

# Биологическая активность новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов

**Офицерова Е. С.**

*аспирант, кафедра органической химии*

**Алексеева Л. Н.**

*к.фарм.н.*

**Шкляренко А. А.**

*аспирант, кафедра органической химии*

**Яковлев И. П.**

*д.х.н., профессор*

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, Россия*

**Автор для корреспонденции:** Офицерова Екатерина Сергеевна, **e-mail:** OfizerovaES@mail.ru

**Финансирование:** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Аннотация

В настоящей статье представлены результаты исследования биологической активности новых синтезированных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов. Острую токсичность 2-арил-6-(метилтио)-4-хлор-2H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов определяли экспериментально на нелинейных белых мышах-самцах общей массой 16-20 г. Для экспериментальной оценки анальгезирующей активности использовали модель генерации уксуснокислых «корчей» у мышей самцов. Экспериментально было подтверждено, что синтезированные новые 2-арил-6-(метилтио)-4-хлор-2H-пиразоло[3,4-d]пиримидины нетоксичны и обладают выраженной анальгезирующей активностью.

**Ключевые слова:** 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидины, биологическая активность, программа PASS, острая токсичность, анальгезирующая активность

**doi:** 10.29234/2308-9113-2020-8-3-76-84

**Для цитирования:** Офицерова Е. С., Алексеева Л. Н., Шкляренко А. А., Яковлев И. П. Биологическая активность новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов. *Медицина* 2020; 8(3): 76-84.

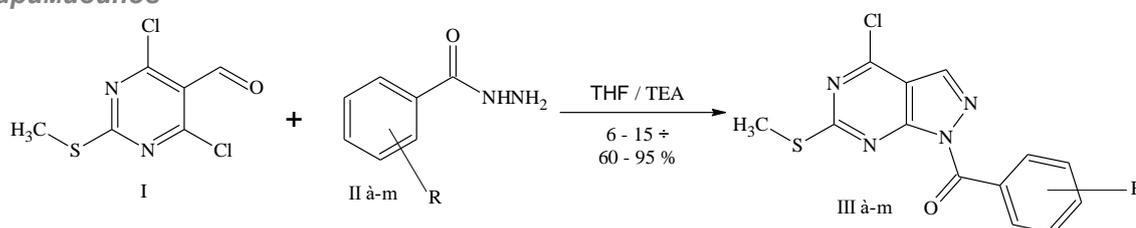
## Введение

Пиразолопиримидины представляют собой конденсированные гетероциклические системы, структурно напоминающие производные пуринов [1]. Простейшими представителями данного класса соединений являются Аллопуринол и его метаболит Оксопуринол, активно применяемые в терапии гиперурецемии [2]. Среди пиразолопиримидинов были выявлены вещества, проявляющие противовирусную [3,4], противомикробную [5,6], противовоспалительную [7] активности. В последние несколько

десятилетний интерес к этим соединениям продолжает расти благодаря открытию их противоопухолевой активности [8,9]. В связи с этим, авторы приняли решение о поиске новых пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов и изучении их биологической активности.

Новые 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины получали взаимодействием 4,6-дихлор-2*S*-замещенного-пиримидин-5-карбальдегида (I) с замещенным бензгидразидом (IIа-м) в тетрагидрофуране [10] при нагревании перемешивали в течение 6-15 ч. Реакционную массу разбавляли водой и перемешивали. Полученный осадок фильтровали и промывали небольшим количеством воды. Выход продуктов составил 60-95% (схема 1).

**Схема 1. Синтез 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов**



Строение полученных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов доказано физико-химическими методами анализа: ЯМР  $^1\text{H}$ , масс-спектрометрией, также была измерена температура плавления соединений IIIа-м (табл. 1).

