

Tổng hợp Naphtol as-thể Photphat làm cơ chất nhuộm Photphataza bạch cầu người

Trần Thị Hoa^{1,*}, Trần Thị Thanh Tâm¹,
Nguyễn Đình Duy³, Lưu Văn Bôi¹, Trần Văn Tính²

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 19 Lê Thánh Tông, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm Huyết học - Truyền máu, Bệnh viện 19-8

³Trường chuyên Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 04 tháng 5 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 12 tháng 5 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 6 năm 2017

Tóm tắt: Naphtol AS-BI photphat được ứng dụng làm cơ chất nhuộm hóa học tế bào để phân loại dòng bệnh bạch cầu kinh và phân biệt tế bào Lympho T trong bệnh bạch cầu cấp. Để bổ sung nguồn cơ chất có độ nhạy và độ đặc hiệu cao với giá thành hợp lý, đã tiến hành tổng hợp dãy 3-[(N-aryl)cacbamoyl]-naphtalen-2-yl dihydroxyphotphat (Naphtol AS-X photphat) bằng phản ứng của các dẫn xuất Naphtol AS-X với POCl₃, sau đó tiến hành thủy phân. Kết quả sử dụng 6 hợp chất Naphtol AS-thể photphat (naphtol AS-X photphat) tổng hợp được làm cơ chất nhuộm photphataza đặc hiệu bạch cầu cho thấy rằng tất cả các cơ chất đều dương tính với các tế bào bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa axit và bạch cầu ưa bazơ.

Từ khóa: Naphthol AS-BI phosphate, Alkaline phosphatase, acute leukemia.

1. Mở đầu

Bệnh bạch cầu là một nhóm bệnh lý ác tính hệ thống tạo máu [1]. Số người mắc bệnh có xu hướng ngày càng tăng với đặc điểm có sự tăng sinh bất thường không thể kiểm soát của các tế bào bạch cầu chưa trưởng thành lẫn át các tế bào bình thường trong tủy xương và máu ngoại vi. Theo thống kê của tổ chức Sức khỏe Mỹ năm 2016, tỉ lệ mắc bệnh ung thư bạch cầu là tương đối cao chiếm 4% và đứng thứ 9 trong các bệnh ung thư mắc ở nam giới, chiếm 3% và

đứng thứ 8 trong các bệnh ung thư mắc ở nữ giới [2].

Hiện nay, việc phân loại dòng tế bào ung thư máu theo tiêu chuẩn FAB dựa trên kết quả của ba phương pháp: miễn dịch, di truyền và nhuộm hóa học tế bào [3]. Nhuộm hóa học tế bào là kỹ thuật dễ thao tác, không đòi hỏi máy móc thiết bị đắt tiền và giá thành rẻ nên được ứng dụng trong nhiều bệnh viện, cơ sở nghiên cứu. Nhuộm hóa học tế bào gồm nhiều kỹ thuật, trong đó nhuộm photphataza bạch cầu dùng để phân biệt bệnh bạch cầu kinh dòng tủy và bạch cầu cấp dòng tế bào tóc (hairy cell). Cơ chất được sử dụng là Naphtol AS-BI photphat có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhưng phải nhập ngoại với giá thành đắt. Ngoài ra, việc vận chuyển cơ chất gặp khó khăn do phải bảo quản phải dưới -

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1664723800.

Email: tranthihoa_t58@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4494>

20°C [4]. Vì vậy, tổng hợp dãy Naphtol AS-X photphat thể làm cơ chất nhuộm photphataza dùng trong chẩn đoán, điều trị bệnh bạch cầu người thay thế hóa chất nhập ngoại là đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cần thiết.

2. ThỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất:

Các Naphtol AS-D photphat 95%, Naphtol AS-OL photphat 95%, Naphtol AS-CA photphat 98%, Naphtol AS-BS photphat 99,3%, Naphtol AS-BO photphat 99,42%, Naphtol AS-LC photphat 99,41%, Na_2PO_4 99%, loại P, KH_2PO_4 , loại P, sản phẩm của Sigma Aldrich; muối diazo: Fast red violet LB salt là sản phẩm của Acros; THF 99% và POCl_3 99%, sản phẩm của Merk; Pyridin 99% , HCl 36,7%, sản phẩm của Trung Quốc;

Các hóa chất trên được tinh chế lại khi cần thiết.

