nhiệt độ phản ứng và pH acid hóa. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong dung môi thu được sản phẩm, kí hiệu là B.



Hình 1. Sơ đồ phản ứng tổng hợp tạp A



Hình 2. Sơ đồ phản ứng tổng hợp tạp B

2.3.3. Thử tinh khiết sơ bộ các sản phẩm tổng hợp

Các sản phẩm sau khi tinh chế được sơ bộ kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, tiến hành trên bản mỏng silicagel GF₂₅₄ với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau, quan sát bản mỏng dưới đèn UV 254 nm.

Sản phẩm A được kiểm tra với 3 hệ dung môi là: Hệ 1: *n*-hexan - toluen - cloroform (4 : 4 : 2), hệ 2: toluen - cloroform (4 : 6), hệ 3: toluen - cloroform (1 : 9). Sản phẩm B được kiểm tra với 3 hệ dung môi là: Hệ 1: Toluene - methanol - acid acetic (75 : 25 : 0,05), hệ 2: Methanol - ethyl acetat - triethylamin (25 : 70 : 5), hệ 3: *n*-butanol - nước - acid acetic (4 : 5 : 1).

Các sản phẩm sau đó được kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đầu dò PDA, với các điều kiện sắc ký như sau: Cột Kauner C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm); đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 245 nm (sản phẩm A) và 292 nm (sản phẩm B); tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; nhiệt độ cột: 35 °C; thể tích tiêm mẫu: 10 µL; dung môi pha mẫu: methanol; nồng độ mẫu thử: 250 µg/ml trong dung môi pha mẫu. Chương trình dung môi gradient với hệ pha động như ở Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient pha động thử tinh khiết sản phẩm tổng hợp

Thời gian (phút)	Pha động 1		Pha động 2	
	Methanol (%)	Pha động A* (%)	Acetonitril (%)	Pha động A* (%)
0	0	100	0	100
60	100	0	100	0

* Sản phẩm A: Pha động A là dung dịch acid phosphoric pH 4,0

Sản phẩm B: Pha động A là dung dịch acid phosphoric pH 4,5

2.3.4. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp A và B

Cấu trúc của các sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ nghiệm, bao gồm UV, IR, MS, và NMR, đồng thời so sánh kết quả phổ nghiệm với tài liệu tham khảo.

2.3.5. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B bằng HPLC - PDA

Độ tinh khiết của tạp A và tạp B được xác định bằng phương pháp HPLC-PDA quy về 100% diện tích pic với điều kiện sắc ký giống như mục 2.3.3, nhưng với chương trình gradient rút gọn theo pha động 2 (với tạp A) và pha động 1 (với tạp B). Các quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [10]. Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian).

3. KẾT QUẢ

3.1. Tổng hợp và tinh chế tạp A của leflunomid

3.1.1. Khảo sát điều kiện tổng hợp

Kết quả khảo sát nồng độ NaOH sử dụng trong phản ứng thủy phân được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Điều kiện phản ứng	Nồng độ NaOH (N)	Nhiệt độ phản ứng (°C)	Thời gian phản ứng (giờ)
1	0,1 N	Nhiệt độ phòng	> 14 giờ
2	1 N		10 giờ
3	5 N		8 giờ

Nhận xét: Khi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhận thấy ở nồng độ NaOH 5 N cho thời gian thủy phân hoàn toàn nguyên liệu leflunomid và hỗn hợp sau phản ứng cho vết khác vết nguyên liệu (theo dõi bằng SKLM) là ngắn nhất. Do đó, nồng độ NaOH 5 N được lựa chọn để tiến hành phản ứng thủy phân.

Tiếp theo, nhiệt độ được tiến hành khảo sát với yếu tố cố định là NaOH 5 N, kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Điều kiện phản ứng	Nồng độ NaOH (N)	Nhiệt độ phản ứng (°C)	Thời gian phản ứng (giờ)
1	5 N	Nhiệt độ phòng	8 giờ
2		60 °C	5 giờ
3		90 °C	3 giờ

Nhận xét: Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ phòng, phản ứng xảy ra rất chậm, tốc độ phản ứng tăng lên khi nhiệt độ tăng đến 90 °C. Do đó, phản ứng được lựa chọn tiến hành ở 90 °C.

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của pH kiềm hóa lên hiệu suất sản phẩm thô (yếu tố cố định: NaOH 5 N, nhiệt độ phản ứng 90 °C), kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Khảo sát ảnh hưởng của pH kiềm hoá

Điều kiện phản ứng	Nồng độ NaOH (N)	pH	Hiệu suất sản phẩm thô
1	5 N	8 - 9	8,2%
2		9 - 10	25,7%
3		10 - 11	54,5%
4		11 - 12	58,4%
5		12 - 13	57,9%
6		13 - 14	58,1%

Nhận xét: Khi khảo sát ảnh hưởng của pH kiềm hóa lên hiệu suất sản phẩm thô, nhận thấy ở khoảng pH 11 - 14, hiệu

sau sản phẩm thô gần như bằng nhau, cao nhất là pH 11 - 12 (58,4%). Do đó, dịch sau khi acid hóa được tiến hành kiểm hóa đến pH 11 - 12 bằng NaOH 5 N.

