



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001849

(51)⁷ **C12Q 1/42**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00099

(22) 14.04.2017

(45) 25.10.2018 367

(43) 26.06.2017 351

(73) **TRẦN VĂN TÍNH (VN)**

Nhà thuốc Hiền Linh, 124A, đường Phúc Diễn, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(72) **Trần Văn Tính (VN), Trần Thị Hoa (VN), Trần Thị Thanh Tâm (VN)**

(54) **QUY TRÌNH TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ CƠ CHẤT NAPHTHOL AS-X
PHOSPHAT DÙNG TRONG NHUỘM HÓA HỌC TẾ BÀO**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat dùng trong phân tích tế bào. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tổng hợp được cơ chất naphthol AS-X phosphat từ naphthol AS-X cho hiệu suất lên tới 44%. Cơ chất theo giải pháp hữu ích thích hợp dùng trong nhuộm hóa học tế bào để phân loại các dòng bạch cầu ác tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực y dược và hóa hữu cơ, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tổng hợp và tinh chế dãy cơ chất naphthol AS-X phosphat dùng trong nhuộm hóa học tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh bạch cầu là một nhóm bệnh lý ác tính hệ thống tạo máu. 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 lấn át các tế bào bình thường trong tủy xương và máu ngoại vi. Theo thống kê của Tổ chức Sức khỏe Hoa Kỳ 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.

Các hợp chất của este phosphat có rất nhiều ứng dụng trong thực tế, trong đó các hợp chất naphthol AS-X phosphat có ứng dụng quan trọng được sử dụng làm cơ chất cho kỹ thuật nhuộm phosphataza trong nhuộm hóa học tế bào giúp chẩn đoán và điều trị bệnh bạch cầu kinh, bạch cầu cấp.

Trong cấu trúc của cơ chất naphthol AS-X phosphat có một nhóm mono este phosphat mà dưới tác dụng đặc hiệu của enzym phosphataza sẽ cắt đứt liên kết của nhóm este phosphat giải phóng naphthol AS-X ban đầu. Naphthol được sinh ra sau quá trình thủy phân của cơ chất dưới xúc tác enzym sẽ thực hiện phản ứng ghép cặp với muối diazo cho màu đặc trưng tùy vào loại muối diazo sử dụng. Phosphataza kiểm soát bạch cầu dương tính đối với dòng tủy từ hậu tủy bào đến bạch cầu hạt. Tế bào càng trưởng thành thì mức độ dương tính càng mạnh. Ngoài ra các tế bào tạo cốt bào cũng cho phản ứng dương tính trong kỹ thuật nhuộm này. Trong bệnh bạch cầu kinh dòng tủy, thiếu máu tan máu hoạt tính của phosphatase kiểm soát bạch cầu giảm; tăng trong nhiễm khuẩn cấp, lách to sinh tủy, phản ứng giả bạch cầu. Phosphataza axit dương tính mạnh trong bệnh bạch cầu cấp dòng lympho loại tế bào hairy (tế bào B), tế bào liên võng, hủy cốt bào và các nguyên mẫu tiểu cầu. Dòng hồng cầu, mono, lympho (trừ tế

bào B) và dòng tủy từ nguyên tủy bào đến tiền tủy bào đều cho kết quả âm tính. Vì vậy dựa vào kết quả nhuộm hóa học tế bào các bác sỹ có thể đưa ra các chẩn đoán lâm sàng về các bệnh bạch cầu kinh, bạch cầu cấp trong hệ thống tạo máu.

Hiện để phân loại các bệnh về máu theo tiêu chuẩn FAB (French-American-British) dựa trên kết quả của ba phương pháp: miễn dịch, di truyền và nhuộm hóa học tế bào. Do ưu điểm nhanh, dễ thao tác, giá thành thấp hơn so với hai phương pháp miễn dịch và di truyền, nên việc nhuộm hóa học tế bào được áp dụng rộng rãi trong nhiều bệnh viện và cơ sở nghiên cứu. Các nghiên cứu trước đây về dãy cơ chất naphthol đã chỉ ra rằng, các cơ chất naphthol AS-X phosphat có khả năng thay thế cơ chất naphthol AS-BI phosphat trong ứng dụng nhuộm tế bào. Theo đó, cần một quy trình sản xuất cơ chất naphthol AS- X phosphat thay thế cơ chất naphthol AS-BI phosphat.

Hiện phương pháp sản xuất cơ chất naphthol AS-X phosphat được thực hiện bằng cách tổng hợp từ hợp chất naphthol AS-X. Trong đó phương pháp sử dụng pyridin để hòa tan naphthol AS-X, sau khi phản ứng với phospho oxyclorea, cô quay ở 35°C, sau khi chiết bằng axeton và lọc, tiến hành kết tủa este phosphat trong môi trường axit. Phần kết tủa được hòa tan trong nước và chiết bằng hỗn hợp hexan-butanol (tỷ lệ 4/1) và sử dụng dietyl ete để tẩy màu. Sau đó, este phosphat thu được này được kết tủa bằng axit, sau khi sấy khô thu được sản phẩm. Tuy nhiên, việc cô quay dung môi pyridin ở điều kiện 35°C cần sử dụng thiết bị chuyên biệt vì pyridin bốc hơi và gây độc ở nhiệt độ cao. Ngoài ra, việc chiết bằng axeton, kết tủa bằng este phosphat trong điều kiện axit làm cho hiệu suất thu hồi cơ chất naphthol AS- X phosphat thấp.