Dụng cụ và thiết bị:

Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy FTIR Affinity trong khoảng 400- 4000 cm^{-1} tại khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên-ĐHQGHN; mẫu được ép viên với KBr;

Phổ khối lượng (MS) được đo trên máy LC-MSD-Trap-SL của hãng Agilent Technologies (Mỹ), Viện Hóa học -Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

Phổ cộng hưởng từ proton được đo trên máy ADVANCE Spectrometer (Bruker 500Mv), tần số 500MHz, tại khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên-ĐHQGHN;

Cân phân tích Sartorius độ chính xác 10^{-4} gram, tại Bệnh viện 19-8;

Máy đo điểm nóng chảy Omega SMP40, phòng thí nghiệm Hóa dược, Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên- ĐHQGHN;

Ủ nhiệt tiêu bản nhuộm bằng máy điều nhiệt CW-20GS (0-500°C) tại nhiệt độ 37°C của Hàn Quốc, độ chính xác $\pm 0.1^\circ\text{C}$, tại bệnh viện 19-8;

Soi tiêu bản bằng kính hiển vi hai mắt Nikon với độ phóng đại 1.000 lần có gắn máy chụp ảnh, tại viện 19-8.

Phương pháp nghiên cứu: tổng hợp hữu cơ và nhuộm hóa học tế bào.

2.2. Thực nghiệm

2.2.1. Tổng hợp dãy cơ chất Naphtol AS-X photphat

Quy trình tổng hợp Naphtol AS-D photphat:

Hòa tan 1,00 gam Naphtol AS-D (3,426 mmol) trong 10 ml dung môi pyridin khan (được làm khan bằng NaOH) sau đó làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 0°C . Nhỏ từ từ từng giọt 0,481 ml dung dịch POCl_3 (5,139 mmol), khuấy đều trong 24h, giữ nhiệt độ tại 0°C . Cho 15ml nước đá vào hỗn hợp, điều chỉnh pH của dung dịch ở pH=8 bằng dung dịch NaOH 1M và khuấy đều khoảng 15 phút để phản ứng thủy phân xảy ra hoàn toàn, thu được dung dịch chứa dinatri 3-[(N-aryl) cacbamoyl]naphthalen-2-yl photphat. Acid hóa hỗn hợp bằng dung dịch HCl 0,1M cho tới khi xuất hiện kết tủa (pH=2). Lọc thu kết tủa. Phần dịch lọc được pha loãng bằng lượng nước đá theo tỷ lệ 1:1, khuấy mạnh, thu thêm kết tủa. Gộp 2 phần kết tủa với nhau và rửa bằng dung dịch HCl loãng thu được cơ chất naphthol AS-X photphat thô dạng rắn màu nâu. Tinh chế cơ chất bằng cách hòa tan naphthol AS-X photphat thô vào NaOH 1M, thêm dung môi tetrahydrofuran (THF) theo tỷ lệ THF: nước = 1:5, sau đó làm lạnh dung hỗn hợp ở $2-4^\circ\text{C}$ và axit hóa bằng HCl 0,1M đến pH=4. Lọc thu cơ chất naphthol AS-X photphat tinh khiết.

Hiệu suất sản phẩm là 0,5414 gam (44%).

Tương tự đã tiến hành tổng hợp các dẫn xuất naphtol AS-X photphat khác.

Kết quả tổng hợp, một số hằng số hóa lý và các dữ kiện phổ của các cơ chất tổng hợp được thể hiện trong các bảng 1 và 2.

2.2.2. Nhuộm hóa học tế bào kỹ thuật nhuộm photphataza

Các cơ chất tổng hợp được sử dụng làm cơ chất cho kỹ thuật nhuộm photphataza.

Quy trình nhuộm hóa học tế bào được tiến hành 4 bước theo tài liệu [5].

Bước 1: Cố định tiêu bản trong dung dịch cố định, rửa kỹ bằng nước cất, để khô;

Bước 2: Nhúng tiêu bản trong dung dịch nhuộm 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch nhuộm được pha chế (tính cho một tiêu bản nhuộm) như sau:

Dung dịch cơ chất:	100 µl
Dung dịch muối diazo:	100 µl
Dung dịch đậm:	2.000 µl
Tổng thể tích:	2.200 µl

Bước 3: Nhuộm nhân và nền bằng dung dịch Hemtoxylin 5 phút ở nhiệt độ 37°C, rửa sạch tiêu bản, để khô và đọc tiêu bản dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1000 lần.

