

# Tổng hợp naphthol AS-D và naphthol AS-OL cacboxylat và nghiên cứu ảnh hưởng các gốc axit lên độ nhạy của cơ chất trong phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người

Trần Văn Tính<sup>1,\*</sup>, Phạm Hoài Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Anh Trí<sup>2</sup>, Lưu Văn Bôi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương

Nhận ngày 29 tháng 11 năm 2011

**Tóm tắt.** Đã tổng hợp 10 naphthol AS-D và naphthol AS-OL  $\alpha$ -cloaxetat,  $\alpha$ -clopropionat,  $\alpha$ -clobutyrat,  $\alpha$ -clophenylaxetat và butyrat trong đó có chín chất mới. Kết quả thí nghiệm cho thấy, nguyên tử clo và chiều dài mạch cacbon trong các gốc axit có ảnh hưởng và tính chọn lọc cao đối với độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng naphthol AS-OL  $\alpha$ -clopropionat là cơ chất tốt nhất dùng cho kỹ thuật nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người.

## 1. Đặt vấn đề

Hiện nay kỹ thuật nhuộm enzym esteraza trong phân loại dòng tế bào bệnh bạch cầu sử dụng chủ yếu cơ chất là các este của naphthol AS [1, 2]. Các cơ chất dùng để nhuộm enzym trong phân loại dòng tế bào trong bệnh bạch cầu thường là dẫn xuất chứa nhóm CH<sub>3</sub> ở vị trí *ortho*- hoặc *para*- hoặc ở cả hai vị trí trong gốc anilit với các gốc cacboxylat khác nhau như:  $\alpha$ -cloaxetat, butyrat, photphat... [3, 4]. Phản ứng nhuộm chỉ xảy ra sau khi nhóm este bị thủy phân dưới sự xúc tác của enzym nên bản chất các nhóm thế trong gốc anilit cũng như các gốc cacboxylat có ảnh hưởng quyết định đến độ nhạy, độ đặc hiệu của cơ chất [5]. Tuy nhiên

mối tương quan giữa cấu trúc phân tử và hoạt tính của cơ chất chưa được nghiên cứu một cách có hệ thống, nên chưa đưa ra được định hướng để lựa chọn cấu trúc cơ chất tối ưu cho phản ứng.

Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của mạch hidrocarbon trong gốc axit tới độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng nhuộm esteraza để phân loại dòng tế bào trong bệnh bạch cầu người có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cấp thiết.

Trong công trình đã công bố trước đây [6] đã nghiên cứu ảnh hưởng bản chất các nhóm thế trong gốc anilit và đã chỉ ra rằng, khi gốc cacboxylat không đổi thì cơ chất có nhóm OCH<sub>3</sub> ở vị trí *ortho* có độ nhạy cao nhất. Trong công trình này, sẽ tổng hợp các este của naphthol AS-D và naphthol AS-OL với các gốc

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38340613.  
E-mail: tranvantinh@yahoo.com

cacboxylat khác nhau và nghiên cứu ảnh hưởng của mạch hydrocacbon, từ đó rút ra định hướng trong việc tìm kiếm các cơ chất mới có độ nhạy cao hơn đối với phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người.

## 2. Kết quả và thảo luận

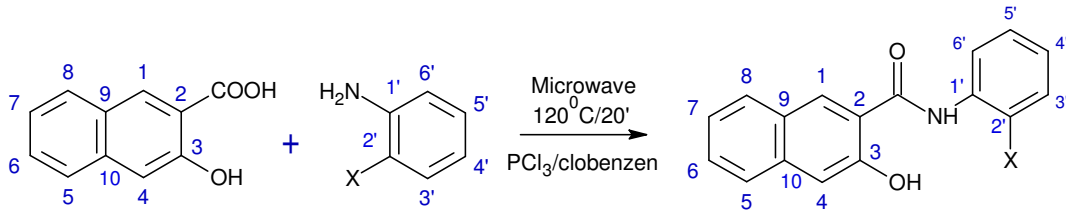
Naphtol AS-D và naphtol AS-OL cacboxylat làm cơ chất nhuộm esteraza tế bào bạch cầu được điều chế qua 2 giai đoạn. Giai đoạn 1 là điều chế naphtol AS-D và naphtol AS-OL, ở giai đoạn 2 sẽ tiến hành este hóa naphtol AS-D và naphtol AS-OL bằng các dẫn xuất cloanhydrit của axit cacboxylic tương ứng.