3.1.2. Tổng hợp tạp A

Từ những kết quả đã khảo sát, quy trình tổng hợp tạp A ở quy mô phòng thí nghiệm được đề xuất như sau: Cân 0,54 g (2 mmol) leflunomid, thêm 5 ml methanol và 5 ml nước, khuấy trên máy khuấy từ đến khi hoạt chất tan hoàn toàn trong dung môi. Thêm 25 ml dung dịch NaOH 5 N vào hỗn hợp trên, gia nhiệt, đun hồi lưu ở 90 °C trong 3 giờ. Hỗn hợp sau phản ứng được để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm từ từ acid hydrochloric đậm đặc cho đến khi hỗn hợp đạt pH 1 - 2, xuất hiện kết tủa. Lọc loại bỏ tủa, thu lấy dịch lọc. Dịch lọc được kiểm hóa bằng NaOH 5 N đến pH 11 - 12, cô thu hồi dung môi đến khi xuất hiện lớp chất lỏng màu vàng nhạt. Chiết phân bố lỏng - lỏng 3 lần, mỗi lần với 10 ml dicloromethan. Gộp chung các lớp hữu cơ, làm khan bằng natri sulfat khan. Cô thu hồi dung môi hữu cơ, thu được 0,181 g sản phẩm thô. Sản phẩm thô được hòa vào dicloromethan nóng, sau đó làm lạnh đến 10 - 15 °C trong 6 giờ. Lọc dưới áp suất giảm thu dịch lọc. Cô thu hồi dung môi của dịch lọc, lặp lại quy trình tinh chế nhiều lần, thu được sản phẩm tinh chế A là chất lỏng màu vàng nhạt, trong suốt, khối lượng 0,103 g. Tiến hành tổng hợp và tinh chế lặp lại theo quy trình 3 lần, hiệu suất toàn quá trình trung bình đạt 31,2%.

3.2. Tổng hợp và tinh chế tạp B của leflunomid

3.2.1. Khảo sát điều kiện tổng hợp

Kết quả khảo sát nồng độ NaOH sử dụng trong phản ứng thủy phân được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Điều kiện phản ứng	Nồng độ NaOH (%)	Nhiệt độ phản ứng (°C)	Thời gian phản ứng (giờ)
1	15%	25 - 35 °C	2
2	30%		1
3	45%		0,5

Nhận xét: Nồng độ NaOH 45% cho thời gian phân hủy hoàn toàn nguyên liệu leflunomid (theo dõi bằng SKLM) là ngắn nhất (0,5 giờ). Vì vậy, nồng độ NaOH được lựa chọn để tiến hành phản ứng thủy phân là NaOH 45%.

Tiếp theo, nhiệt độ được tiến hành khảo sát với yếu tố cố định là NaOH 45%, kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Điều kiện phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian phản ứng (phút)	Kết quả khảo sát trên SKLM
1	0 - 5	60	Còn vết nguyên liệu
2	25 - 35	30	Vết nguyên liệu hết
3	70	20	Có vết phụ

Nhận xét: Tại nhiệt độ 0 - 5 °C tốc độ phản ứng thủy phân xảy ra rất chậm (60 phút). Tốc độ tăng lên khi tăng nhiệt độ lên 70 °C, tuy nhiên có sản phẩm phụ. Vì vậy, phản ứng thủy phân leflunomid được lựa chọn tiến hành ở nhiệt độ 25 - 35 °C.

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của pH acid hóa lên hiệu suất sản phẩm thô (yếu tố cố định: nồng độ NaOH 45%, nhiệt độ phản ứng 25 - 35 °C), kết quả được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Khảo sát ảnh hưởng của pH acid hóa

Điều kiện phản ứng	Nồng độ HCl (%)	pH acid hoá	Hiệu suất sản phẩm thô
1	32%	1 - 2	88,7%
2		3 - 4	80,2%
3		5 - 6	61,6%

Nhận xét: Khi tiến hành khảo ảnh hưởng của pH acid hóa lên hiệu suất sản phẩm thô, ở khoảng pH 1 - 2 cho hiệu suất cao nhất. Vì vậy, phản ứng tổng hợp được lựa chọn tiến hành ở pH 1 - 2.

3.2.2. Tổng hợp tạp B

Từ những kết quả đã khảo sát, quy trình tổng hợp tạp B ở quy mô phòng thí nghiệm được đề xuất như sau: Cân 0,54 g (2 mmol) leflunomid, thêm 20 ml dung dịch isopropyl alcol (isopropyl alcol : nước = 5 : 5 (tt/tt)), khuấy trên máy khuấy từ ở nhiệt độ 25 - 35 °C đến khi hoạt chất tan hoàn toàn. Thêm từ từ 3 ml dung dịch NaOH 45% vào hỗn hợp trên cho đến khi đạt đến pH là 12 ± 1, khuấy đều trong 30 phút. Sau thời gian phản ứng, lọc hỗn hợp qua giấy lọc, thêm từ từ acid HCl 32% vào dịch lọc cho đến khi đạt được pH 1 - 2, quan sát thấy xuất hiện kết tủa. Kết tủa tạo thành được lọc, rửa bằng nước và sấy khô để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại với dung môi ethyl acetat, thu được sản phẩm

tinh chế B là tinh thể màu trắng, sấy đến khối lượng không đổi thu được khối lượng là 0,394 g. Tiến hành tổng hợp và tinh chế lặp lại theo quy trình 3 lần, hiệu suất toàn quá trình trung bình đạt 72,3%.

3.3. Thử tinh khiết sơ bộ các sản phẩm tổng hợp

Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi đều cho một vết duy nhất khác vết nguyên liệu khi quan sát dưới đèn UV 254 nm. Kết quả thử tinh khiết bằng phương pháp HPLC - PDA cho thấy ở cả 2 hệ pha động, sắc ký đồ 2 chiều tại bước sóng 245 nm (sản phẩm A), 292 nm (sản phẩm B) và sắc ký đồ 3 chiều đều xuất hiện 1 pic chính duy nhất và pic này tinh khiết theo phổ UV - Vis. Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế bằng HPLC - PDA được trình bày ở Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả đánh giá độ tinh khiết sản phẩm tinh chế bằng HPLC - PDA

Sản phẩm tinh chế	Hệ pha động	Thời gian lưu (phút)	Độ tinh khiết pic	Diện tích pic ($\mu\text{V} \times \text{giây}$)	% Diện tích pic (%)	Hệ số kéo đuôi
A	1	39,14	Đạt	12138437	99,34	1,1
	2	32,55	Đạt	12970635	99,45	1,2
B	1	31,45	Đạt	6172851	100,00	1,0
	2	20,20	Đạt	6117320	98,76	0,7

