

Л. Е. Никитина, И. В. Акулина, Р. С. Гараев, Н. П. Артемова, Л. Ю. Дорофеева, В. А. Старцева, Е. В. Сиразиева

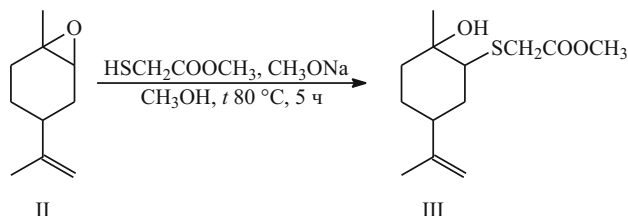
## СИНТЕЗ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И ЖАРОПОНИЖАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ 2-(1'-ГИДРОКСИ-4'-ИЗОПРОПЕНИЛ-1'-МЕТИЛЦИКЛОГЕКСИЛ-2'-ТИО)МЕТИЛЭТАНОАТА

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Реакцией (+)-1,2-оксида лимонена с метилмеркаптоацетатом синтезирован 2-(1'-гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)метилэтанат. Изучена острая токсичность, противовоспалительная и жаропонижающая активность исходных соединений и синтезированного терпенсульфида.

**Ключевые слова:** синтез, 2-(1'-гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)метилэтанат, (+)-1,2-оксид лимонена, (+)-лимонен, острая токсичность, противовоспалительная и жаропонижающая активность.

В продолжение наших исследований по поиску новых биологически активных серусодержащих терпеноидов [1–3] нами был синтезирован терпенсульфид ментанового ряда III. Это соединение в виде смеси 2 стереоизомеров в соотношении  $\approx 7:1$  (с преобладанием изомера с аксиальным расположением сульфидной группы) получено на основе (+)-1,2-оксида лимонена II (смесь *цис*- и *транс*-изомеров в соотношении  $\approx 1:1$ ) и метилового эфира меркаптоуксусной кислоты в присутствии метилата натрия.



### Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР получены на спектрометре “Varian Unity” с рабочей частотой 300 и 75,43 МГц для ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соответственно. Внутренний эталон — ТМС, растворитель —  $\text{CDCl}_3$ . Хроматомасс-спектры получены на масс-спектрометре “Turbo Mass Gold” (Perkin Elmer), капиллярная колонка, длина 30 м, диаметр 320 мкм,  $v_{\text{He}} = 1,2$  мл/мин. ИК-спектры снимали на Фурье-спектрометре “Tensor-27” (Bruker) в диапазоне волновых чисел  $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$  (образец прессовался между пластинами KBr). Данные спектров соединения III приведены для основного изомера. Для выделения и очистки продуктов реакции применяли метод адсорбционной хроматографии на силикагеле “L” (100/160  $\mu$ ). В качестве элюентов использовали гексан, а также смеси гексан — диэтиловый эфир. Контроль за ходом реакции и качеством разделения реакционной смеси осуществляли методом ТСХ на пластинах “Silufol” (проявители  $\text{I}_2$  и смесь этанол — серная кислота — анисовый альдегид 90:5:5). В работе использовались (+)-лимонен I [ $\alpha_D^{20} + 115^\circ$  (с 10,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ),

(+)-1,2-оксид лимонена II (97 % смесь *цис*- и *транс*-изомеров)  $n_D^{20} 1,4700$  и метилмеркаптоацетат фирмы “Aldrich”. Очистка и сушка растворителей проводилась согласно известным методикам [4].

**Реакция (+)-1,2-оксида лимонена с метиловым эфиром меркаптоуксусной кислоты.** К раствору метилата натрия в абсолютном метаноле (0,3 г, 0,013 моль) Na, 50 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) добавили 1,38 г (0,013 моль) метилового эфира меркаптоуксусной кислоты и 2 г (0,013 моль) (+)-1,2-оксида лимонена II. Реакционную смесь нагревали (80 °C) при перемешивании 5 ч, разбавляли водой, экстрагировали хлористым метилом, промывали насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , сушили  $\text{MgSO}_4$ . После отгонки растворителя продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле (гексан, диэтиловый эфир, 10:1). Выход 60 %.

### 2-(1'-Гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)метилэтанат (III).

ПМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д.: 1,29 (с, 3H, H-7), 1,66 (с, 3H, H-10), 2,4 (с, 1H, OH), 2,92 (дд, 1H, H-2,  $J_{\text{H}_2\text{eH}_3\text{e}} = 3,6$  Гц,  $J_{\text{H}_2\text{eH}_3\text{a}} = 5,4$  Гц), 3,12 (с, 2H, H-11), 3,66 (с, 3H, H-13), 4,70 (с, 2H, H-9).

Хроматомасс-спектр,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ ): 258 ( $\text{M}^+$ , 3), 226 (7), 185 (10), 169 (15), 152 (30), 135 (45), 107 (90), 93 (50), 81 (40), 69 (62), 55(60), 43 (100).