Do đó, cần có quy trình sản xuất cơ chất naphthol AS-phosphat một cách đơn giản với hiệu suất cao và độ tinh khiết đủ để đáp ứng được yêu cầu sử dụng hợp chất này dùng trong nhuộm hóa học tế bào.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, các tác giả đã đề xuất quy trình tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat dùng trong nhuộm hóa học tế bào. Theo đó, quy trình tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách hòa tan hợp chất naphthol AS-X trong dung môi pyridin được làm khan bằng NaOH theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích), sau đó đưa nhiệt độ dung dịch phản ứng về 0°C;

b) tổng hợp 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat bằng cách bổ sung từ từ dung dịch POCl₃ vào dung dịch phản ứng thu được từ bước a) với tỷ lệ số mol theo lượng naphthol AS-X là 1,5 lần và khuấy đều trong 24 giờ ở 0°C thu được dung dịch chứa 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat;

c) tổng hợp dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat bằng cách bổ sung nước đá vào dung dịch thu được ở bước b) theo tỷ lệ 1:1, sau đó điều chỉnh pH của dung dịch về 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-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat;

d) thu cơ chất naphthol AS-X phosphat thô bằng cách bổ sung dung dịch HCl 0,1M vào dung dịch thu được ở bước c) cho tới khi xuất hiện kết tủa, sau đó lọc thu phần kết tủa, phần dịch lọc được bổ sung lượng nước đá theo tỷ lệ 1:1 và khuấy mạnh thu phần kết tủa, gộp phần kết tủa và rửa bằng dung dịch HCl 0,1M thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat thô dạng rắn màu nâu; và

e) tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat bằng cách hòa tan cơ chất naphthol AS-X phosphat thu được từ bước d) bằng NaOH 1M và lọc thu phần dịch, sau đó bổ sung dung môi tetrahydrofuran theo tỷ lệ tetrahydrofuran:nước là 1:5, sau đó đưa nhiệt độ dung dịch về 2-4°C và axit hóa bằng HCl 0,1M đến pH=4, sau đó đợi cho sản phẩm kết tinh lại rồi lọc thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat tinh khiết.

Theo một phương án ưu tiên, hợp chất naphthol AS-X được chọn từ nhóm bao gồm: naphthol AS-D (3-hydroxy-N-(2-methylphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-OL (3-hydroxy-N-(2-methoxyphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-BS (3-hydroxy-N-(3-nitrophenyl)-2-naphthalenecarboxamit) và naphthol AS-CA (N-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3hydroxynaphthalene-2-carboxamit).

Theo một phương án ưu tiên, cơ chất naphthol AS-X phosphat thu được theo giải pháp hữu ích bao gồm: cơ chất naphthol AS-D phosphat, naphthol AS-OL phosphat, naphthol AS-BS phosphat hoặc naphthol AS-CA phosphat.

Theo một phương án ưu tiên, nhiệt độ trong quá trình tổng hợp cơ chất naphthol AS-X phosphat được duy trì ở 0°C và nhiệt độ tinh sạch cơ chất này nằm trong khoảng từ 0 đến 4°C.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả phân tích phổ MS của naphthol AS-D phosphat $[M-H]^-$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là kết quả phân tích phổ IR của naphthol AS-D phosphat thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 3 là kết quả phân tích phổ MS của naphthol AS-OL phosphat $[M-H]^-$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 4 là kết quả phân tích phổ MS của naphthol AS-OL phosphat $[M+H]^+$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 5 là kết quả phân tích phổ IR của naphthol AS-OL phosphat thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 6 là kết quả phân tích phổ MS của naphthol AS-BP phosphat $[M-H]^-$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 7 là kết quả phân tích phổ MS của naphthol AS-BP phosphat $[M+H]^+$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 8 là kết quả phân tích phổ IR của naphthol AS-BP phosphat thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 9 là phổ MS của naphthol AS-CA phosphat $[M-H]^-$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 10 là phổ MS của naphthol AS-CA phosphat $[M+H]^+$ thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

Hình 11 là phổ IR của naphthol AS-CA phosphat thu được từ Ví dụ 1 theo giải pháp hữu ích.

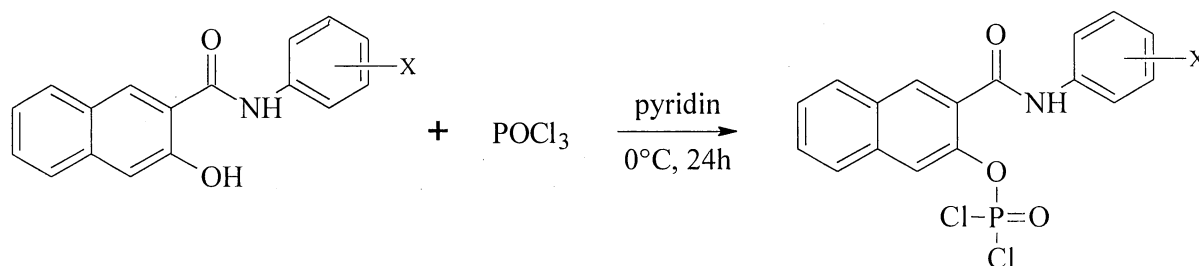
Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm bộc lộ giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

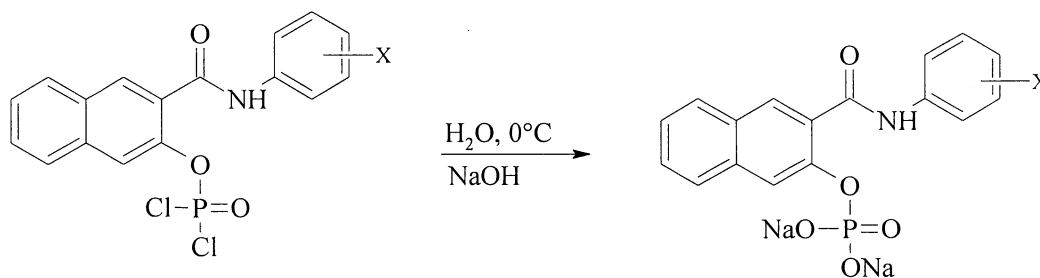
Tên các hợp chất được sử dụng theo giải pháp hữu ích được sử dụng là các hóa chất đã biết, ví dụ naphthol AS là hợp chất có công thức hóa học $C_{17}H_{13}NO_2$ còn được gọi là 3-hydroxy-2-naphthanilit, các hợp chất naphthol AS-D (3-hydroxy-N-(2-methylphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-OL (3-hydroxy-N-(2-methoxyphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-BS (3-hydroxy-N-(3-nitrophenyl)-2-naphthalenecarboxamit) và naphthol AS-CA (N-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3hydroxynaphthalene-2-carboxamit) là các dẫn xuất của chúng. Các hợp chất được sử dụng như nguyên liệu của quy trình theo giải pháp hữu ích này đã được bán trên thị trường.