3.4. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

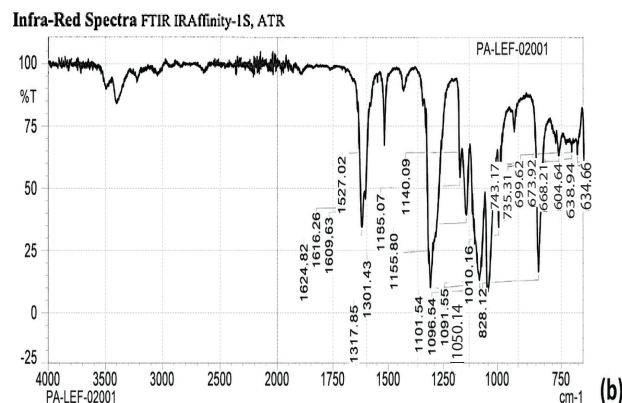
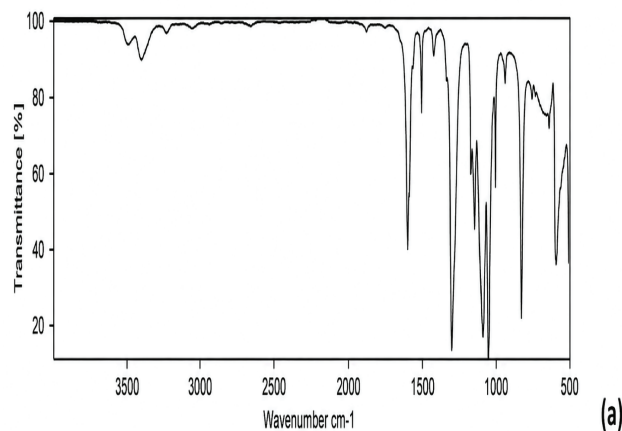
3.4.1. Sản phẩm A

Phổ UV của sản phẩm A trong dung môi methanol cho cực đại tại các bước sóng 202,5; 251 và 288 nm. Phổ FT-IR ν_{max} (cm^{-1}) có các đỉnh đặc trưng cho các nhóm chức phù hợp với công thức cấu tạo của tạp A chuẩn [11] (Hình 3): $-\text{NH}_2$ (3399 và 1625), C-N (1317), C-F (1184, 1156, 1098, 1060 và 1010), $-\text{CH=}$ nhân thơm thế para (828). Phổ khối MS – ESI (+) của sản phẩm tinh chế A cho mảnh tín hiệu ion $[\text{M}-\text{H}]^+$ có $m/z = 162,0497$ phù hợp với số khối lý thuyết cũng như công thức phân tử của tạp A ($\text{C}_7\text{H}_6\text{F}_3\text{N}$, $M = 161,0451$).

Phổ ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 7,37 (*d*, 2H, $J = 8,4$ Hz, H4, H6); 6,65 (*d*, 2H, $J = 8,4$ Hz, H3, H7), 3,90 (*s*, 2H, H1) (Hình 4); phù hợp dữ liệu phổ ^1H -NMR của 4-(trifluoromethyl)anilin [12].

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 149,47 (C2); 126,7 (*q*, $J = 4$ Hz, C4 và C6); 124,9 (*q*, $J = 270$ Hz, C8); 120,1 (*q*, $J = 33$ Hz, C5); 114,19 (C3 và C7) (Hình 4); phù hợp dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của 4-(trifluoromethyl)anilin [12].

Từ những dữ liệu về phổ UV, IR, MS, NMR, có thể khẳng định sản phẩm A chính là tạp A của leflunomid (Hình 5).



Hình 3. Phổ IR của sản phẩm A (Hình a) so sánh với phổ IR của chuẩn tạp A (Hình b)

3.4.2. Sản phẩm B

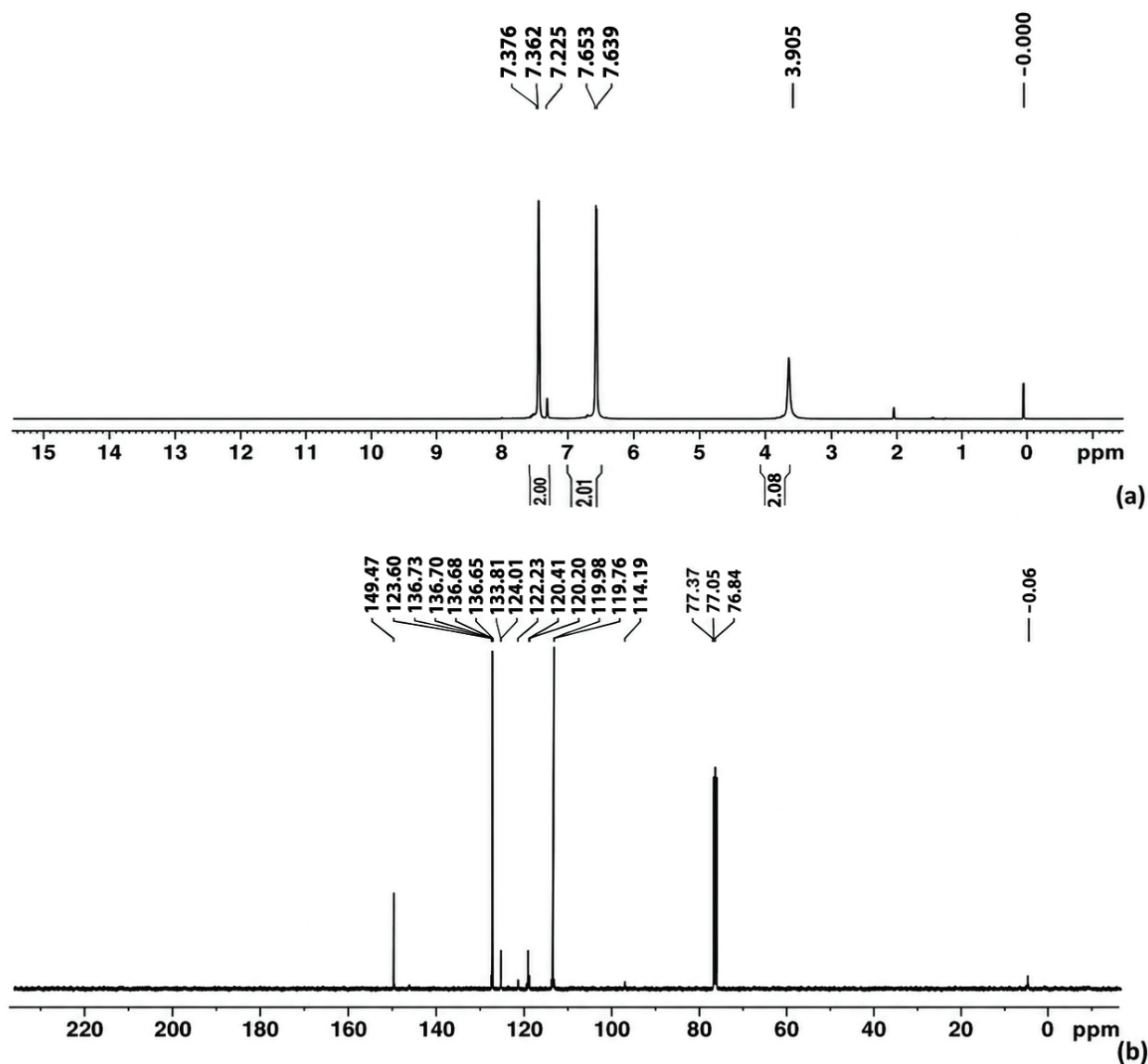
Phổ UV của sản phẩm B trong dung môi methanol cho cực đại tại các bước sóng 203; 246 và 292 nm. Phổ FT-IR ν_{max} (cm^{-1}) có các đỉnh đặc trưng cho các nhóm chức phù hợp với công thức cấu tạo của tạp B chuẩn [13-14] (Hình 6): N-H (3302), $\text{C}\equiv\text{N}$ (2222), $>\text{C=O}$ (1589), C-N (1404), C-F (1319), $-\text{CH=}$ nhân thơm thế para (840 và 678). Phổ khối MS - ESI (+) của sản phẩm tinh chế B cho mảnh tín hiệu ion $[\text{M}-\text{H}]^+$ có $m/z = 271,0665$ phù hợp với số khối lý thuyết cũng như công thức phân tử của tạp B ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2\text{F}_3\text{N}_2$, $M = 270,0614$).