### Điều chế naphthol AS-D và naphtol AS-OL

Theo phương pháp cổ điển naphtol AS-D và naphtol AS-OL được điều chế bằng hai cách [7]. Cách trực tiếp một giai đoạn: hỗn hợp axit 3-hydroxy-2-naphtoic, *o*-toluidin (hoặc *o*-

anisidin) và  $\text{PCl}_3$  được đun ở khoảng  $130^\circ\text{C}$ , sau 3 giờ hiệu suất phản ứng đạt khoảng 60%. Cách thứ 2 là phương pháp gián tiếp hai giai đoạn: Ở giai đoạn 1, axit 3-hydroxy-2-naphtoic cho tác dụng với  $\text{SOCl}_2$  để chuyển hóa thành dẫn xuất cloanhydrit tương ứng, sau đó ở giai đoạn 2 cho naphtoic cloanhydrit tác dụng với *o*-toluidin (hoặc *o*-anisidin). Hiệu suất của phương pháp gián tiếp thường thấp hơn phương pháp trực tiếp. Như vậy, các phương pháp cổ điển mất nhiều thời gian, tốn năng lượng, hiệu suất không cao. Để nâng cao hiệu quả, giảm giá thành sản phẩm, đã tiến hành nghiên cứu tổng hợp naphtol AS-X (X là nhóm thế khác nhau trong gốc anilit) bằng phương pháp mới, sử dụng kỹ thuật vi sóng [6]. Trong công trình này, naphtol AS-D và naphtol AS-OL đã được điều chế theo phương pháp tương tự. Hỗn hợp axit 3-hydroxy-2-naphtoic, *o*-toluidin và *o*-anisidin và  $\text{PCl}_3$  trong clobenzen được đun trong lò vi sóng ở nhiệt độ khoảng  $130^\circ\text{C}$ . Phản ứng xảy ra theo sơ đồ 1.

Sơ đồ 1



X =  $\text{CH}_3$  (A1);  $\text{OCH}_3$  (A2)

Sau 10 phút, hiệu suất sản phẩm đạt từ 80-82%, cao hơn nhiều so với phương pháp tổng hợp truyền thống [7]. Cấu trúc của naphtol AS-D và naphtol AS-OL được khẳng định bằng các dữ liệu phổ. Trên phổ hồng ngoại xuất hiện các dao động hóa trị của nhóm OH naphtol ở 3400-3405; NH ở 3325-3303; C=O amit ở 1638-1640 và C-N ở 1174-1177  $\text{cm}^{-1}$  (bảng 1). Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$ , tín hiệu cộng hưởng nhóm OH của

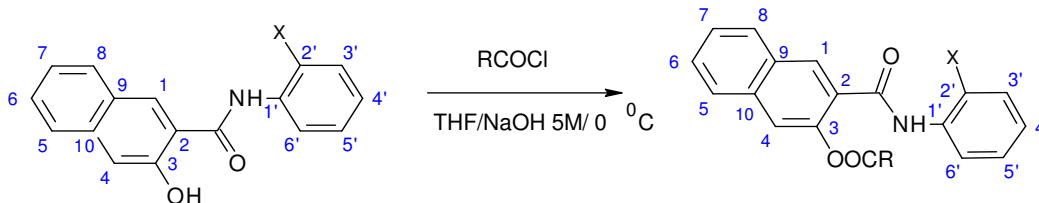
naphtol ở 11,76-11,81 ppm; NH của amit ở 10,54-11,07 ppm, proton nhóm CH của vòng naphtyl ở 7,36-8,70; phenyl ở 7,0-7,77; *o*- $\text{OCH}_3$  ở 3,92; *o*- $\text{CH}_3$  ở 2,34 ppm. Trên phổ ESI-MS cho thấy khối lượng của các pic ion phân tử chất điều chế được đúng bằng với khối lượng phân tử dự kiến và đều có cường độ mạnh  $[\text{M-H}]^-$  (100%) (bảng 2).

Tổng hợp các naphthol AS-D và naphthol AS-OL cacboxylat

Naphthol AS-D và naphthol AS-OL cacboxylat được điều chế bằng phương pháp

mà các tác giả bài báo này cải tiến và đã công bố trước đây [6]. Phản ứng diễn ra theo sơ đồ 2.

Sơ đồ 2



X: CH<sub>3</sub> và R: CH<sub>2</sub>Cl (B1), CHClCH<sub>3</sub> (B2), CHClCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (B3), (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (B4), CHClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (B5)  
 X: OCH<sub>3</sub> và R: CH<sub>2</sub>Cl (C1), CHClCH<sub>3</sub> (C2), CHClCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (C3), (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (C4), CHClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (C5)

Hiệu suất của 10 este tổng hợp được đạt từ 52-62%, có nhiệt nóng chảy rõ ràng, từ 94-175<sup>0</sup>C. Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng các dữ kiện phổ. Trên phổ hồng ngoại dao động nhóm OH đã thay bằng dao động nhóm C=O este 1761-1776. Dao động hóa trị của nhóm NH xuất hiện ở 3311-3397; nhóm C=O amit ở 1643-1676; C-O-C ở 1202-1252 và C-N ở 1151-1186 cm<sup>-1</sup> (bảng 1). Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR, tín hiệu cộng hưởng của NH của amit ở 8,36-

11,16 ppm, proton nhóm CH của vòng naphtyl và phenyl lần lượt ở 7,59-8,45; 6,95-8,06 ppm, *o*-OCH<sub>3</sub> ở 2,38-3,87, *o*-CH<sub>3</sub> ở 2,08-2,29; CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl và CHCl của gốc axit lần lượt ở 0,92-1,72; 1,62-2,5; 4,66-4,68; 2,34-6,21 ppm. Trên phổ ESI-MS cho thấy khối lượng của các pic ion phân tử chất điều chế được đúng bằng với khối lượng phân tử dự kiến tổng hợp và đều có cường độ mạnh [M+H]<sup>+</sup> hoặc [M+Na]<sup>+</sup> (100%) (bảng 2).