Về bản chất, quá trình tổng hợp cơ chất theo giải pháp hữu ích được thực hiện theo quy trình phản ứng bao gồm ba giai đoạn từ hợp chất naphthol AS-X như sau:

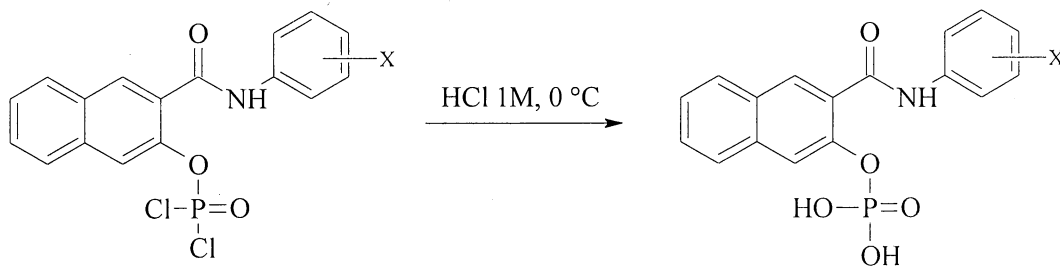
Giai đoạn 1: Tổng hợp 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat.



Giai đoạn 2: Tổng hợp dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat.



Giai đoạn 3: Tổng hợp 3[(N-phenyl) carbamoyl] naphthalen-2-yl dihydroxylphosphat.



Theo đó, quy trình tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat dùng trong nhuộm hóa học tế bào bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) tổng hợp 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat; c) tổng hợp dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat; d) thu cơ chất naphthol AS-X phosphat thô; và e) tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, hợp chất naphthol AS-X được hòa tan trong dung môi pyridin. Dung môi pyridin này được làm khan bằng NaOH khan. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi pyridin hòa tan theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích). Theo các phương án ưu tiên, các hợp chất naphthol AS-X được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để tổng hợp cơ chất naphthol AS-phosphat được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất naphthol AS-D (3-hydroxy-N-(2-methylphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-OL (3-hydroxy-N-(2-methoxyphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-BS (3-hydroxy-N-(3-nitrophenyl)-2-naphthalenecarboxamit) và naphthol AS-CA (N-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3hydroxynaphthalene-2-carboxamit).

Trong bước tổng hợp 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat, sau khi hợp chất naphthol AS-X được hòa tan trong dung môi pyridin, tiến hành bổ sung từ từ dung dịch POCl₃ vào dung dịch phản ứng thu được ở trên theo tỷ lệ 1.5 lần số mol Naphthol AS-X phản ứng. Sau đó khuấy đều trong 24 giờ ở điều kiện nhiệt độ 0°C, để phản ứng ở giai đoạn 1 như đã nêu ở trên xảy ra hoàn toàn thu được dung dịch chứa 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat.

Trong bước tổng hợp dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat, dung dịch chứa 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat thu được ở trên được bổ sung nước đá theo tỷ lệ 1:1. Tiếp đó, điều chỉnh pH của dung dịch về pH=8 bằng dung dịch NaOH 1M và khuấy đều khoảng 15 phút để phản ứng thủy

phân xảy ra hoàn toàn. Khi đó phản ứng theo giai đoạn 2 xảy ra, kết quả thu được dung dịch chứa di natri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat.

Trong bước thu cơ chất naphthol AS-X phosphat thô, dung dịch chứa dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat ở trên được bổ sung một lượng dung dịch HCl 0,1M cho tới khi xuất hiện kết tủa. Phản ứng theo giai đoạn 3 xảy ra và xuất hiện kết tủa khi pH giảm. Tiếp đó, lọc phần kết tủa, phần dịch lọc được bổ sung một lượng nước đá theo tỷ lệ 1:1 và khuấy mạnh. Sau khi kết tủa xảy ra, lọc thu phần kết tủa và gộp chung với phần kết tủa thu được ở trên. Tiếp đó rửa phần kết tủa này bằng dung dịch HCl 0,1M, thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat thô dạng rắn màu nâu.

Trong bước tinh chế cơ chất naphthol AS-phosphat, cơ chất naphthol AS-X phosphat thô thu được ở trên được hòa tan bằng NaOH 1M. Sau khi lọc bỏ phần không tan, thu được phần dịch. Tiếp đó bổ sung dung môi tetrahydrofuran (THF) theo tỷ lệ tetrahydrofuran:nước là 1:5. Tiếp đó đưa nhiệt độ dung dịch về 2-4°C và axit hóa bằng HCl 0,1M đến pH=4, sau đó để yên đợi kết tinh lại và lọc thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat tinh khiết.

Theo một phương án ưu tiên, quy trình theo giải pháp hữu ích có thể tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat. Theo các phương án ưu tiên, cơ chất naphthol AS-X phosphat thu được này là naphthol AS-D phosphat, naphthol AS-OL phosphat, naphthol AS-BS phosphat hoặc naphthol AS-CA phosphat.

Theo một phương án ưu tiên, nhiệt độ trong quá trình tổng hợp cơ chất naphthol AS-X phosphat được duy trì ở 0°C và nhiệt độ tinh sạch cơ chất này nằm trong khoảng từ 0 đến 4°C.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Tổng hợp cơ chất naphthol AS-X phosphat

Hòa tan 1,0 gam naphthol AS-D (3,426 mmol) trong 10 ml dung môi pyridin khan (được làm khan bằng NaOH) sau đó đưa nhiệt độ hệ phản ứng về 0°C.