Phổ ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_{H} (ppm): 10,74 (s, 1H); 7,78 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H6, H10); 7,67 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H7, H9); 2,28 (s, 3H, H1) (Hình 7); phù hợp dữ liệu phổ ^1H -NMR chuẩn của tạp B theo TLTK [14].

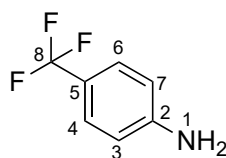
Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_{C} (ppm): 186,98 (C2); 166,39 (C4); 141,56 (C5), 125,80 (C7 và

C9), 125,20 (C8), 123,40 (C11), 120,99 (C6 và C10), 118,20 (C12), 80,80 (C3), 23,08 (C1) (Hình 7); phù hợp dữ liệu phổ ^{13}C -NMR chuẩn của tạp B theo TLTK [14].

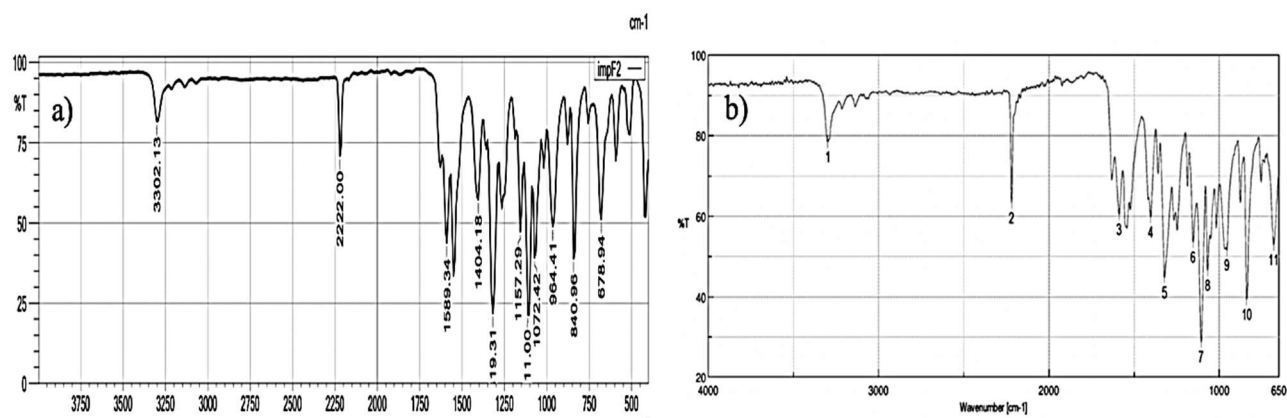
Từ những dữ liệu về phổ UV, IR, MS, NMR, có thể khẳng định sản phẩm B chính là tạp B của leflunomid (Hình 8).