**Таблица 1. ЯМР  $^1\text{H}$ , температура плавления и масс-спектрометрия соединений IIIа-н**

№	Спектр ЯМР $^1\text{H}$ (ДМСО- <i>d</i> 6), $\delta$ , м.д.	m/z	Тпл $^{\circ}\text{C}$
IIIa	2,46 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,59 т (2H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,66 Гц), 7,73 т (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,41 Гц), 7,91 т (2H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,28 Гц), 8,68 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	304,82	130-131
IIIb	2,31 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,53-7,61 м (2H, H <sub>аром</sub> ), 7,72 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 6,77 Гц), 7,80 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,52 Гц), 8,71 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	383,59	166-168
IIIc	2,29 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 2,35 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,34 т (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,41 Гц), 7,40 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,52 Гц), 7,52 т (2H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 7,1 Гц), 8,68 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	318,91	143-145
IIId	2,58 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 3,77 с (3H, OCH <sub>3</sub> ), 7,25-7,28 м (2H, H <sub>аром</sub> ), 7,38-7,42 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,92 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 8,29 Гц), 8,76 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	334,81	153-154
IIIe	2,46 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 3,80 с (3H, OCH <sub>3</sub> ), 3,89 с (3H, OCH <sub>3</sub> ), 7,13 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 8,54 Гц), 7,51 с (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,60 д (1H, H <sub>аром</sub> , <i>J</i> = 8,28 Гц), 8,63 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	364,76	123-125

III f	2,59 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,52-7,58 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,82-7,86 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,91-7,97 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 8,10-8,15 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 8,72 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	383,61	173-175
III g	2,39 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 2,60 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,19 д (1H, H <sub>аром</sub> , J = 7,28 Гц), 7,41-7,47 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,90-7,94 т (2H, H <sub>аром</sub> , J = 7,41 Гц), 8,52 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	318,93	145-147
III h	2,47 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 3,81 с (3H, OCH <sub>3</sub> ), 7,29-7,31 м (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,45 с (1H, H <sub>аром</sub> ), 7,47-7,53 м (2H, H <sub>аром</sub> ), 8,68 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	334,84	150-152
III i	2,60 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,98 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 8,41 Гц), 8,24 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 8,53 Гц), 8,85 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	383,62	187-189
III j	2,43 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 2,48 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,39 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 7,78 Гц), 7,83 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 7,78 Гц), 8,68 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	318,76	95-97
III k	2,51 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 3,89 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,13 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 9,04 Гц), 7,96 д (2H, H <sub>аром</sub> , J = 8,78 Гц), 8,68 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	334,77	195-197
III l	2,63 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 6,86 дд (1H, H <sub>аром</sub> , J <sub>1</sub> = 1,51 Гц, J <sub>2</sub> = 3,51 Гц), 7,85 д (1H, H <sub>аром</sub> , J = 3,76 Гц), 8,23 с (1H, H <sub>аром</sub> ), 8,70 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	294,69	123-124
III m	2,65 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,34 т (1H, H <sub>аром</sub> , J = 4,39 Гц), 8,21 д (1H, H <sub>аром</sub> , J = 4,77 Гц), 8,34 дд (1H, H <sub>аром</sub> , J <sub>1</sub> = 1,13 Гц, J <sub>2</sub> = 3,89 Гц), 8,74 с (1H, H <sub>пиразол</sub> ).	310,75	135-137

На данный момент в литературе нет упоминания о биологической активности новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов, поэтому целью данной работы стало изучение биологической активности новых синтезируемых соединений.

## Материалы и методы

На 1-м этапе исследования *in vivo* полученных соединений был осуществлен прогноз вероятных видов биологической активности с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), используя веб-сервис <http://pharmaexpert.ru/passonline>.

Острую токсичность синтезированных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов определяли на нелинейных белых мышах-самцах массой тела 16-20 г по 5 мышей в эксперименте. Животных распределяли на равные части по численности и массе тела в группы, по 10 животных в каждой. Содержание подопытных животных и обращение с ними во время экспериментов соответствовали правилам, принятым в учреждении и установленным требованиям (Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 199н «Правила надлежащей лабораторной практики»; Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Directive 2010/63/EU).