Nhỏ từ từ từng giọt 0,481 ml dung dịch POCl₃ (5,139 mmol), khuấy đều trong 24h, tại 0°C. Sau đó bổ sung 15ml nước đá vào bình phản ứng, điều chỉnh pH của dung dịch về pH=8 bằng dung dịch NaOH 1M. Khuấy đều khoảng 15 phút để phản ứng thủy phân xảy ra hoàn toàn.

Tiếp đó bổ sung dung dịch axit HCl 0,1M đồng thời khuấy mạnh cho tới khi xuất hiện kết tủa. Lọc thu kết tủa, sau đó bổ sung 20 ml nước đá vào trong dung dịch lọc phản ứng, khuấy mạnh cho tới khi xuất hiện kết tủa thì lọc thu kết tủa. Gộp chung phần kết tủa và rửa nhiều lần bằng dung dịch HCl 0,1M thu được phần chất rắn màu nâu là cơ chất naphthol AS-D phosphat thô.

Hòa tan hoàn toàn sản phẩm naphthol AS- D phosphat thô thu được ở trên bằng 10 ml NaOH 1M, và lọc dung dịch bằng giấy lọc. Sau đó bổ sung dung môi tetrahydrofuran (THF) ở 0°C theo tỉ lệ THF: H₂O = 1:5. Tiếp đó axit hóa để dung dịch kết tinh lại bằng dung dịch HCl 0,1M đến pH=4 rồi để yên cho đến khi sản phẩm naphthol AS-D phosphat tự kết tinh lại. Sau đó, lọc thu được 0,5414 gam cơ chất naphthol AS-D phosphat. Hiệu suất tổng hợp và tinh chế đạt 44%.

Tiến hành tổng hợp các cơ chất naphthol AS-OL phosphat, naphthol AS-BS phosphat và naphthol AS-CA phosphat như trên, chỉ khác là hợp chất ban đầu sử dụng được thay thế bằng naphthol AS-OL (3-hydroxy-N-(2-methoxyphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-BS (3-hydroxy-N-(3-nitrophenyl)-2-naphthalenecarboxamit) và naphthol AS-CA (N-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamit), tương ứng. Kết quả thu được 4 cơ chất naphthol AS-X phosphat như sau:

STT	Tên cơ chất	Nhóm thế -X
1	Naphthol AS-D phosphat	<i>o</i> - CH ₃
2	Naphthol AS-OL phosphat	<i>o</i> - OCH ₃
3	Naphthol AS-BS phosphat	<i>o</i> - NO ₂
4	Naphthol AS-CA phosphat	<i>m</i> - Cl ; <i>o</i> - OCH ₃

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc và nhóm thế của cơ chất naphthol AS- X phosphat

Để xác định cấu trúc và kiểm tra mức độ tinh khiết của bốn hợp chất thu được. Tiến hành xác định phổ IR, MS theo các phương pháp chuẩn. Kết quả cho thấy phổ IR có các pic hấp thụ đặc trưng với các nhóm chức tương ứng có mặt trong phân tử cơ chất: dao động hóa trị N-H đặc trưng cho amit bậc 2 xuất hiện ở gần vùng có số sóng 3350 cm⁻¹; dao động hóa trị C=O đặc trưng cho nhóm cacbonyl của amit xuất hiện gần vùng có số sóng 1650 cm⁻¹; dao động biến dạng của liên kết N-H trong vùng gần

1530 cm^{-1} bị chồng chập lẫn vào vùng dao động hóa trị của liên kết $\text{C}=\text{C}$ của vòng thơm; các dao động hóa trị $\text{P}-\text{O}$ và $\text{C}-\text{O}$ cũng chồng lẫn vào nhau cho các đỉnh hấp thụ có cường độ mạnh, chân pic rộng nằm trong vùng 1200-1000 cm^{-1} ; các giá trị dao động hóa trị Csp^2-H cũng xuất hiện đặc trưng gần 3050 cm^{-1} . Kết quả đo phổ được thể hiện trong các hình từ Hình 1 đến 11.

Phổ MS của hợp chất naphthol AS-X phosphate cho nhiều phân mảnh do cấu trúc kém bền của phân tử. Các pic tương ứng với phân mảnh $[\text{M}-\text{H}]^-$ và $[\text{M}+\text{H}]^+$ cho thấy các giá trị phù hợp với phân tử khối dự kiến của hợp chất cần tổng hợp.

Đo nhiệt độ nóng chảy của chất sản phẩm có nhiệt độ nóng chảy sản phẩm thu được kết quả nhiệt độ nóng chảy khá cao và sắc nét, điều này cho thấy rằng hợp chất thu được theo giải pháp hữu ích có độ tinh khiết cao. Kết quả tổng hợp, dữ liệu phổ IR và MS của cơ chất naphthol AS-X phosphat như sau:

stt	M (g/mol)	H (%)	$T_{nc}^{\circ}\text{C}$	IR (cm^{-1})	MS
1	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 ($\text{C}_{sp^2}-\text{H}$)	$[\text{M}-\text{H}]^- = 356,26$
2	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 ($\text{C}_{sp^2}-\text{H}$)	$[\text{M}-\text{H}]^- = 371,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 373,9$
3	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 ($\text{C}_{sp^2}-\text{H}$)	$[\text{M}-\text{H}]^- = 386,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 388,9$
4	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 ($\text{C}_{sp^2}-\text{H}$)	$[\text{M}-\text{H}]^- = 405,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 407,9$