Kết quả nhuộm được đánh giá bằng bảng phương pháp phân độ và tính điểm theo quy trình 91 của hãng Sigma:

- Độ 0: Không có hạt bắt màu thuốc nhuộm.
- Độ 1: Ít hạt màu đỏ trên nguyên sinh chất, hạt mịn nhỏ, chiếm $\leq 1/3$ bào tương của tế bào.
- Độ 2: Nhiều hạt màu đỏ trên nguyên sinh chất, hạt trung bình, chiếm 1/3 đến 3/4 bào tương của tế bào.
- Độ 3: Nhiều hạt màu đỏ trên nguyên sinh chất, hạt to, chiếm hết bào tương của tế bào và che phủ một phần nhân tế bào.

- Độ 4: Nhiều hạt phủ kín nguyên sinh chất và nhân, hạt to.

Điểm nhuộm được tính theo công thức:

$$\sum Y (\text{điểm}) = Y_0 \times 0 + Y_1 \times 1 + Y_2 \times 2 + Y_3 \times 3 + Y_4 \times 4$$

Thực hiện nhuộm kỹ thuật photphataza sử dụng cơ chất tổng hợp được để khảo sát thời gian nhuộm tối ưu và pH nhuộm tối ưu.

Các dung dịch đệm sử dụng:

PO_4^{3-} 0,0124M, pH = 7,4	(a)
PO_4^{3-} 0,0667M – NaF, pH = 7,9	(b)
PO_4^{3-} 0,0667M, pH = 8,0	(c)
PO_4^{3-} 0,0667M, pH = 6,8	(d)
PO_4^{3-} 0,0124M, pH = 5,4	(e)
Photphat axit, pH = 5,2	(f)
Photphat kiềm, pH = 10,4	(g)
Tris, pH = 9,5	(h)
Veronal axetat, pH = 9,799	(i)

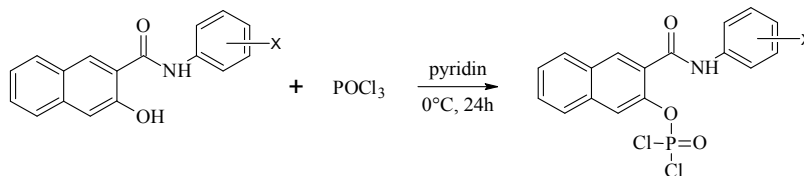
Kết quả khảo sát được thể hiện trong các bảng 3-5.

3. Thảo luận kết quả

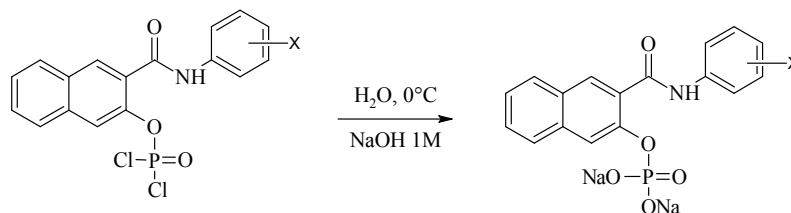
3.1. Tổng hợp cơ chất Naphthol AS-X photphat

Quy trình tổng hợp Naphthol AS-X photphat được thực hiện qua 3 giai đoạn theo [6]:

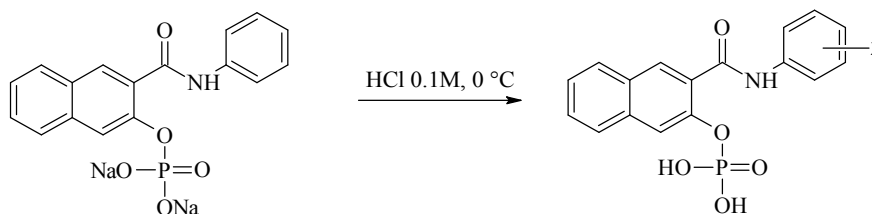
a. Tổng hợp 3-[(N-aryl) cacbamoyl] naphthalen-2-yl photphodiclorat:



b. Tổng hợp dinatri-3-[(N-aryl) cacbamoyl] naphthalen-2-yl photphat.



c. Tổng hợp 3-[(N-aryl) cacbamoyl] naphtalen-2-yl dihydroxyphotphat.