Bảng 1. Kết quả tổng hợp, một số hằng số hóa lý và các dữ kiện phổ IR của các chất điều chế

Hợp chất	X	R	Mol g	Hiệu suất (%)	Tnc (°C)	IR (ν, cm <sup>-1</sup> , KBr)
A1	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>		277.3	80	194-195	3400 (OH naphthol), 3325 (NH), 3051 (Ar-H), 1638 (C=O amit), 1599, 1589, 1551 (C=C, aren), 1174 (C-N), 750 (CH octo)
A2	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>		293.3	82	161-162	3405 (OH naphthol), 3303 (NH), 3197, 3054 (Ar-H), 2934, 2837 (CH), 1640 (C=O amit), 1594, 1488 (C=C, aren), 1249 (C-O-C), 1177 (C-N), 737 (OCH <sub>3</sub> octo)
B1	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	353.8	55	173-175	3323 (NH), 3057 (Ar-H), 2961 (CH), 1770 (C=O este), 1658 (C=O amit), 1585, 1519, 1493, 1451 (C=C, aren), 1208 (C-O-C), 1172 (C-N).
B2	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	367.8	52	131-134	3368 (NH), 3058 (Ar-H), 2977, 2934 (CH), 1765 (C=O este), 1676 (C=O amit), 1583, 1519, 1449 (C=C, aren), 1203 (C-O-C), 1164 (C-N)

B3	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	347.4	62	137,3-139	3234 (NH), 3055 (Ar-H), 2962, 2929, 2873 (CH), 1764 (C=O este), 1643 (C=O amit), 1584, 1529, 1489, 1459 (C=C, aren), 1211 (C-O-C), 1160 (C-N).
B4	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	381.9	58	130-131	3364 (NH), 3054 (Ar-H), 2966 (CH), 1762 (C=O este), 1676 (C=O amit), 1600, 1583, 1519, 1450 (C=C, aren), 1202 (C-O-C), 1164 (C-N).
B5	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	429.9	53	147,1-148	3311 (NH), 3052 (Ar-H), 2978 (CH), 1761 (C=O este), 1651 (C=O amit), 1602, 1585, 1519, 1483, 1453 (C=C, aren), 1206 (C-O-C), 1157 (C-N).
C1	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	369.8	53	132-134	3315 (NH), 3060 (Ar-H), 2999, 2925, 2837 (CH), 1767 (C=O este), 1656 (C=O amit), 1600, 1541, 1493, 1459 (C=C, aren), 1232 (C-O-C), 1160 (C-N)
C2	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	383.8	55	123-125	3325 (NH), 3060 (Ar-H), 2988, 2936, 2837 (CH), 1761 (C=O este), 1657 (C=O amit), 1596, 1539, 1490, 1461 (C=C, aren), 1231 (C-O-C), 1161 (C-N)
C3	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	363.4	56	94-95	3395 (NH), 3054 (Ar-H), 2951, 2873, 2841 (CH), 1765 (C=O este), 1663 (C=O amit), 1597, 1532, 1523, 1487, 1459 (C=C, aren), 1251 (C-O-C), 1178 (C-N)
C4	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	397.9	51	149-151	3394 (NH), 3053 (Ar-H), 2961, 2873 (CH), 1765 (C=O este), 1663 (C=O amit), 1597, 1533, 1522, 1487, 1459 (C=C, aren), 1251 (C-O-C), 1178 (C-N)
C5	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	445.9	59	133-134	3397 (NH), 3062, 3002 (Ar-H), 2961, 2934, 2834 (CH), 1776 (C=O este), 1668 (C=O amit), 1600, 1523, 1485, 1457 (C=C, aren), 1252 (C-O-C), 1186 (C-N)