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tổng hợp được cơ chất naphthol AS-X phosphat tinh khiết có thể ứng dụng được trong kỹ thuật nhuộm hóa học tế bào để phân loại bệnh bạch cầu. Bằng cách cải tiến phương pháp tổng hợp, sử dụng kỹ thuật kết tủa bằng cách điều chỉnh pH và độ phân cực của dung môi, cho phép tổng hợp và tinh chế được cơ chất naphthol AS-X phosphat, mà không phải sử dụng kỹ thuật cô quay ở nhiệt độ cao làm phát tán dung dịch pyridin độc hại cho người thao tác.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép sản xuất được cơ chất naphthol AS-X phosphat với hiệu suất lên tới 44%, bằng quy trình kết tinh lại đơn giản ở nhiệt độ thấp từ 0-4°C trong quá trình tinh chế sản phẩm. Sản phẩm thu được có độ đồng nhất và tinh sạch đủ đáp ứng các yêu cầu ứng dụng trong nhuộm hóa học tế bào.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện, giảm được việc phụ thuộc vào các thiết bị tổng hợp chuyên dụng, quá trình tinh chế không cần các kỹ thuật tinh chế, phức tạp, hiệu suất tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat lên tới 44%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tổng hợp và tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat dùng trong nhuộm hóa học tế bào, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách hòa tan hợp chất naphthol AS-X trong dung môi pyridin được làm khan bằng NaOH theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích), sau đó đưa nhiệt độ dung dịch phản ứng về 0°C;

b) tổng hợp 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat bằng cách bổ sung từ từ dung dịch POCl₃ vào dung dịch phản ứng thu được từ bước a) với tỷ lệ số mol theo lượng naphthol AS-X là 1,5 lần và khuấy đều trong 24 giờ ở 0°C thu được dung dịch chứa 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphorodichloridat;

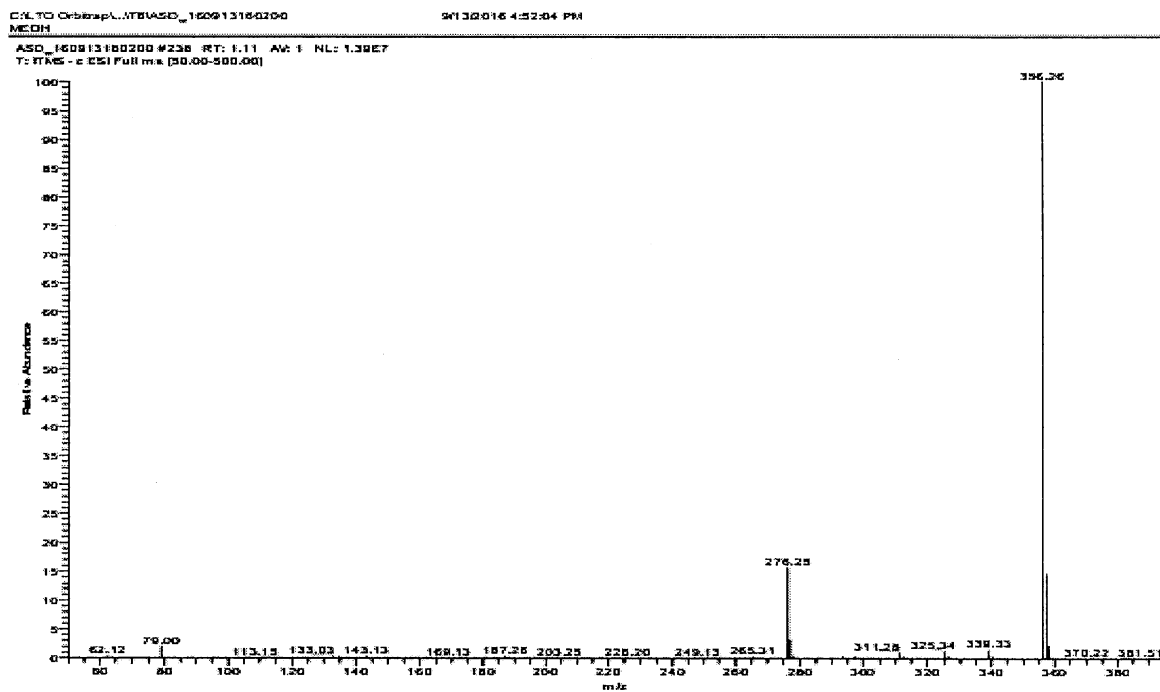
c) tổng hợp dinatri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat bằng cách bổ sung nước đá vào dung dịch thu được ở bước b) theo tỷ lệ 1:1, sau đó điều chỉnh pH của dung dịch về pH=8 bằng dung dịch NaOH 1M và khuấy đều khoảng 15 phút để phản ứng thủy phân xảy ra hoàn toàn, thu được dung dịch chứa di natri 3-[(N-phenyl) carbamoyl]naphthalen-2-yl phosphat;

d) thu cơ chất naphthol AS-X phosphat thô bằng cách bổ sung dung dịch HCl 0,1M vào dung dịch thu được ở bước c) cho tới khi xuất hiện kết tủa, sau đó lọc thu phần kết tủa, phần dịch lọc được bổ sung lượng nước đá theo tỷ lệ 1:1 và khuấy mạnh thu phần kết tủa, gộp phần kết tủa và rửa bằng dung dịch HCl 0,1M thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat thô dạng rắn màu nâu; và

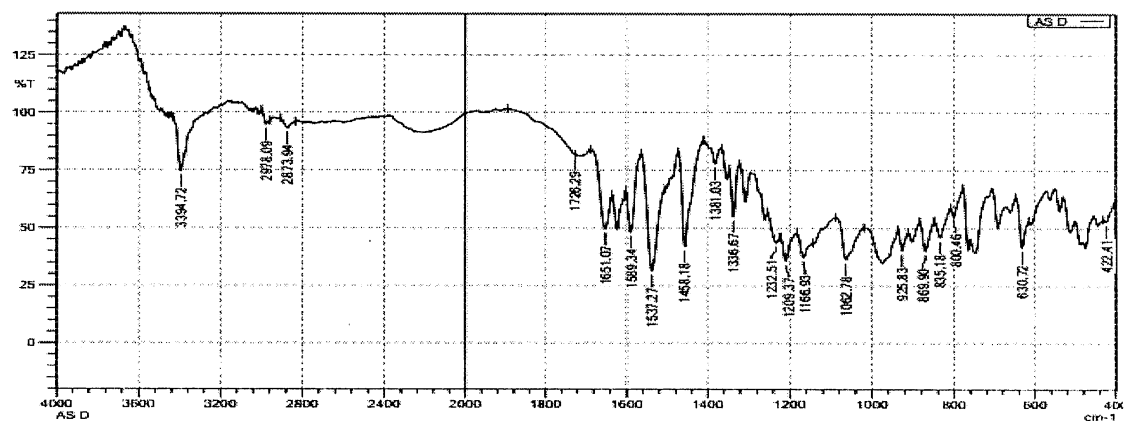
e) tinh chế cơ chất naphthol AS-X phosphat bằng cách hòa tan cơ chất naphthol AS-X phosphat thu được từ bước d) bằng NaOH 1M và lọc thu phần dịch, sau đó bổ sung dung môi tetrahydrofuran theo tỷ lệ tetrahydrofuran:nước là 1:5, sau đó đưa nhiệt độ dung dịch về 2-4°C và axit hóa bằng HCl 0,1M đến pH=4, sau đó đợi cho sản phẩm kết tinh lại rồi lọc thu được cơ chất naphthol AS-X phosphat tinh khiết.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó hợp chất naphthol AS-X được chọn từ nhóm bao gồm: naphthol AS-D (3-hydroxy-N-(2-methylphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-OL (3-hydroxy-N-(2-methoxyphenyl)-2-naphthalenecarboxamit), naphthol AS-BS (3-hydroxy-N-(3-nitrophenyl)-2-naphthalenecarboxamit) và naphthol AS-CA (N-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamit).