ИК-спектр,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 890, 1645 ( $\text{C}=\text{CH}_2$ ), 1110 ( $\text{C}-\text{O}$ ), 1715 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 3200–3500 (OH).

### Экспериментальная фармакологическая часть

Изучение острой токсичности соединений ментанового ряда — I, его производных II и III — при внутрижелудочном введении проводили на 126 белых мышах массой 20–22 г. Результаты обработаны методом Литчфилда и Уилкоксона [5].

Противовоспалительную активность оценивали на 200 белых беспородных крысах массой 150–180 г на модели острого отека лап, вызванного субплантарным введением 0,1 мл 1 % раствора каррагинина [6]. Испы-

## Острая токсичность и противовоспалительная активность соединений I – III

Соединение	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	Дозы, мг/кг	% подавления воспаления при введении					
			каррагинина	ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	фетра	ЕД <sub>50</sub> , мг/кг		
I	2300 (1885 – 2806)	230,0	50,0	$p < 0,01$	50,0 (30,5 – 82)	27,7	$p < 0,05$	84,0 (48 – 148)
		115,0	55,3	$p < 0,01$		34,7	$p < 0,05$	
		76,7	69,0	$p < 0,01$		51,5	$p < 0,05$	
		38,3	35,0	$p < 0,05$		59,3	$p < 0,05$	
		23,0	22,3	$p < 0,05$		62,6	$p < 0,05$	
II	1000 (840 – 1190)	100,0	42,6	$p < 0,01$	33 (19 – 56)	-	-	
		50,0	44,7	$p < 0,01$		-	-	
		33,3	36,2	$p < 0,01$		-	-	
		16,6	54,5	$p < 0,01$		-	-	
		10,0	21,3	$p < 0,01$		-	-	
III	10000 (7874 – 12700)	1000,0	59,6	$p < 0,01$	165 (110 – 248)	60,4	$p < 0,05$	200,0 (138 – 290)
		500,0	61,6	$p < 0,01$		39,8	$p < 0,05$	
		333,3	43,6	$p < 0,01$		45,7	$p < 0,05$	
		167,0	51,1	$p < 0,01$		68,0	$p < 0,05$	
		100,0	22,3	$p < 0,05$		67,9	$p < 0,05$	
Диклофенак	710 (480 – 1051)	71,0	53,2	$p < 0,01$	7,0 (4,7 – 10,5)	42,0	$p < 0,05$	8,0 (4 – 16)
		35,5	53,2	$p < 0,01$		47,1	$p < 0,05$	
		23,6	33,0	$p < 0,05$		48,0	$p < 0,05$	
		11,8	25,5	$p < 0,05$		49,0	$p < 0,05$	
		7,1	44,0	$p < 0,01$		49,0	$p < 0,05$	

Таблица 2

## Жаропонижающая активность исследуемых соединений на модели пирогеналовой лихорадки у крыс

Соединение	Доза, мг/кг	Данные термометрии	
		на фоне пирогенала через 2ч $M \pm m$ , °C	гипертермическая ре- акция, $M \pm m$ , °C
Контроль	-	39,24 ± 0,07	0,82 ± 0,23
I	230,0	37,62 ± 0,13*	0,7 ± 0,04
	115,0	37,3 ± 0,05*	0,61 ± 0,1
	76,7	37,5 ± 0,17*	0,12 ± 0,03*
	38,3	38,33 ± 0,05*	0,71 ± 0,09
	23,0	38,5 ± 0,08	0,76 ± 0,05
III	1000	35,35 ± 0,04* <sup>S</sup>	0,04 ± 0,03* <sup>S</sup>
	500,0	35,23 ± 0,02* <sup>S</sup>	0,09 ± 0,04* <sup>S</sup>
	333,0	35,6 ± 0,04* <sup>S</sup>	0,15 ± 0,08* <sup>S</sup>
	167,0	34,63 ± 0,03* <sup>S</sup>	0,1 ± 0,03* <sup>S</sup>
	100,0	35,72 ± 0,05* <sup>S</sup>	0,22 ± 0,09* <sup>S</sup>
Диклофенак	71,0	38,88 ± 0,1	0,8 ± 0,07
	35,5	38,8 ± 0,12	0,84 ± 0,08
	23,6	38,7 ± 0,04	0,86 ± 0,06
	11,8	38,42 ± 0,04*	0,75 ± 0,05
	7,1	38,35 ± 0,03*	0,73 ± 0,1

Примечания: \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, <sup>S</sup> — по сравнению с диклофенаком.