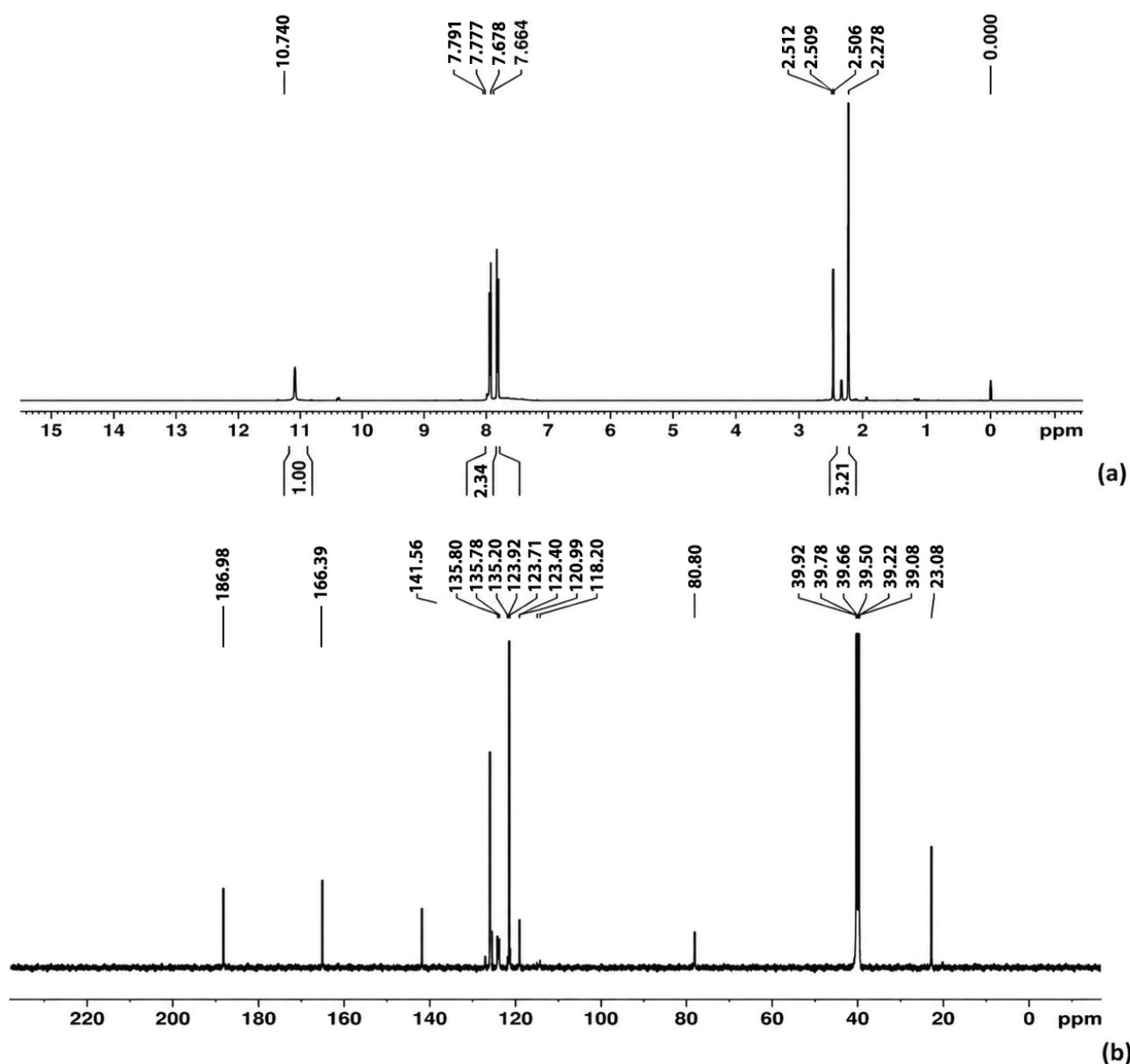
Hình 4. Phổ ^1H -NMR (hình a) và ^{13}C -NMR (Hình b) của sản phẩm A



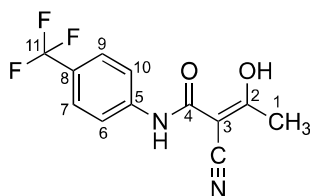
Hình 5. Công thức cấu tạo kèm theo vị trí nguyên tử tạp A của leflunomid



Hình 6. Phổ IR của sản phẩm B (Hình a) so sánh với phổ IR của chuẩn tập B (Hình b)



Hình 7. Phổ ¹H-NMR (Hình a) và ¹³C-NMR (Hình b) của sản phẩm B



Hình 8. Công thức cấu tạo kèm theo vị trí nguyên tử tập B của leflunomid

3.5. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tập A và tập B bằng HPLC – PDA

Quy trình xác định độ tinh khiết tập A và tập B bằng HPLC - PDA được thẩm định với chương trình gradient rút gọn ở Bảng 9 (tập A) và Bảng 10 (tập B).

Bảng 9. Chương trình gradient xác định độ tinh khiết tập A

Thời gian (phút)	ACN (%)	Dung dịch H ₃ PO ₄ pH 4 (%)
0	0	100
5	55	45
15	55	45
20	0	100
30	0	100

Bảng 10. Chương trình gradient xác định độ tinh khiết tập B

Thời gian (phút)	Methanol (%)	Dung dịch H ₃ PO ₄ pH 4,5 (%)
0	0	100
5	55	45
15	55	45
20	0	100

Kết quả thẩm định được thể hiện ở Bảng 11, Bảng 12, Hình 9 và Hình 10.

3.5.1. Tính phù hợp hệ thống

Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống cho thấy RSD của thời gian lưu, diện tích pic đều nhỏ hơn 2,0%, hệ số kéo đuôi

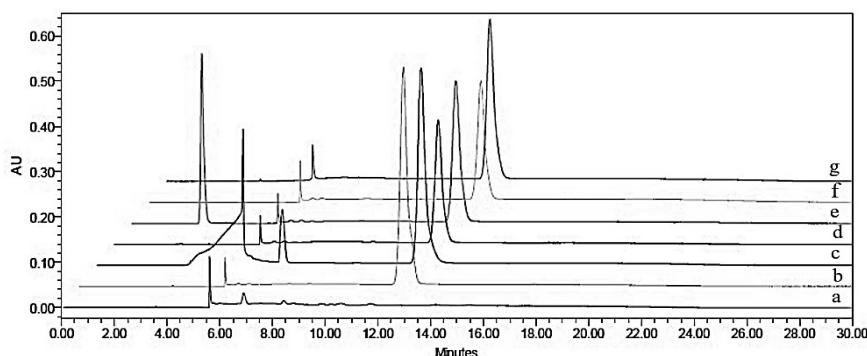
của pic tập A và pic tập B đều nhỏ hơn 1,5 (Bảng 11). Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết tập A và tập B đạt tính phù hợp hệ thống.