Bảng 2. Phổ <sup>1</sup>H-NMR và ESI-MS của các hợp chất điều chế được

Kí hiệu	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , σ, ppm, J, 500Hz)	ESI-MS (MeOH, m/z)
A1	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>		2,34 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 7,12 (t, 1H, HC <sub>4</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 7,25 (t, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,29 (d, 1H, HC <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,37 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 7,38 (d, 1H, HC <sub>7</sub> , <sup>3</sup> J=8); 7,51 (t, 1H, HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=7,62); 7,77 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ; <sup>3</sup> J=8,5); 7,95 (t, 2H, HC <sub>5</sub> , HC <sub>8</sub> ; <sup>3</sup> J=8); 10,54 (s, 1H, NH); 11,81 (s, 1H, OH).	276,36 [M-H] <sup>-</sup> (100)
A2	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>		6,99 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,12 (s, 2H, HC <sub>3</sub> , HC <sub>5</sub> ); 7,36 (d, 2H, HC <sub>3</sub> , HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=7); 7,5 (t, 1H, HC <sub>7</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,77 (d, 1H, HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=8); 7,97 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,49 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,7 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 11,07 (s, 1H, NH); 11,76 (s, 1H, OH).	292,20 [M-H] <sup>-</sup> (100)
B1	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	2,29 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,66 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Cl); 7,16 (t, 1H, HC <sub>4</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 7,21 (t, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 7,27 (d, 1H, HC <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,37 (d, 1H, HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,63 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,85 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 8,01 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8,0); 8,11 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8,0); 8,42 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 10,05 (s, 1H, HN).	355,0 [M+H] <sup>+</sup> (100)
B2	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	1,72 (d, 3H, CH <sub>3</sub> CH, <sup>3</sup> J=7); 2,27 (d, 1H, CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=10); 4,97 (q, 1H, CHCl, <sup>3</sup> J=7); 7,14 (t, 1H, HC <sub>4</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 7,20 (t, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,26 (d, 1H, HC <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,37 (d, 1H, HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=8); 7,62 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,86 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 8,01 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,1 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 8,4 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 11,16 (s, 1H, NH).	390,16 [M+Na] <sup>+</sup> (100)

B3	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,94 (t, 3H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 1,63 (q, 2H, CH <sub>2</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 2,29 (d, 3H, CH <sub>3</sub> Ar', <sup>3</sup> J=8); 2,53 (t, 1H, CH <sub>2</sub> CO, <sup>3</sup> J=7,25); 7,16 (t, 1H, HC <sub>4</sub> ', <sup>3</sup> J=7); 7,21 (t, 1H, HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=7); 7,27 (d, 1H, HC <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=8); 7,35 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=8,5); 7,59 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,77 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,98 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,08 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,35 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 10 (s, 1H, NH).	370,39 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
B4	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	- CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,04 (t, 3H, CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 1,96 (m, 1H, CH <sub>2</sub> ); 2,14 (m, 1H, CH <sub>2</sub> ); 2,29 (s, 3H, CH <sub>3</sub> Ar'); 2,34 (t, 1H, CHCl, <sup>3</sup> J=7,25); 7,15 (t, 1H, HC <sub>4</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,21 (t, 1H, HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,26 (d, 1H, HC <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=6,5); 7,36 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=6); 7,63 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,86 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 8,02 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,11 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 8,4 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 10,05 (s, 1H, NH).	404,3 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
B5	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2,09 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -O <sub>ct</sub> ); 6,21 (s, 1H, CHCl); 7,17 (m, 2H, CH <sub>4</sub> , CH <sub>5</sub> ); 7,26 (d, 1H, CH <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,31 (d, 1H, CH <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,41 (m, 3H, HC <sub>3</sub> ', HC <sub>4</sub> ', HC <sub>5</sub> ); 7,61 (m, 4H, HC <sub>7</sub> , HC <sub>6</sub> , HC <sub>2</sub> ', HC <sub>6</sub> '); 7,76 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 8,0 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 8,02 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,39 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,98 (s, 1H, NH).	452,47 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
C1	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	3,86 (d, 3H, CH <sub>3</sub> O, <sup>3</sup> J=9,5); 4,68 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Cl); 6,97 (t, 1H, HC <sub>4</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,11 (d, 1H, HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=8); 7,17 (t, 1H, HC <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=7,25); 7,62 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,86 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,90 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 8,0 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,11 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,45 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,55 (s, 1H, NH).	392,28 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
C2	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	1,73 (d, 3H, CH <sub>3</sub> CH, <sup>3</sup> J=7); 3,85 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O); 4,98 (q, 1H, CHCl, <sup>3</sup> J=7); 6,96 (t, 1H, HC <sub>4</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,09 (d, 1H, HC <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=8); 7,16 (t, 1H, HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,62 (m, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> ); 7,87 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,91 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 8,0 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,10 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,40 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,51 (s, 1H, NH).	406,40 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
C3	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,92 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,63 (d, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7); 2,45 (s, 2H, CH <sub>2</sub> CO); 3,87 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O); 6,98 (s, 1H, HC <sub>3</sub> ); 7,12 (t, 2H, H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=6,5); 7,61 (dd, 2H, CH <sub>6</sub> , CH <sub>7</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 7,79 (s, 1H, CH <sub>4</sub> ); 7,98 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=7); 8,04 (s, 1H, HC <sub>6</sub> ); 8,1 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=6); 8,42 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,48 (s, 1H, NH).	386,55 [M+Na] <sup>+</sup> (100)
C4	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	- CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,92 (t, 3H, CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,25); 1,63 (q, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J=7,5); 2,59 (t, 1H, CHCl, <sup>3</sup> J=7,25); 3,87 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O); 6,97 (t, 1H, H <sub>4</sub> , <sup>3</sup> J=7); 7,10 (d, 1H, CH <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,14 (t, 1H, CH <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=7); 7,59 (t, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=7); 7,64 (t, 1H, HC <sub>7</sub> ', <sup>3</sup> J=7); 7,79 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,98 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,05 (d, 1H, HC <sub>6</sub> , <sup>3</sup> J=7); 8,43 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,44 (s, 1H, NH).	398,32 [M+H] <sup>+</sup> (100)
C5	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2,38 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O); 6,21 (s, 1H, CHCl); 6,95 (t, 1H, CH <sub>4</sub> , <sup>3</sup> J=8,25); 7,08 (d, 1H, CH <sub>3</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,16 (t, 1H, HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=7,5); 7,39 (t, 3H, HC <sub>3</sub> ', HC <sub>4</sub> ', HC <sub>5</sub> ', <sup>3</sup> J=3,0); 7,58 (t, 2H, HC <sub>2</sub> ', HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=3,75); 7,62 (q, 2H, HC <sub>6</sub> , HC <sub>7</sub> , <sup>3</sup> J=3,5); 7,76 (s, 1H, HC <sub>4</sub> ); 7,81 (d, 1H, HC <sub>6</sub> ', <sup>3</sup> J=6,5); 7,995 (d, 1H, HC <sub>5</sub> , <sup>3</sup> J=8); 8,09 (d, 1H, HC <sub>8</sub> , <sup>3</sup> J=7); 8,36 (s, 1H, HC <sub>1</sub> ); 9,5 (s, 1H, NH).	468,52 [M+Na] <sup>+</sup> (100)