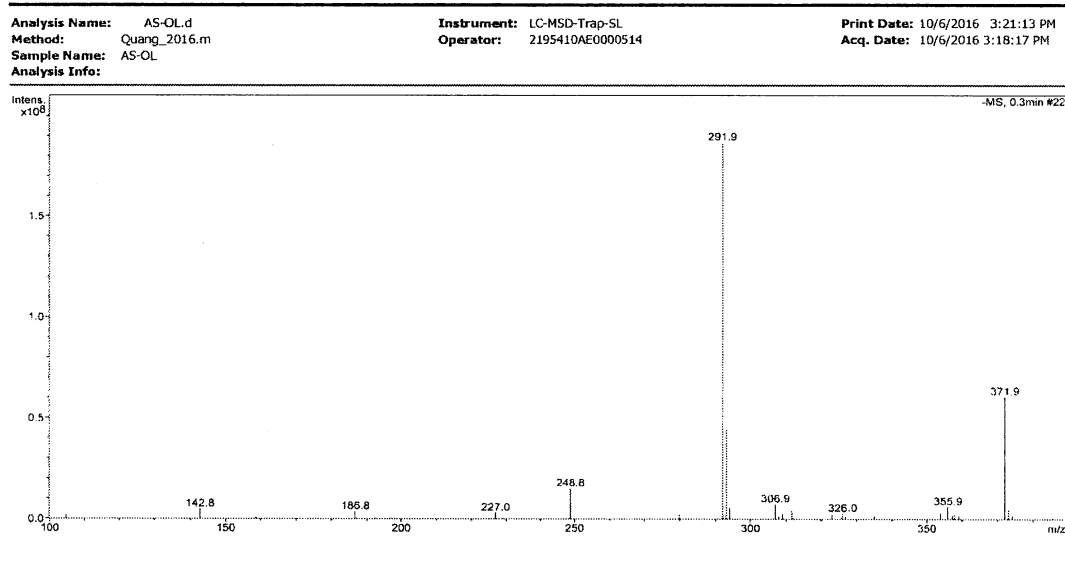
HÌNH 1



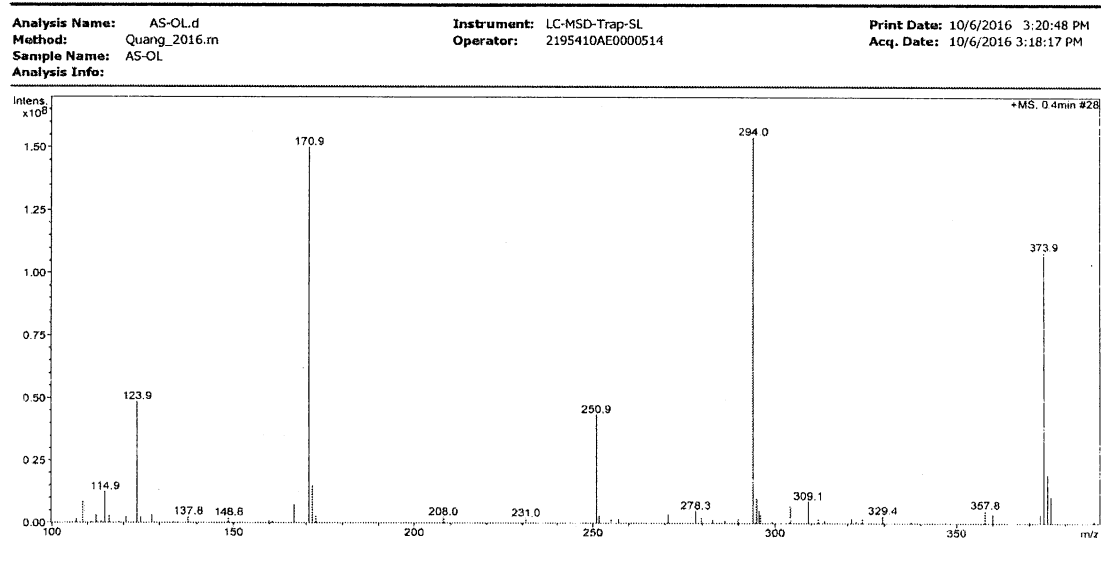
HÌNH 2



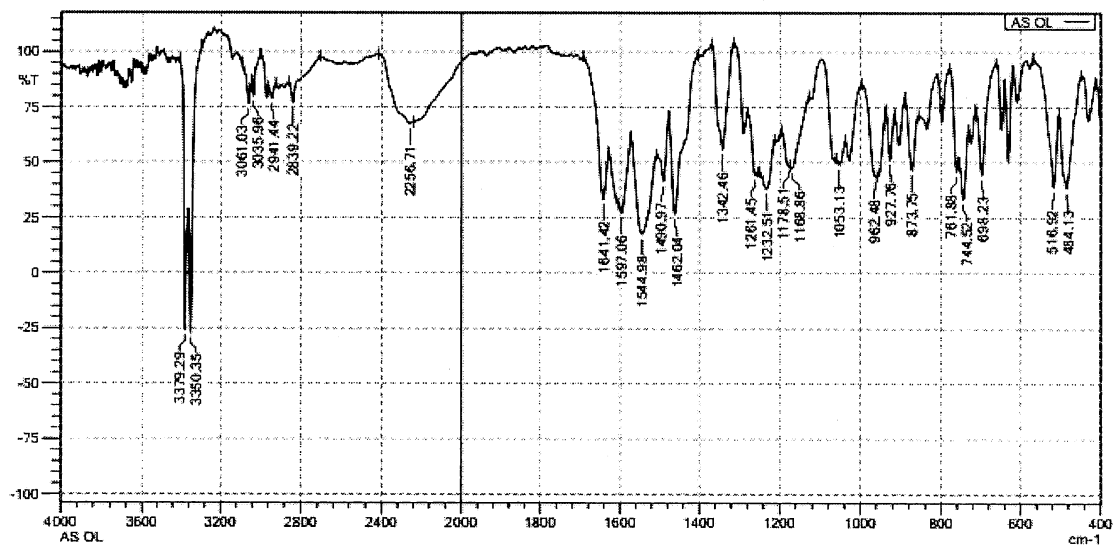
HÌNH 3



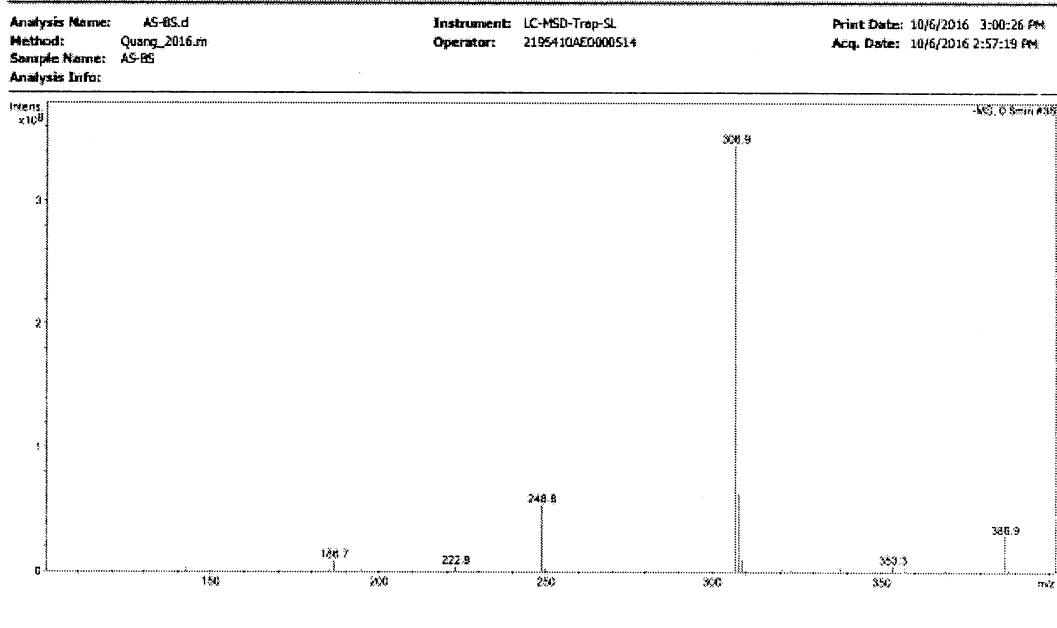
HÌNH 4



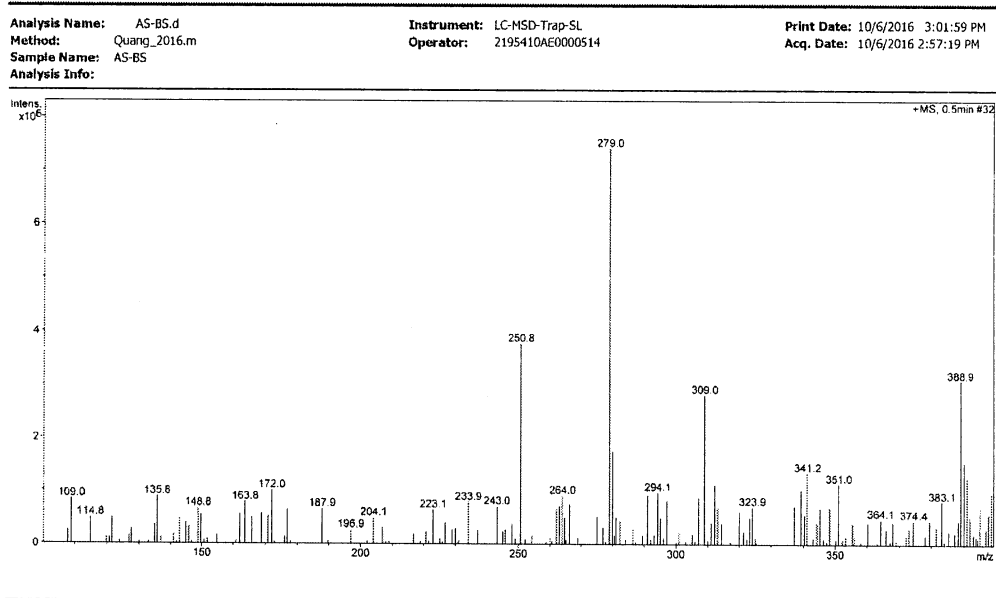
HÌNH 5



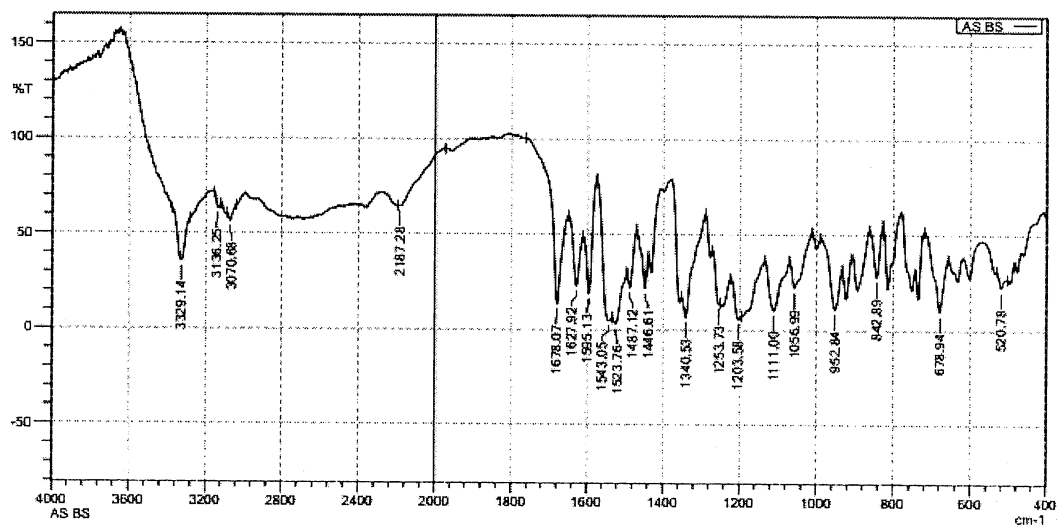