Theo quy trình thí nghiệm trên đã tổng hợp được 6 cơ chất với hiệu suất trong khoảng 40-50% và trong đó có 1 cơ chất là Naphtol AS-BO photphat là một cơ chất mới (bảng 1).

Độ tinh khiết của các cơ chất được kiểm tra bằng phổ IR và MS (bảng 2).

Bảng 1. Kết quả đã tổng hợp được 6 dẫn xuất naphtol AS-X photphat

Kí hiệu	Nhóm thế -X	Tên cơ chất
I	<i>o</i> - CH ₃	Naphtol AS-D photphat
II	<i>o</i> - OCH ₃	Naphtol AS-OL photphat
III	<i>m</i> -, <i>o</i> - OCH ₃ ; <i>p</i> - Cl	Naphtol AS-LC photphat
IV	<i>m</i> - NO ₂	Naphtol AS-BS photphat
V	<i>m</i> - Cl; <i>o</i> - OCH ₃	Naphtol AS-CA photphat
VI	N- naphtyl	Naphtol AS-BO photphat

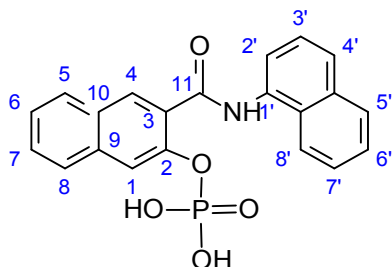
Bảng 2. Hiệu suất, một số hằng số hóa lý, phổ IR và MS của các cơ chất đã tổng hợp được

Kí hiệu	M (g/mol)	H (%)	T _{nc} ⁰ C	IR (KBr; ν, cm ⁻¹)	ESI-MS, m/z [Itd] (%)
I	357,30	44	100-103	3394,7 (N-H); 1651,1 (C=O) 1232,5; 1166,9; 1062,8 (P-O/ C-O); 3020,1 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 356,3
II	373,30	36	190-192	3350,4 (N-H); 1641,4 (C=O) 1261,4; 1168,9; 1053,1 (P-O/ C-O); 3035,9; 3061,0 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 371,9 [M+H] ⁺ = 373,9
III	437,77	24	155-157	3346,5 (N-H); 1625,9 (C=O) 1240,2; 1178,5; 1068,5 (P-O/ C-O); 3016,6; 3076,4 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 435,8 [M+H] ⁺ = 437,9
IV	388,27	58	83-85	3329,1 (N-H); 1678,0 (C=O); 1253,7; 1111,0; 1056,9 (P-O/ C-O); 3070,6 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 386,9 [M+H] ⁺ = 388,9
V	407,74	53	154-156	3367,7 (N-H); 1647,2 (C=O); 1255,6; 1168,8; 1068,5 (P-O/ C-O); 3064,8 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 405,9 [M+H] ⁺ = 407,9
VI	393,33	56	141-143	3574,1 (N-H); 1662,6 (C=O); 1247,9; 1166,9; 1087,8 (P-O/ C-O); 3068,7 (C _{sp2} - H)	[M-H] ⁻ = 391,9 [M+H] ⁺ = 394,0

Trên phổ IR có các hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị N-H amit bậc 2 ở 3350 cm⁻¹; dao động hóa trị C=O của amit ở 1650 cm⁻¹; dao động biến dạng của liên kết N-H ở 1530

cm⁻¹ bị chồng chập lẫn vào vùng dao động hóa trị của liên kết C=C của vòng thơm; các dao động hóa trị C_{sp2}-H cũng xuất hiện ở 3050 cm⁻¹.

Phổ MS của hợp chất Naphtol AS-X photphat cho nhiều phân mảnh do cấu trúc kém bền của phân tử. Các pic tương ứng với ion phân tử $[M-H]^-$ và $[M+H]^+$ phù hợp với phân tử khối của hợp chất tổng hợp được.



Naphtol AS-BO photphat

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của Naphtol AS-BO photphat (DMSO; δ , ppm; J, Hz): 10.97 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, H-4), 8.30 (d, $^3J=9.0$, 1H, H-5'), 8.07 (d, $^3J=8.0$, 1H, H-5), 7.96 (d, 2H, H-1, H-8'), 7.90 (dd, 2H, H-8, H-4'), 7.83 (d, $^3J=8.0$, 1H, H-2'), 7.76 – 7.45 (m, 5H, H-3', H-6', H-7', H-6, H-7). Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của Naphtol AS-BO photphat cho xuất hiện singlet tại 10.966 ppm của proton trong liên kết N-H (amit), không thấy xuất hiện proton nhóm OH của photphat, có lẽ do proton của OH dễ bị mất khi trong dung môi có vết nước.