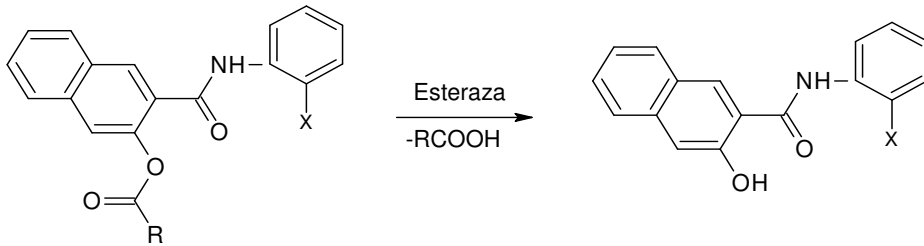
*Nhuộm tế bào bạch cầu người bằng các este điều chế được*

Độ nhạy của các este điều chế được đối với esteraza đặc hiệu của tế bào bạch cầu trung tính trong máu ngoại vi của người khỏe mạnh bình thường được đánh giá bằng phương pháp nhuộm của Dacie và Lewis [8] đã được tối ưu hóa [9].

Cơ chế phản ứng nhuộm xảy ra theo hai giai đoạn:

*Giai đoạn 1:* Esteraza bạch cầu người thủy phân este của cơ chất tạo thành dẫn xuất của naphthol AS-D (hoặc naphthol AS-OL) như sơ đồ 3:

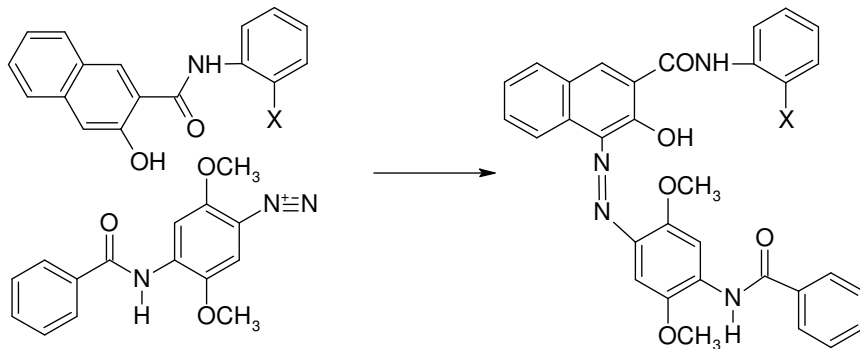
Sơ đồ 3:



X: CH<sub>3</sub> và R: CH<sub>2</sub>Cl (B1), CHClCH<sub>3</sub> (B2), CHClCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (B3), (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (B4), CHClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (B5)  
 X: OCH<sub>3</sub> và R: CH<sub>2</sub>Cl (C1), CHClCH<sub>3</sub> (C2), CHClCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (C3), (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (C4), CHClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (C5)

*Giai đoạn 2:* là phản ứng ghép đôi giữa naphthol AS-D (OL) với muối diazo tạo thành chất màu azo theo sơ đồ 4:

Sơ đồ 4:



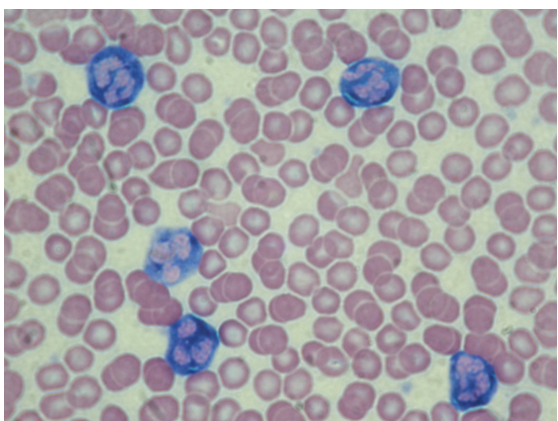
Lựa chọn bệnh nhân là người khỏe mạnh, lấy mẫu máu làm tiêu bản và nhuộm đồng thời

cho toàn bộ các cơ chất tổng hợp được. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và ảnh 1

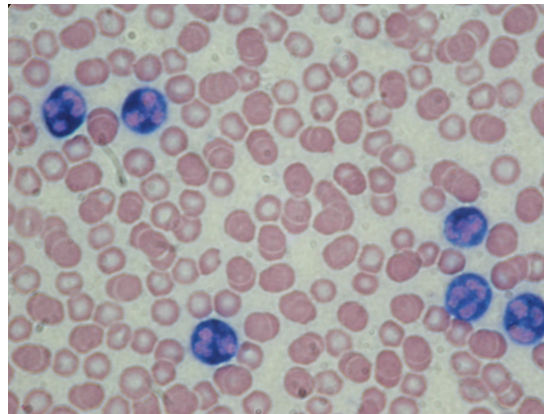
Bảng 3. Kết quả nhuộm tế bào bạch cầu bằng các este điều chế được

Hợp chất	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Điểm	Hợp chất	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Điểm
B1	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	235	C1	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> Cl	301
B2	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	256	C2	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>3</sub>	400
B3	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	19	C3	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	26
B4	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	245	C4	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	377
B5	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	52	C5	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	-CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	41

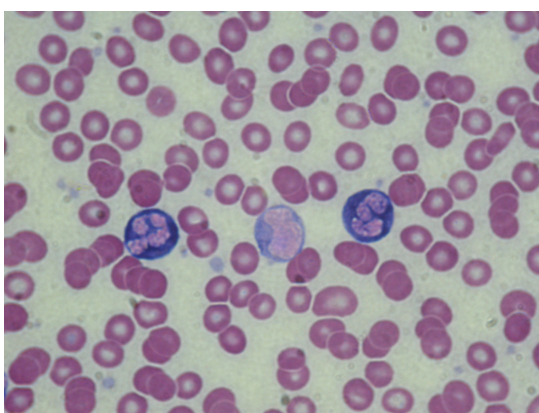
Ảnh nhuộm bạch cầu của bệnh nhân Nguyễn Văn L. sử dụng cơ chất là naphthol AS-OL cloaxetat, naphthol AS-OL 2-clobutyrat và naphthol AS-D cloaxetat, naphthol AS-D 2-clopropionat tổng hợp được



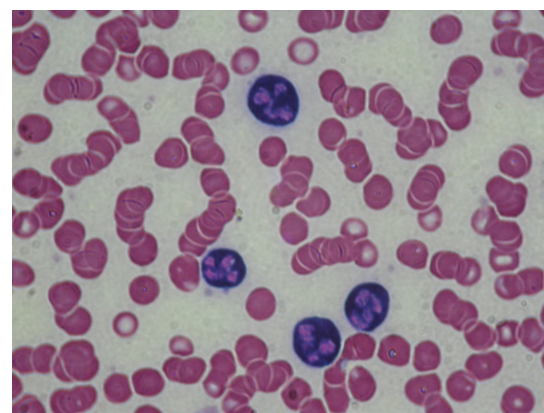
Ảnh 1. Naphthol AS-D cloaxetat



Ảnh 2. Naphthol AS-D 2-clopropionat



Ảnh 3. Naphthol AS-OL cloaxetat.



Ảnh 4. Naphthol AS-OL 2-clopropionat.

Kết quả nhuộm tế bào cho thấy:

- Tất cả 10 cơ chất tổng hợp được đều có hoạt tính đối với emzyme esterase đặc hiệu bạch cầu người.

- Đối với 2 naphthol AS-D và naphthol AS-OL thì gốc axit với 3 nguyên tử C có độ nhạy cao nhất.

- Đối với các cơ chất với gốc este giống nhau, từ 2-4 C thì este của naphthol AS-OL tốt hơn AS-D. Độ nhạy cao nhất đạt được đối với naphthol AS-OL 2-clopropionat.

- Các cơ chất mà gốc axit chứa nguyên tử clo có độ nhạy cao hơn khi không chứa clo.