1-Бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины вводили однократно, внутрибрюшинно в интервале доз от 1 до 2000 мг/кг в виде суспензии в смеси ДМСО : вода (1:5). Выживаемость животных определяли через 24 и 48 ч от момента введения исследуемого соединения. Наблюдения осуществляли в течение 72 ч. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных. Расчет среднесмертельных доз LD<sub>50</sub> веществ проводили с помощью экспресс-метода Прозовского В.Б. [11] и пробит анализа по методу Миллера-Тейнтера [12].

Анальгезирующую активность 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов устанавливали на модели уксуснокислых «корчей» у мышей-самцов массой 16-20 г. Вещества вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 1/10 от LD<sub>50</sub>, которая составляла 200 мг/кг. Препарат сравнения – метамизол натрия – вводили аналогично в дозе 25 мг/кг. Контрольные животные получали дистиллированную воду. Химическое раздражение вызывали внутрибрюшинным введением 3% раствора уксусной кислоты. Исследуемые соединения вводили за 40 мин до введения уксусной кислоты. Подсчитывали количество корчей у каждой мыши в течение 20 мин.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладной программы Microsoft Excel и экспресс-методом по Прозовскому [11].

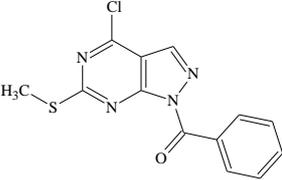
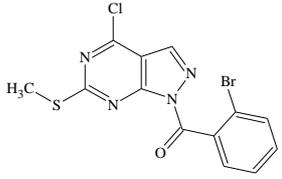
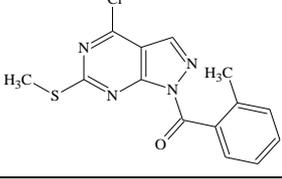
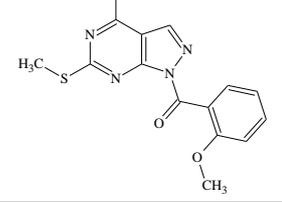
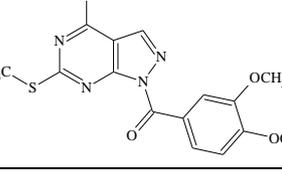
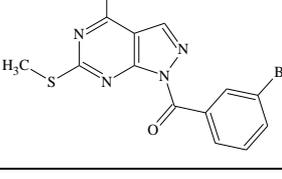
## Результаты и обсуждение

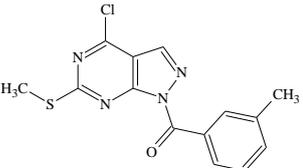
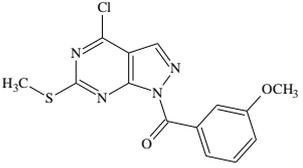
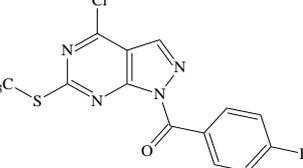
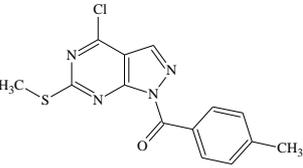
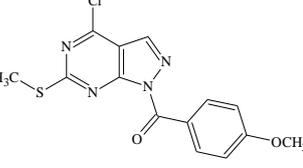
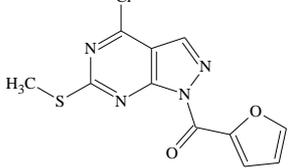
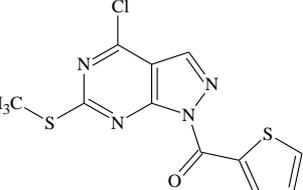
Результаты предварительного скрининга биологической активности, проведенные с помощью программы PASS, показали анальгезирующую активность с вероятностью  $P_a$  от 0,2 до 0,4. Дальнейшим этапом работы стало экспериментальное подтверждение данных видов активности.