HÌNH 6



HÌNH 7

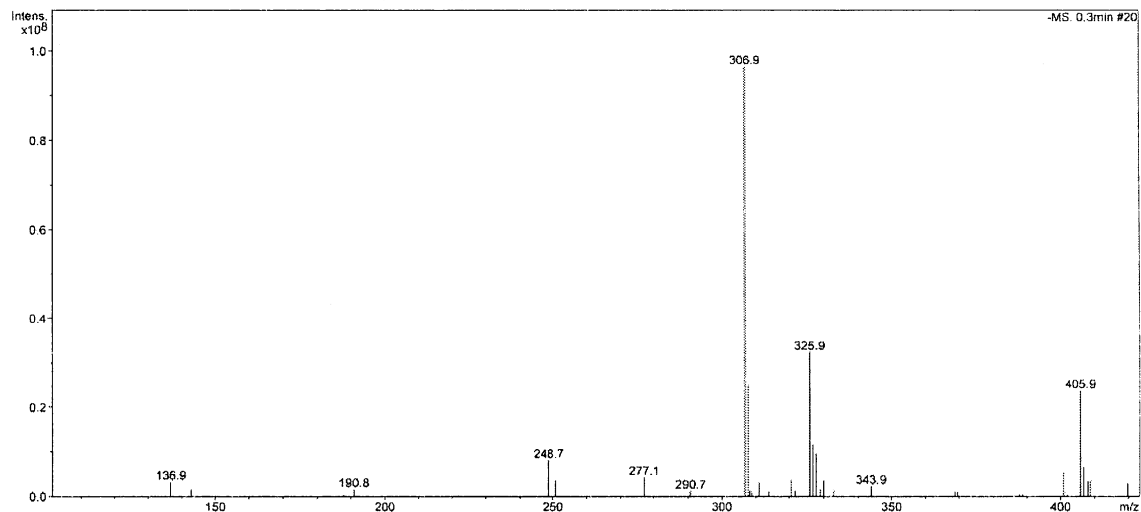


HÌNH 8



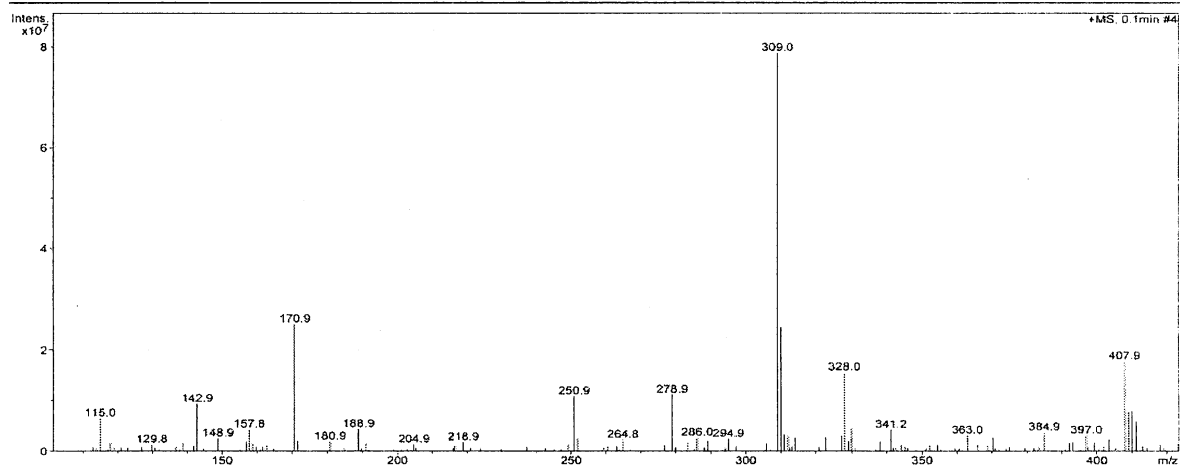
HÌNH 9

Analysis Name: AS-CA.d Instrument: LC-MSD-Trip-SL Print Date: 10/6/2016 3:08:41 PM
Method: Quang_2016.m Operator: 2195410AE0000514 Acq. Date: 10/6/2016 3:05:29 PM
Sample Name: AS-CA
Analysis Info:



HÌNH 10

Analysis Name: AS-CA.d Instrument: LC-MSD-Trip-SL Print Date: 10/6/2016 3:08:07 PM
Method: Quang_2016.m Operator: 2195410AE0000514 Acq. Date: 10/6/2016 3:05:29 PM
Sample Name: AS-CA
Analysis Info:



HÌNH 11