- Gốc axit với nhóm  $-CHClC_6H_5$  có độ nhạy thấp nhất. Có lẽ do thể tích lớn, nhóm  $-CHClC_6H_5$  công kênh, không thuận lợi cho phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người. Điều này hoàn toàn phù hợp bởi phản ứng thủy phân este của naphthol AS-D (OL) xúc tác bằng enzyme esteraza có sự chọn lọc cao về cấu hình không gian tại tâm hoạt động [5].

### 3. Phần thực nghiệm

*Hóa chất và thiết bị*

- Axit 3-hydroxy-2-naphthoic, *o*-toluidin, *o*-anisidin-2-cloaxetyl clorua 97%, 2-clopropionyl clorua 97%, 2-cloaxetyl phenyl clorua 90%, 2-clobutyryl clorua 85%, butyryl clorua 98% hãng Sigma.

- Các dung môi: DMF loại P của Labosi, fomaldehit 37%; ACS 99,5% của hãng Sigma-Aldrich, axeton 99,8%, etanol: 99,9% của hãng Merck.

- Muối diazo: Fast Blue RR Salt của hãng Acros.

-  $KH_2PO_4$  của hãng Kanto Chemical Co., INC Nhật Bản.

-  $Na_2HPO_4$  của hãng P.P.H Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice Ba Lan.

- Nuclear fast red của hãng Sigma-Aldrich.

Tất cả các hóa chất đó được dùng không phải tinh chế lại.

- THF 99% của Trung Quốc, được cất lại trước khi dùng.

- Máy ủ nhiệt (Stat-Fax 2200, hãng Awareness Technology INC, USA) 0-50°C, độ chính xác  $\pm 0,1^{\circ}C$ , máy đo pH độ chính xác đến 0,001, cân phân tích độ chính xác 0,0001, kính hiển vi với độ phóng đại 1.000 lần.

- Điểm nóng chảy đo trên máy Stuard STP 3.

- Phổ hồng ngoại đo trên máy MAGNAIR 560 SPECTROMETER hãng Nicolet trong khoảng  $400-10.000\text{ cm}^{-1}$  bằng ép viên KBr ở Khoa hóa ĐHKHTN, ĐHQGHN.

- Phổ cộng hưởng từ  $^1H-NMR$ ,  $^{13}C-NMR$ , ghi trên máy Bruker 500Mv, 500MHz, viện Khoa học và công nghệ Việt Nam.

- Phổ khối lượng ghi trên máy ESI-MS phân giải cao Premier của Micromass Water, phòng phổ khối hiệu năng cao, khoa Hóa học, ĐHKHTN, ĐHQGHN.

*Điều chế naphthol AS-D và naphthol AS-OL*

Hòa tan  $5.10^{-3}$  mol axit 3-hydroxy-2-naphthoic và  $5.10^{-3}$  mol amin vào 7 ml clobenzen, khuấy đều, làm lạnh ở  $10^{\circ}C$ . Nhỏ từ từ dung dịch  $5.10^{-3}$  mol  $PCl_3$  trong 2.5 ml clobenzen vào hỗn hợp. Phản ứng được thực hiện trong lò vi sóng trong 15 phút tại  $135^{\circ}C$ . Thu sản phẩm, kết tinh trong cồn.



Hiệu suất, một số hàng số hóa lý và các dữ kiện phổ của naphthol AS-D và naphthol AS-OL điều chế được thể hiệntong bảng 1,2.

#### *Điều chế các naphthol AS-D và AS-OL cacboxylat*

Nhỏ từ từ 0,0011 mol NaOH 5N lạnh vào dung dịch 0,001 mol naphtanilit trong THF, khuấy và làm lạnh bằng đá muối đến 0°C. Sau khi cho hết NaOH, tiếp tục nhỏ từ từ 0,0011 mol các cloanhydrit của các axit tương ứng vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy đều 60 phút, để yên bình phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1,5- 2 giờ. Đổ hỗn hợp vào nước lạnh, khuấy, lọc kết tủa. Sản phẩm được kết tinh trong hỗn hợp cò-naxeton và bảo quản ở nhiệt độ thấp.

#### *Nhuộm bạch cầu người*

##### *Pha chế thuốc thử:*

- Dung dịch cố định tiêu bản: Cồn-Formol tỷ lệ thể tích 9:1.

- Dung dịch nhuộm:

+ Cơ chất (các este tổng hợp ở trên): 0,480 mg.

+ Muối diazo: 0,459 mg.

+ DMF: 43,5 µl.

+ DMSO: 44 µl.

+ Đệm photphat pH=7,42 (Sörensen) ): 1.411,87 µl.

- Dung dịch nhuộm nhân: Nuclear fast red 0,1 g/100 ml.

- *Bệnh phẩm:* mẫu máu ngoại vi được dàn thành 30 tiêu bản để khô trong điều kiện tự nhiên.