В экспериментах была установлена острая токсичность при внутрибрюшинном введении. Для 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов LD<sub>50</sub> составила 2000 мг/кг, поэтому соединения по классификации токсичности препаратов Сидорова К.К. были отнесены к классу практически нетоксичных веществ [13].

При подсчете количества корчей у мышей при установлении анальгезирующей активности оказалось, что полученные 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины приводят к уменьшению числа судорог у животных на 47-98%, по сравнению с препаратом сравнения метамизолом натрия, активность которого составляет 61 % (табл. 2).

**Таблица 2. Анальгезирующая активность 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов**

Соединение	Доза 1/10 от LD50, мг/кг	Время начала судорог, мин	Количество судорог, наблюдаемых в течение 20 мин		Прирост к контролю, %	
			Число	%		
Контроль	-	3,8±0,3	101±2	100	-	
Метамизол натрия	250	5,2±0,3	39,99±1	38,94	61,06	
	IIIa	>2000	2±0,1	20,6±1	20,4	79,6
	IIIб	>2000	4±0,1	22,6±1	22,38	77,62
	IIIв	>2000	1,7±0,2	24,8±1	24,55	75,45
	IIIг	>2000	6±0,3	13,6±2	13,46	86,84
	IIIд	>2000	13,6±0,3	1,2±1	1,19	98,81
	IIIе	>2000	10,4±0,2	10,4±1	10,3	89,7

	IIIж	>2000	0,9±0,1	16±2	15,84	84,16
	IIIз	>2000	5,6±0,4	12,4±1	12,28	87,72
	IIIи	>2000	4,3±0,2	53,3±2	52,77	47,23
	IIIк	>2000	2±0,3	44,4±2	43,96	56,04
	IIIл	>2000	0,8±0,1	10,8±1	10,69	89,31
	IIIм	>2000	7±0,2	14,4±1	14,26	85,74
	IIIн	>2000	1,1±0,1	12,6±1	12,48	87,52

## Заключение

Экспериментально показано, что синтезированные новые 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины по классификации токсичности препаратов Сидорова К.К. относятся к классу практически нетоксичных веществ и обладают выраженной анальгезирующей активностью. Использование компьютерной программы PASS позволило быстро, без существенных экспериментальных затрат,

определить биологическую активность полученных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов.

## Литература

1. Chauhan M., Kumar R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.027
2. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of some pyrazoles and fused pyrazolopyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44(8): 3285. doi:0.1016/j.ejmech.2009.02.012
3. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16: 7102. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.054
4. Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S. et al. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 2040. doi:10.1016/j.bmc.2005.10.053
5. Bakavoli M., Bagherzadeh G., Vaseghifar M. et al. Molecular iodine promoted synthesis of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 647. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.10.051
6. Trivedi A.R., Dholariya B.H. et al. Synthesis and anti-tubercular evaluation of some novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives. *Med Chem Res.* 2012; 21:1887–1891. doi: 10.1007/s00044-011-9712-3
7. Rzeski W., Matysiak J., Kandfer-Szerszen M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 3201. doi: 10.1016/j.bmc.2007.02.041
8. Mavrova A.T., Wesselinova D., Tsenov Y.A., et al. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 63. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.03.006
9. Tamta H. et al. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine based inhibitors of xanthine. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71: S49-S54. doi: 10.1134/S0006297906130086
10. Патент RU2709018, Российская Федерация, МПК А 61 К 31/519 Производные 1H-пиразоло[3,4-d]пиримидина и способ их получения. Офицерова Е.С., Шкляренко А.А., Овсянникова Л.Н., Яковлев И.П. Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России. заявл. 03.04.2017; опубл. 19.12.2017.
11. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. *Психофармакология и биологическая наркология* 2007; 7 (3-4): 2090-2120.
12. Измеров И.Ф., Саночкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов. М.: Медицина, 1977.
13. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. *IJARPB* 2012; 2 (2): 103-129.