Bảng 11. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n = 6)

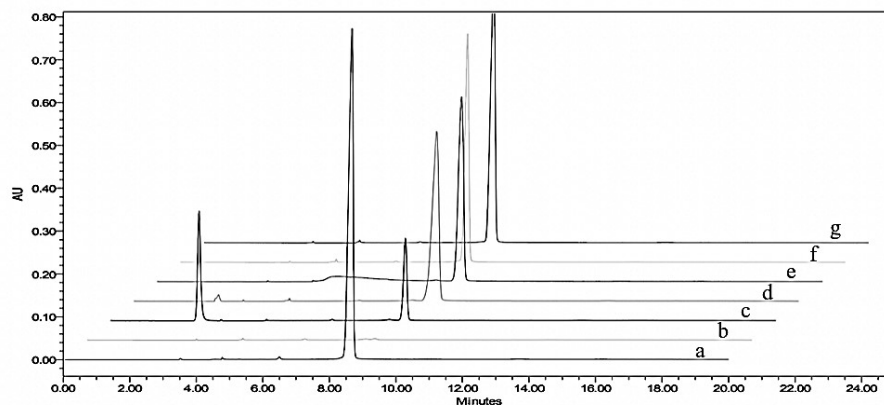
	Giá trị thống kê	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (μV x giây)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số kéo đuôi
Tập A	TB	12,336	9049798	10663	1,32
	RSD	0,1%	1,5%		
Tập B	TB	8,786	7186495	15904	-
	RSD	1,5%	1,6%		

3.5.2. Độ đặc hiệu

Kết quả khảo sát độ đặc hiệu cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic tạp trên sắc ký đồ mẫu thử. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy (trong NaOH 0,1 N/ 24 giờ; trong HCl 0,1 N/ 24 giờ, trong H₂O₂ 3%/ 8 giờ; sấy 60 °C/ 24 giờ, tiếp xúc ánh sáng mặt trời trong 8 giờ) có xuất hiện các pic phân hủy, các pic này đều tách hoàn toàn với pic tạp. Pic tạp trong sắc ký đồ của mẫu thử và các mẫu phân hủy đều tinh khiết theo phổ UV-Vis (Hình 9 và 10). Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết tập A và tập B đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.



Hình 9. Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết tập A tại bước sóng 245 nm trên các mẫu phân hủy a) mẫu trắng, b) mẫu thử, c) mẫu phân hủy base, d) mẫu phân hủy acid, e) mẫu oxy hoá, f) mẫu phân hủy nhiệt độ, g) mẫu phân hủy ánh sáng



Hình 10. Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết tạp B tại bước sóng 292 nm trên các mẫu phân hủy a) mẫu thử, b) mẫu trắng, c) mẫu oxy hoá, d) mẫu phân hủy acid, e) mẫu phân hủy base, f) mẫu phân hủy nhiệt độ, g) mẫu phân hủy ánh sáng

3.5.3. Độ tuyến tính và độ chính xác

Kết quả thẩm định độ tuyến tính và độ chính xác được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12. Kết quả khảo sát độ tuyến tính và độ chính xác

	Tạp A	Tạp B
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 49862,516x$	$\hat{y} = 54664x$
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	150 - 350	50 - 300
Hệ số tương quan r	0,999	0,9999
Độ chính xác (TB $\pm$ RSD, n = 6)	99,53% $\pm$ 0,10%	98,81% $\pm$ 0,37%
Độ chính xác trung gian (TB $\pm$ RSD, n = 6)	99,42% $\pm$ 0,10%	98,90% $\pm$ 0,30%
Độ tinh khiết (TB $\pm$ RSD) (n = 12)	99,48% $\pm$ 0,10%	98,85% $\pm$ 0,33%

Kết quả cho thấy quy trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B bằng HPLC - PDA có khoảng tuyến tính rộng, hệ số tương quan cao, độ chính xác đạt yêu cầu. Kết quả xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B theo phương pháp quy về 100% diện tích pic là trên 98,5% tính trên nguyên trạng.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tổng hợp và xác định cấu trúc tạp A của leflunomid

Phương trình tổng hợp tạp A dựa trên cơ sở phản ứng thủy phân liên kết amid của nguyên liệu leflunomid bằng tác nhân natri hydroxyd. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng như nồng độ NaOH (0,1 N đến 5 N), nhiệt độ (nhiệt độ phòng đến 90 °C), pH kiềm hóa (8 đến 14) và lựa chọn điều kiện tối ưu dựa theo hiệu suất phản ứng.

Cơ chế của phản ứng thủy phân liên kết amid trong môi trường kiềm được đề xuất dựa trên cơ chế phản ứng thế ái nhân acyl, gồm 3 giai đoạn. Giai đoạn đầu tiên, OH^- hoạt động như một tác nhân ái nhân mạnh, tấn công vào vị trí carbon ái điện tử của nhóm carbonyl, khi liên kết giữa nhóm $-\text{OH}$ và C được hình thành, liên kết π của nhóm carbonyl sẽ bị phá vỡ làm dịch chuyển các electron đến nguyên tử oxy và hình thành trạng thái trung gian tứ điện. Giai đoạn đầu tiên của phản ứng xảy ra chậm và là giai đoạn quyết định tốc độ phản ứng. Vì OH^- là tác nhân tấn công trực tiếp vào carbon ái điện tử của nhóm $\text{C}=\text{O}$, do đó tốc độ phản ứng của giai đoạn này sẽ phụ thuộc nhiều vào nồng độ OH^- và nhiệt độ để thúc đẩy phản ứng.

Giai đoạn tiếp theo, nguyên tử oxy sẽ giải tỏa điện tích âm bằng cách tái tạo liên kết đôi $\text{C}=\text{O}$, bắt buộc liên kết với nguyên tử nitơ bị phá vỡ, dẫn đến hình thành acid carboxylic. Với trường hợp của leflunomid, nhóm amin bị hút điện tử bởi hiệu ứng cảm lẫn hiệu ứng liên hợp từ nhóm benzotrifluorid ($-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CF}_3$), dẫn đến tính base giảm, trở thành nhóm xuất tốt hơn. Do đó, điều kiện nhiệt độ và thời gian phản ứng không cần phải quá khắc nghiệt như thông thường.