##### *Kỹ thuật tiến hành nhuộm:*

- Cố định tiêu bản trong thời gian 1 phút. Sau đó gói các tiêu bản và đưa vào hộp chống

ẩm bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C, thời gian bảo quản có thể kéo dài vài tháng [10].

- Phủ dung dịch nhuộm chuẩn bị ở trên lên tiêu bản để trong bình cách thủy 37°C và thời gian là 10 phút. Sau đó rửa tiêu bản dưới vòi nước 5 phút.

- Nhuộm nền bằng dung dịch nuclear fast red trong 15 phút ở 37°C, rửa nước và để khô.

- Đọc tiêu bản dưới vật kính dầu với độ phóng đại 1.000 lần.

- Kết quả: Các vùng có chứa enzym esteraza bạch cầu trung tính sẽ xuất hiện các hạt bắt màu xanh đen (xem ảnh 1). Đánh giá mức độ dương tính, tổng số điểm và hiệu suất bằng phương pháp phân độ trên kính hiển vi có độ phóng đại 1.000 lần theo quy trình kỹ thuật của hãng Sigma-Aldrich [10].

## **4. Kết luận**

1. Đã điều chế naphthol AS-D và naphthol AS-OL với hiệu suất cao bằng phương pháp mới sử dụng kỹ thuật vi sóng.

2. Đã điều chế được 10 naphthol AS-D và naphthol AS-OL cacboxylat, trong đó có 9 chất mới. Các cơ chất đều có hoạt tính đối với phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người.

3. Naphthol AS-OL 2-clopropionat có độ nhạy đối với phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người tốt nhất, cao hơn cơ chất naphthol AS-D cloaxetat có bán trên thị trường.

## **Tài liệu tham khảo**

- [1] Nicola J. Roger, Simon C. Apte, Azo dye method for mapping relative sediment enzyme activity in situ at precise spatial locations, *Environ. Sci. Technol* 38 (2004) 5134-5140.

- [2] Janice R. Connor, Robert A. Dodds, Ian E. James, Maxine Gowen, Human osteoclast and giant cell differentiation, The apparent switch from nonspecific esterase to tartrate resistant acid phosphatase activity coincides with the in situ expression of osteopontin mRNA, *J. Histochemistry and Cytochemistry* vol 43 No.12 (1995) 1193-1201.
- [3] Wolf D. Kuhlmann, M.D., Enzyme cytochemical substrate solution, (2010) [http://www.immunologic-labor.com/cellmarker\\_files/IET\\_reagents\\_06.pdf](http://www.immunologic-labor.com/cellmarker_files/IET_reagents_06.pdf)
- [4] D. Catovsky: *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, Hong kong, 1994, pp. 151-159.
- [5] Christoph Tamm, Pig liver esterase catalysed hydrolysis substrate specificity and stereoselectivity, *Pure & Appl. Chem* vol 64, No. 8 (1992) 1187-1191.
- [6] Trần Văn Tính, Phạm Hoài Thu, Nguyễn Anh Trí, Lưu Văn Bôi: Phương pháp mới tổng hợp naphthol AS-D làm tác nhân điều chế cơ chất nhuộm esteraza đặc hiệu tế bào bạch cầu người. *Tạp chí hóa học* 48 (4A) (2010) 736-741.
- [7] Sabnis R.W., *Hand book of acid-Base indicators*, Taylor and frames, inc, 2007, pp. 398.
- [8] David Swirsky and Barbara J. Bain. *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, Hong kong, 2006, pp. 311-333.
- [9] Trần Văn Tính, Nguyễn Anh Trí, Lưu Văn Bôi: Nghiên cứu tối ưu hóa phản ứng nhuộm esteraza đặc hiệu bạch cầu người với naphthol AS-D cloaxetat bằng phương pháp đơn hình, *Tạp chí Thông tin y dược* 02 (2010) 25-29.
- [10] Sigma-Aldrich Catalogue: Naphthol AS-D Chloracetate Esterase (*Procedure No.91*), *Sigma-Aldrich* (2003) pp.1-3.

## Synthesis of naphthol AS-D and AS-OL carbocylates and study the effect of acid radicals on sensitivity of the substances in esterase staining human blood leukocytes

Tran Van Tinh<sup>1</sup>, Pham Hoai Thu<sup>1</sup>, Nguyen Anh Tri<sup>2</sup>, Luu Van Boi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>National Institute of Haematology and Blood transfusion

Ten Naphthol AS-D and Naphtol AS-OL  $\alpha$ -Chloroacetate, -propionate, -butyrate, -phenylacetate and butyrate, including *nine new Substances have been synthesized* and effect of the acid Radicals on Sensitivity of these Reagents in Reaction of esterase staining human blood Leucocytes have been studied. The results of esrerase staining human blood leuckocytes show that Sensitivity is high selective to carbocylate Radicals. The best Sensitivity has exposed  $\alpha$ -chloro-propionate Group.