## Biological Activity of New 1-Benzoyl-Substituted 6-(Methylthio)-4-Chloro-1*h*-Pyrazolo[3,4-*D*]Pyrimidines

**Ofitserova E. S.**

*Postgraduate, Chair for Organic Chemistry*

**Alekseeva L. N.**

*PhD (Pharmacy)*

**Shklyarenko A. A.**

*Postgraduate, Chair for Organic Chemistry*

**Yakovlev I. P.**

*Doctor of Chemistry, Professor*

*St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

**Corresponding Author:** Ekaterina S. Ofitserova; **e-mail:** OfizerovaES@mail.ru

**Conflict of interest.** None declared.

**Funding.** The study had no sponsorship.

### Abstract

The article presents results of the study of the biological activity of newly synthesized 1-benzoyl-substituted-6-(methylthio) -4-chloro-1*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines. The acute toxicity of 2-aryl-6- (methylthio) -4-chloro-2*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines was determined experimentally on non-linear white male mice with a total weight of 16-20 g. A generation model was used to experimentally evaluate the analgesic activity acetic "writting" in mice. It was experimentally confirmed that the synthesized new 2-aryl-6- (methylthio) -4-chloro-2*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines are non-toxic and have pronounced analgesic activity.

**Keywords:** 1-Benzoyl-Substituted 6-(Methylthio)-4-Chloro-1*h*-Pyrazolo[3,4-*D*]Pyrimidines, biologic activity, PASS program, acute toxicity, analgesic activity

### References

1. Chauhan M., Kumar R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.027
2. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of some pyrazoles and fused pyrazolopyrimidines *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 3285. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.012
3. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16: 7102. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.054
4. Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S. et al. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 2040. doi:10.1016/j.bmc.2005.10.053
5. Bakavoli M., Bagherzadeh G., Vaseghifar M. et al. Molecular iodine promoted synthesis of new pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 647. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.10.051
6. Trivedi A.R., Dholariya B.H. et al. Synthesis and anti-tubercular evaluation of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives. *Med Chem Res.* 2012; 21:1887–1891. doi: 10.1007/s00044-011-9712-3

7. Rzeski W., Matysiak J., Kandefer-Szerszen M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 3201. doi: 10.1016/j.bmc.2007.02.041
8. Mavrova A.T., Wesselinova D., Tsenov Y.A., et al. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 63. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.03.006
9. Tamta H. et al. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine based inhibitors of xanthine. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71: S49-S54. doi: 10.1134/S0006297906130086
10. Pat. RU2708892 Rossijskaya Federaciya MPK A 61 K 31/519 Proizvodnye 1h-pyrazolo [3,4-d] pyrimidine I sposob ikh polucheniya. Ofitserova E.S., Shklyarenko A.A., Ovsyannikova L.N., Yakovlev I.P.; заявитель i patentoobladatel' FGBOU VO SPKHFA Minzdrava Rossii. [Pat. RU2708892 Russian Federation, IPC A 61 K 31/519 Derivatives of 1h-pyrazolo [3,4-d] pyrimidine and method of their production. Ofitserova E.S., Shklyarenko A.A., Ovsyannikova L.N., Yakovlev I.P.; applicant and patentee FGBOU VO SPKHFA Minzdrava Rossii]; declared 03.04.2017; published 19.12.2017. (In Russ.).
11. Prozorovskiy V.B. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov farmakologicheskikh issledovaniy. [Statistic processing of data of pharmacological investigations.] *Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya [Psychopharmacology and Biological Narcology]* 2007; 7 (3-4): 2090-2120. (In Russ.).
12. Izmerov I.F., Sanotsky I.V., Sidorov K.K. Parametry toksikometrii promyshlennyh yadov. [Toxicometric parameters of industrial poisons.] Moscow: Medicine, 1977. (In Russ.).
13. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, sub acute and chronic toxicity test. *IJARPB* 2012; 2 (2): 103-129.