Kết quả xác định phổ IR và MS cho thấy các cơ chất có độ tinh khiết cần thiết để tiến hành thí nghiệm nhuộm tế bào.

3.2. Nhuộm kỹ thuật photphataza

Các cơ chất tổng hợp được ở trên được đem đi nhuộm hóa học tế bào kỹ thuật nhuộm photphataza thấy rằng tất cả các cơ chất tổng hợp được đều cho kết quả dương tính đặc hiệu với các tế bào dòng bạch cầu: bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa axit, bạch cầu ưa bazơ.

Sau khi thực hiện thí nghiệm khảo sát dung dịch đệm tối ưu, thời gian nhuộm chất cần phát hiện tối ưu, nghiên cứu đã thu được kết quả điều kiện nhuộm tối ưu là ở 37°C , dung dịch đệm photphataza kiềm với thời gian nhuộm chất cần phát hiện là 60 phút.

Bảng kết quả nhuộm thử của cơ chất tổng hợp được tại điều kiện tối ưu so với mẫu đối chứng là cơ chất chuẩn Naphtol AS-BI photphat sản phẩm của Sigma Aldrich được trình bày trong bảng 4.

Hình ảnh kết quả nhuộm trên mẫu máu ngoại vi của người khỏe mạnh cho kết quả dương tính đặc hiệu trên dòng tế bào bạch cầu của cơ chất tổng hợp được trình bày trong bảng 5.

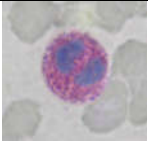
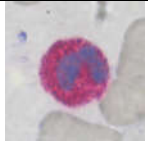
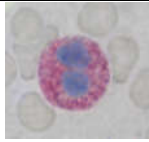

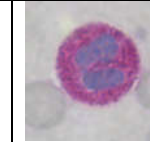
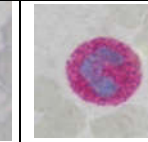
Bảng 3. Bảng kết quả thí nghiệm khảo sát dung dịch đệm tối ưu (%)

Cơ chất Hệ đệm	I	II	III	IV	V	VI
(a)	80 (20,0%)	78 (19,5%)	56 (14,0%)	100 (25%)	89 (22,25%)	85 (21,25%)
(b)	75 (18,75%)	80 (20,0%)	65 (16,25%)	85 (21,25%)	88 (22,0%)	75 (18,75%)
(c)	82 (20,0%)	110 (27,5%)	80 (20,0%)	109 (27,25%)	85 (21,25%)	80 (20,25%)
(d)	76 (19,0%)	90 (22,5%)	40 (10,0%)	95 (23,75%)	60 (15,0%)	65 (16,25%)
(e)	50 (12,5%)	70 (17,5%)	Âm tính	60 (36,26%)	Âm tính	Âm tính
(f)	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
(g)	114 (28,5%)	145 (36,25%)	72 (18,0%)	133 (33,25%)	100 (25,0%)	117 (29,25%)
(h)	66 (16,5%)	100 (25,0%)	60 (15,0%)	95 (23,75%)	60 (15,0%)	75 (18,75%)
(i)	96 (24,0%)	120 (30,0%)	80 (20,0%)	115 (28,75%)	76 (19,0%)	75 (18,75%)

Bảng 4. Kết quả nhuộm bằng cơ chất naphthol AS-X tổng hợp được so với sản phẩm của Sigma

Cơ chất	Mẫu máu							
	5114	6103	5030	5041	6863	5077	5036	6844
Naphthol AS-BI photphat - Sigma	67	137	226	103	87	201	378	180
I	16.75%	34.25%	56.50%	25.75%	21.75%	50.25%	94.50%	45.00%
II	87	97	150	83	77	90	286	135
III	21.75%	24.25%	37.50%	20.75%	19.25%	22.50%	71.50%	33.75%
IV	95	116	160	113	94	165	372	186
V	23.75%	29.00%	40.00%	28.25%	23.50%	41.25%	93.00%	46.50%
VI	89	103	204	88	86	135	364	167
I	22.25%	25.75%	51.00%	22.00%	21.50%	33.75%	91.00%	41.75%
II	75	139r	126	96	85	150	375	199
III	18.75%	34.75%	31.50%	24.00%	21.25%	37.50%	93.75%	49.75%
IV	84	127	212	108	66	93	338	213
V	21.00%	31.75%	53.00%	27.00%	16.50%	23.25%	84.50%	53.25%
VI	99	116	217	116	120	163	350	163
I	24.75%	29.00%	54.25%	29.00%	30.00%	40.75%	87.50%	40.75%