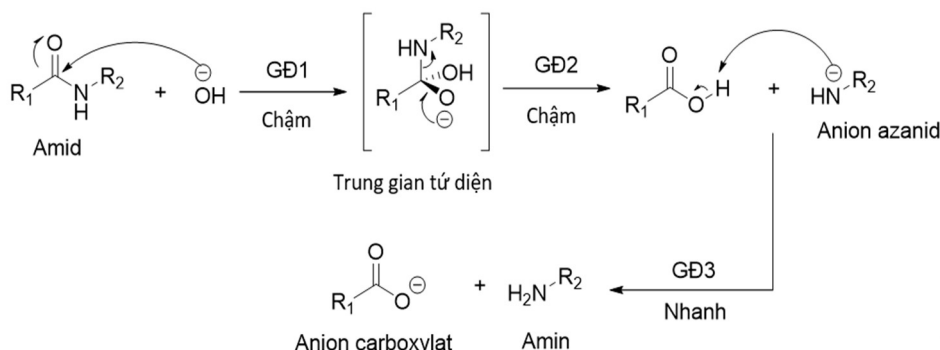
Giai đoạn 1 và 2 sẽ diễn ra càng nhanh khi nồng độ OH^- càng lớn và nhiệt độ càng cao. Nồng độ OH^- cao sẽ làm tăng tốc độ giai đoạn 1, đồng thời làm giảm tính cạnh tranh xuất của nhóm $-\text{OH}$ ở giai đoạn 2. Nhiệt độ cao sẽ làm cho các liên kết trở nên linh động, các electron dễ dàng dịch chuyển hơn. Như vậy, có thể kết luận được, ở quy mô hiện tại, việc sử dụng NaOH nồng độ 5 N và nhiệt độ 90 °C là phù hợp với lý thuyết phản ứng thủy phân amid.

Giai đoạn cuối cùng, anion azanid (NH^-) đóng vai trò như một base, tương tác với hydro linh động của acid carboxylic, hình thành anion carboxylat và amin. Ba giai đoạn trong cơ chế phản ứng thủy phân liên kết amid được thể hiện ở Hình 11.

Trong môi trường kiềm, bên cạnh phản ứng thủy phân amid, còn có thể xảy ra phản ứng mở vòng isoxazol tạo thành (Z)-2-cyano-3-hydroxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl) but-2-enamid (tạp B). Do đó, bước acid hóa trong quy trình tổng hợp là để kết tủa và loại hợp chất này ra khỏi hỗn hợp sau phản ứng. Ngoài ra, chính phản ứng mở vòng isoxazol

gây cạnh tranh với phản ứng thủy phân amid, là nguyên nhân chính dẫn đến hiệu suất tổng hợp tạp A thấp, vì mở vòng isoxazol dễ dàng hơn nhiều so với thủy phân amid.

Theo lý thuyết, tạp A có tính kiềm rất yếu. Do đó, acid liên hợp của tạp A (dạng muối clorid) sẽ có tính acid mạnh. Vì vậy, phải sử dụng một base đủ mạnh để có thể chuyển dạng muối thành dạng base với hiệu suất tốt nhất có thể. Ngoài ra, base mạnh cũng là một yếu tố cần thiết để chuyển hợp chất 5-methylisoxazol carboxylic acid thành dạng muối dễ tan trong nước, giảm độ tan trong dung môi hữu cơ.

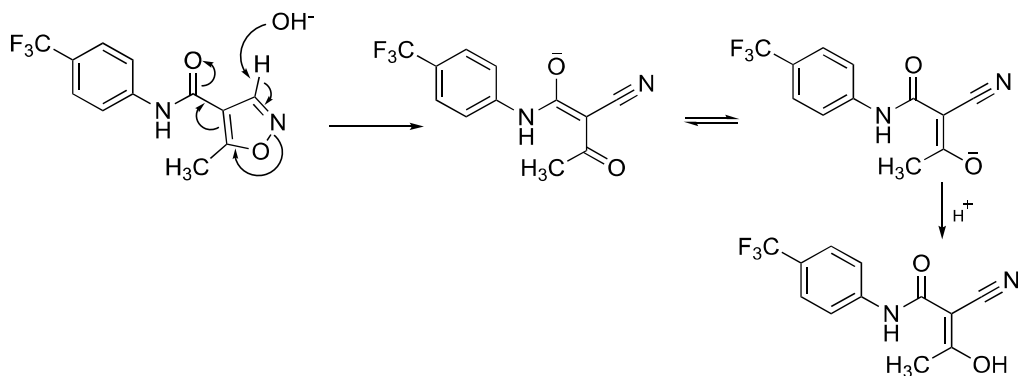


Hình 11. Cơ chế phản ứng thủy phân amid

4.2. Tổng hợp tạp B của leflunomid

Phản ứng tổng hợp tạp B của leflunomid xảy ra dựa trên cơ chế phản ứng tách loại lưỡng phân tử (E2) trên vòng isoxazol. Từ tham khảo tài liệu [15], nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng như nồng độ

NaOH (15% đến 45%), nhiệt độ (0 - 5 đến 70 $^{\circ}\text{C}$), pH acid hóa (1 - 2 đến 5 - 6). Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ NaOH và nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến thời gian phản ứng xảy ra hoàn toàn, pH acid hóa có ảnh hưởng đến hiệu suất sản phẩm thô. Cơ chế phản ứng đề nghị được minh họa ở Hình 12.



Hình 12. Cơ chế phản ứng đề nghị

Ban đầu, với sự có mặt của natri hydroxid và isopropyl alcohol, trong dung dịch sẽ xuất hiện ion isopropylat ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}^-$) có tính base mạnh hơn cả ion OH^- nhưng lại có tính ái nhân kém hơn do sự cộng kênh về mặt không gian. Do đó, phản

ứng sẽ ưu tiên theo cơ chế tách loại hơn là cơ chế thế ái nhân. Thêm vào đó, O trên vòng isoxazol không phải là nhóm xuất quá tốt để có thể dễ dàng rời đi, ngoài ra, nếu O trong liên kết N-O trên vòng isoxazol tách ra để tạo dạng cation trên N,

thì dạng cation này cũng kém bền vững do N và O ở quá gần nhau về mặt lập thể sẽ sớm liên kết đóng vòng trở lại, nên cơ chế tách đơn phân tử (E1) không được ưu tiên, mà sẽ ưu tiên theo cơ chế E2. Trong E2, các giai đoạn của phản ứng diễn ra đồng thời, ion isopropylat đóng vai trò là một base, cho điện tử vào H ở vị trí số 3 của vòng, cặp electron liên kết C-H dao động lân cận với N, tấn công vào N làm cho N có 10 electron ở lớp ngoài cùng nên bắt buộc liên kết N-O phải tách ra để đảm bảo sự bền vững theo quy tắc bát tử và O phải rời đi cùng với cặp electron liên kết. Trạng thái chuyển tiếp được hình thành. Trạng thái này khá ổn định vì các nhóm mang điện tích nằm ở dạng trans nên không có sự tương tác với nhau. Sản phẩm cuối tạo thành có dạng cyanoenolat, sau khi acid hóa sẽ trở thành dạng enol (tạp B) không tan trong dung môi.