тупые вещества и препарат сравнения диклофенак вводили зондом в желудок в дозах, эквивалентных по токсичности (1/10 ЛД<sub>50</sub>, 1/20 ЛД<sub>50</sub>, 1/30 ЛД<sub>50</sub>, 1/60 ЛД<sub>50</sub>, 1/100 ЛД<sub>50</sub>), за 1 ч до каррагинина. Противовоспалительную активность оценивали через 3 ч после индукции воспаления по результатам онкометрии (по степени уменьшения отека в процентах по отношению

к контролю). По результатам действия 5 доз исследуемых соединений проводили расчет их среднеэффективной дозы (ЕД<sub>50</sub>), т.е. дозы, при действии которой на организм лабораторных животных развивался эффект, равный 50 % от максимально возможного. Полученные результаты обработаны методом Литчфилда и Уилкоксона [5].

Изучение противовоспалительного действия проводили также на модели хронического воспаления “фетровой гранулемы”, вызванной имплантацией под кожу живота 150 крыс массой 150 – 180 г 4 простерилизованных фетровых дисков массой 10 мг. Действие соединений на пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой фетрового диска. Исследуемые соединения и диклофенак вводили ежедневно в течение 7 дней внутрижелудочно в дозах, эквивалентных по токсичности [6]. Действие каждой дозы каждого соединения и препарата сравнения изучено на 10 животных. Расчет ЕД<sub>50</sub> испытуемых соединений определяли для антипролиферативного действия по методу Литчфилда и Уилкоксона [5].

Жаропонижающую активность изучали на 150 белых крысах массой 150 – 180 г на модели пирогеналовой лихорадки, вводя внутривенно пирогенал в хвостовую вену крыс в дозе 500 МПД/кг через 30 мин после внутрижелудочного введения испытуемых соединений и диклофенака в дозах, эквивалентных по токсичности. Изменение температуры тела животных регистрировали до и ежедневно в течение 7 ч после применения веществ. Критерием жаропонижающего действия соединений служила способность их уменьшать гипертермию через 2 ч после их введения.

Подопытные животные находились в боксированных помещениях на стандартной диете с соблюдением правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

Все манипуляции, причиняющие боль животным, проводились под наркозом. В качестве средства для наркоза использовали этаминал-натрий (40 – 50 мг/кг), который вводили внутривенно. В зависимости от требований эксперимента животных умерщвляли путем декапитации, соблюдая “Правила работы с лабораторными животными”. При исследовании острой токсичности наркоз не применялся.

Статистическую обработку результатов проводили традиционными методами вариационной статистики с использованием компьютерной программы “Биостат”.

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что все изучаемые соединения обладают низкой острой токсичностью (табл. 1).

На модели острого экссудативного воспаления наибольшую противовоспалительную активность проявляют соединения I и II (табл. 1).

При хроническом воспалении соединения I и его серусодержащее производное III оказывают антипролиферативное действие (табл. 1). По противовоспалительной активности изучаемые соединения уступали диклофенаку, но имели перед ним преимущество, как менее токсичные.

Установлено, что соединение I и в большей степени III в изучаемых дозах снижают температуру тела животных на модели пирогеналовой лихорадки (табл. 2).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что изученные монотерпеноиды обладают противовоспалительной и жаропонижающей активностью. В этом отношении эффективность соединения III, являющегося модифицированным производным лимонена, выше, чем у природного предшественника, что указывает на целесообразность дальнейшего поиска противовоспалительных средств в рядах серусодержащих терпеноидов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Е. Никитина, В. А. Старцева, И. А. Вакуленко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(5), 20 – 23 (2009).
2. G. Sh. Isaeva, L. E. Nikitina, *Helicobacter*, **14**(4), 404 – 405 (2009).
3. Л. Е. Никитина, М. О. Аникиенок, О. Н. Ильинская, *Вестн. Татарстан. отделения Рос. экол. академ.*, **1**(27), 23 – 25 (2006).
4. А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Д. Риддик и др., *Органические растворители*, ИЛ, Москва (1958).
5. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Государственное издательство медицинской литературы, Медицина, Ленинград (1963), сс. 121 – 130.
6. В. П. Фисенко (ред.), *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Ремедиум*, Москва (2000), сс. 234 – 241.

Поступила 27.04.10

## SYNTHESIS, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC ACTIVITY OF 2-(1'-HYDROXY-4'-ISOPROPENYL-1'-METHYLCYCLOHEXYL-2'-THIO)-METHYLETHANOATE

L. E. Nikitina, I. V. Akulina, R. S. Garaev, N. P. Artemova, L. Yu. Dorofeeva, V. A. Startseva, and E. V. Sirazieva

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

2-(1'-Hydroxy-4'-isopropenyl-1'-methylcyclohexyl-2'-thio)-methylethanoate has been synthesized via the reaction of (+)-1,2-limonene oxide with methylmercaptoacetate. The acute toxicity, anti-inflammatory and antipyretic activities of the initial compounds and synthesized terpene sulfide have been investigated.

**Key words:** synthesis, 2-(1'-hydroxy-4'-isopropenyl-1'-methylcyclohexyl-2'-thio)methylethanoate, (+)-1,2-limonene oxide, (+)-limonene, acute toxicity, anti-inflammatory activity, antipyretic activity