Bảng 5. Hình ảnh nhuộm thử trên mẫu bệnh phẩm bằng cơ chất naphthol AS-X

Cơ chất tổng hợp	I	II	III	IV	V	VI
Hình ảnh tế bào bạch cầu dương tính nhuộm photphataza						

4. Kết luận

1. Đã tổng hợp được 6 dẫn xuất naphthol AS thế photphat làm cơ chất nhuộm photphataza đặc hiệu bạch cầu người, trong đó có 1 hợp chất mới; đã cải tiến việc tinh chế naphthol AS-X photphat so với quy trình trong tài liệu [6] bằng cách hòa tan kết tủa trong hỗn hợp dung môi nước: THF tỷ lệ 1:5. Kết quả thu được sản phẩm naphthol AS-X photphat có độ tinh khiết cao.

2. Đã tiến hành nhuộm thử nghiệm photphataza đặc hiệu tế bào bạch cầu người bằng các dẫn xuất naphthol AS-X photphat tổng hợp được. Kết quả cho thấy các cơ chất tổng hợp được có độ nhạy và tính đặc hiệu đối với các tế bào bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa axit và bạch cầu ưa bazo tương đương với các cơ chất tương ứng nhập ngoại.

Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Thị Vinh An, Phạm Quang Vinh, Phan Văn Chi, Nguyễn Thị Bích Nhi, “Bước đầu tìm hiểu một số biến đổi protein ở bệnh nhân loxêmi cấp dòng lympho tại khoa Huyết học Truyền máu bệnh viện Bạch Mai”, Tạp chí Y học Việt Nam, T.373 (2), 267-270, (2010).
- [2] Rebecca L. Siegel, Kimberly D. Miller and Ahmedin Jemal, “Cancer Statistics”, CA cancer J Clin 2016, vol 66, pp. 7–30, (2016).
- [3] Bennett JM., Catovsky D., Daniel MT., “Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group”, Br. J. Haematol, Vol.33 (4), 451–458, (1976).
- [4] Trần Văn Tĩnh, Tổng hợp cơ chất, chế tạo kit và nghiên cứu điều kiện tối ưu để nhuộm tế bào phục vụ chẩn đoán bệnh ung thư bạch cầu người, Luận án Tiến sĩ hóa học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên-ĐHQGHN, (2012).

[5] Trần Văn Tính, Bùi Thanh Hương, Nguyễn Đắc Thảo, Nghiên cứu chế tạo bộ kit nhuộm hóa học tế bào để chẩn đoán các dòng tế bào trong bệnh ung thư máu, Bệnh viện 19-8, Bộ công an, (2015).

[6] Vaughan A., Guilbault GG., and Hackney D., Fluorometric Methods for Analysis of Acid and Alkaline Phosphatase, Analytical chemistry, Vol.43(6), 721-724, (1971).

Synthesis of Naphthol as-substituted Phosphate using as Substrates for Phosphatase in Human Leukemia Staining

Tran Thi Hoa¹, Tran Thi Thanh Tam¹,
Nguyen Dinh Duy³, Luu Van Boi¹, Tran Van Tinh²

¹Faculty of Chemistry, VNU University of Science, 19 Le Thanh Tong, Hanoi, Vietnam

²Blood transfusion- Hematology Center, 19-8 Hospital

³HUS High School for Gifted Students, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Abstract: Naphthol AS-BI phosphate is used as substrate to classify leukocyte cell lines and differentiate T lymphocytes in acute leukemia. In order to expand the source of high sensitivity and specificity substrates with a reasonable price, in this study were synthesized 3-[(N-aryl)carbamoyl]-naphthalen-2-yl dihydroxyphosphate derivatives (naphthol AS-X phosphates) by reaction of naphthol AS-X with POCl₃ then hydrolyzed. The results of specific phosphatase cells staining using synthesized 6 naphthol AS-X phosphate derivatives showed that all of the substrates are positive with neutrophil, eosinophil and basophil.

Keywords: Naphthol AS-BI phosphate, Alkaline phosphatase, acute leukemia.