5. KẾT LUẬN

Đề tài đã tổng hợp thành công tạp A và tạp B của leflunomid ở quy mô phòng thí nghiệm, hiệu suất trung bình là 31,2% (với tạp A, tổng khối lượng 1,8 g), và 72,3% (với tạp B, tổng khối lượng 2 g); độ tinh khiết sắc ký lần lượt là 99,5% (tạp A) và 98,9% (tạp B) tính theo nguyên trạng. Cả hai tạp đều có thể được sử dụng để thiết lập tạp chất đối chiếu nhằm ứng dụng trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của leflunomid.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự tài trợ bởi của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh cho đề tài NCKH cấp cơ sở “Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất đối chiếu A và B của Leflunomid” theo hợp đồng số 199/2024/HĐ-ĐHYD, ngày 22 tháng 08 năm 2024.

Nguồn tài trợ

Nghiên cứu nhận được kinh phí tài trợ từ Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 199/2024/HĐ-ĐHYD, ngày 22 tháng 08 năm 2024.

Xung đột lợi ích

Không có xung đột lợi ích nào liên quan đến nghiên cứu này.

ORCID

Nguyễn Hồng Thiên Thanh

<https://orcid.org/0009-0003-3463-2604>

Đóng góp của các tác giả

Ý tưởng nghiên cứu: Lê Ngọc Tú.

Đề cương và phương pháp nghiên cứu: Nguyễn Hồng Thiên Thanh.

Thu thập dữ liệu: Nguyễn Hồng Thiên Thanh.

Giám sát nghiên cứu: Nguyễn Hồng Thiên Thanh, Lê Ngọc Tú.

Nhập dữ liệu: Nguyễn Nguyên Trúc.

Quản lý dữ liệu: Nguyễn Hồng Thiên Thanh.

Phân tích dữ liệu: Nguyễn Hồng Thiên Thanh.

Viết bản thảo đầu tiên: Nguyễn Nguyên Trúc, Nguyễn Hồng Thiên Thanh.

Góp ý bản thảo và đồng ý cho đăng bài: Nguyễn Hồng Thiên Thanh, Lê Ngọc Tú.

Cung cấp dữ liệu và thông tin nghiên cứu

Tác giả liên hệ sẽ cung cấp dữ liệu nếu có yêu cầu từ Ban biên tập.

Chấp thuận của Hội đồng Đạo đức

Nghiên cứu này miễn trừ Hội đồng Đạo đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wolff D. Rheumatoid Arthritis. xPharm: The comprehensive pharmacology reference, 1st. USA: Elsevier Masson; 2008. p.1-11.
2. Conley B, Bunzli S, Bullen J, O'Brien P, Persaud J, Gunatillake T, et al. What are the core recommendations for rheumatoid arthritis care? Systematic review of clinical practice guidelines. Clinical rheumatology. 2023;42(9):2267-78.
3. Rheumatoid arthritis. World Health Organization website. [cited 2025 Oct 15]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rheumatoid-arthritis>.
4. The Stationery Office British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia: Leflunomide, Leflunomide tablets. The Stationery Office British Pharmacopoeia Commission; 2024.

5. The United States Pharmacopeia. Leflunomide, Leflunomide tablets, Leflunomide compounded oral suspension. USA: The United States Pharmacopeial Convention; 2025.
6. Seifert J, Mostecká H, Kolar GF. Trifluoromethylanilines - their effect on DNA synthesis and proliferative activity in parenchymal organs of rats. *Toxicology*. 1993;83(1-3):49-59.
7. Šebestová L, Seifert J, Jiříčka Z, Kolar GF. Effects of trifluoromethylaniline isomers on enzyme activities in lymphatic organs and hematology of the rat. *Toxicology*. 1994;92(1-3):27-38.
8. Stahly GP, Bell DR. A new method for synthesis of trifluoromethyl-substituted phenols and anilines. *The Journal of Organic Chemistry*. 1989;54(12):2873-2877. Doi:10.1021/jo00273a020.
9. Ching-Peng W, Pei-Chen H. Method for the preparation of teriflunomide. US20170073304A1 Patent..
10. ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Aouncil for harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). 2005:8-15.
11. Phổ IR chuẩn của tạp A của leflunomid. <https://www.pharmaffiliates.com/samplecoa/?catno=P A%2012%2008010>. Last viewed on 15/10/2025.
12. Haijun Y, Yong L, Min J, Junmei W, Hua F. General r. Chemistry - Acopper-catalyzed transformations of functional groups from arylboronic acids in wate *European Journal*. 2011;17(20): 5652-5660.
13. Phổ IR chuẩn của tạp B leflunomide. [cited 2025 Oct 15].
https://www.lgcstandards.com/medias/sys_master/root/he8/he7/11085524205598/new-COA_MM0859.02_ST-WB-CERT-3078285-1-1-1/new-COA-MM0859.02-ST-WB-CERT-3078285-1-1-1.PDF.
14. Venkata RP, Ramakrishna PB, Mariappan K, Jithendra RB, Rajmahendra S. A novel process for the preparation of teriflunomide. WO2016203410A1 Patent.
15. Balraj S, Gulshan B. Isolation and characterization of a degradation product in leflunomide and a validated selective stability-indicating HPLC-UV method for their quantification. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*. 2015;5(3):207-212.