

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 831740 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **831740**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**A61K 35/78
A61K 31/365
C07D307/93
C07D493/04
C07D493/14**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **18.05.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.05.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.11.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoiikeus - Prioritet - Priority

19.05.1982 GB 82.14572 22.09.1982 GB 82.27062

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • R.P.Scherer Corporation, Troy, Michigan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Johnson, Edward Stewart, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Hylands, Peter John, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

3 • Hylands, Deborah Margaret, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä seskviterpeenilaktonipitoisen farmaseuttisen uutteen valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av ett seskviterpenlaktonthaltigt farmaceutiskt extrakt.

- Siirron numerointi jatketaan numeroin
- Keksinnön nimitys tulisi täydentää patentti-
valtuutus 114 josta vastataan

15 1

Menetelmä spasmolyttisesti aktiivisen koostumuksen valmistamiseksi, joka --- pu 1 johdanto

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään spasmolyttisesti aktiivisen koostumuksen valmistamiseksi, joka koostumus käsittää seskviterpeenilaktonia sisältävän uutteen kasvista Tanacetum parthenium. Tämä koostumus tai valmiste on käyttökelpoinen hoidettaessa migreeniä ja erilaisia niveltulehdus- ja keuhkoputkitiloja.

Migreenin esiintymistiheyden sanotaan olevan noin 12 % väestöstä. Sen tarkkoja syitä ei ole määritetty, mutta määrättyjä elementtejä sen aiheuttamisessa on hyvin dokumentoitu.

Sellaisia hermoneste- ja paikallisia hormooni- (autakoidi)-tekijöitä kuin noradrenaliinia, 5-hydroksitryptamiinia (serotoniinia), histamiinia ja prostaglandiineja liittyy migreeniin, vaikuttaen todennäköisesti aivoverisuonitasolla.

On olemassa paljon todistetta, joka viittaa siihen että häiriö verisuonen halkaisijassa liittyy migreeniprosessiin. Raporteissa on siten havainnollistettu supistuminen aivo-kuoriverisuonissa, jota seuraa laajennus migreenikohtauksen aikana. Verisuonien supistumisen uskotaan johtuvan amiinin, kuten noradrenaliinin vapautumisesta neuroneista ja 5-hydroksitryptamiinin vapautumisesta verihitulehduksista. Histamiinia vapautuu myös syöttösoluista ja sillä on tärkeä osa migreeninimuunnoksessa, jota kutsutaan "rypälepäänsäryksi" (migreenihermosärky). Lääkkeitä, joilla on noradrenaliinia, 5-hydroksitryptamiinia ja histamiinia vastustava vaikutus, käytetään kaikkia migreenin oireiden lievittämiseen. Näyttää siltä että prostaglandiineja (PG) kuten PGE_2 , $PGE_{2\alpha}$, PGI_2 (prostasykliini) ja tromboksaani A_2 ovat mukana seuraa siitä tosiasiasta, että ei-steroidiset tulehdusvastaiset lääkkeet kuten aspiriini, jonka toiminta perustuu prostaglandiiniinien synteesin ehkäisemiseen, ovat erittäin tehokkaita migreenin sekä profylaktiseen että akuuttiin hoitoon.

Mitä tulee niveltulehdistilojen syihin viittaa ei-steroidisten tulehduksenvastaisten lääkkeiden, kuten aspiriinin tai indometasiinin prostaglandiinisynteesiä vaimentava vaikutus voimakkaasti siihen, että prostaglandiinit ovat tulehdistusta välittäviä tekijöitä ainakin nivelreumassa. Prostaglandiinin tapaista ainetta on läsnä koe-eläinten tulehdusnesteissä. E-prostaglandiinit ovat alhaisina pitoisuuksina erittäin tehokkaita muiden agonistien kuten histamiinin, 5-hydroksitryptamiinin ja plasmakiinien (esim. bradykiinin) tuskaa tuottavia ominaisuuksia, kuten myös muita tulehdusvaikutuksia kuten lisääntynyttä verisuonien läpäisevyyttä, punoitusta, valkosolujen akkumulaatiota ja verihiutaleiden aggregoitumista tehostavia aineita.

Potilailla joilla on keuhkoputkiastma ja pitkällinen keuhkoputken tulehdus kärsivät läähätyskohtauksista ja hengitysvaikeuksista. Nämä johtuvat keuhkoputken supistumisesta seurauksena bronkiaalisen sileän lihaksen kouristuksesta tai tahmeista eritteistä tai vielä tavallisemmin näiden kahden yhdistelmästä. Ei olla täysin selvillä keuhkoputken supistumisen tarkoista syistä astmassa, mutta uskotaan että siihen liittyy sisäsyntyisiä hormoneste- ja autakoidisia kouristusta aiheuttavia aineita, kuten asetyylikolinia, 5-hydroksitryptamiinia (serotoniinia), histamiinia, joitakin prostaglandiineja ja leukotrieenejä. Allergisia reaktioita sisäänhengitetyssä pölyssä oleville aineille tai ruuasta absorboituille aineille voi ilmetä keuhkoputken supistumisena tai nokkosihottumana tai vesiemulsion luhistumisena, jonka histamiinin tai muiden sisäsyntyisten aineiden vapautuminen aiheuttaa.

Lääkkeitä, joilla on spasmolyttinen vaikutus, kuten aminofylliinia käytetään keuhkoputkikouristuksen hoitoon. Histamiinin vastaisesti vaikuttavia lääkkeitä käytetään myös astmassa ja huohotukseen sekä muihin allergiailmiöihin kuten heinänuhaan liittyviin oireisiin.

Monia vuosia on ollut tiedossa, että seskviterpeenilaktoneja esiintyy kasveissa, esimerkiksi Compositae-heimossa (katso Yoshio, Mabry ja Timmermann, "Sesquiterpene Lactones, Chemistry, NMR and Plant Distribution", University of Tokyo Press 1973).

Näistä kasveista Tanacetum parthenium (aikaisemmin kutsuttu Chrysanthemum parthenium'iksi ja yleisesti kutsuttu tarhapäivänkakkaraksi) on kasvilääketieteessä esitetty mahdollisesti tehokkaana hoitona migreeniin, kun sitä syötään. Mitään vakavaa lääketieteellistä tutkimusta tästä migreenihoidosta ei ilmeisesti ole julkaistu eikä mitenkään ole pohdiskeltu mikä ainesosa tai ainesosat kasvista liittyisivät tähän kyseiseen tehoon.

Monta vuotta sitten ilmoitettiin, että seskviterpeenilaktoneja, parthenolidia ja santamariinia voidaan uuttaa tarhapäivänkakkarakasta käyttäen petrolieetteriä ja kloroformia /katso Sorm at al., Coll. Czech. Chem. Comm., (1961), 26, 803 ja Romo et al., Tetrahedron, (1965), 21, 1741/. Näissä julkaisuissa ei ollut mitään mainintaa mistään mahdollisesta seskviterpeenilaktonien lääkekäytöstä.

Jokin aika sitten on myös ilmoitettu, että parthenolidilla ja useilla muilla seskviterpeenilaktoneilla on jotakin solumyrkkyaktiviteettia /Lee et al., Cancer Research, (1971), 31, 1669). Tässä artikkelissa ei kuitenkaan ole mitään viittausta siihen, että seskviterpeenilaktoni tai sitä sisältävä uute voi olla käyttökelpoinen hoidettaessa migreeniä, nivel-tulehdusta tai keuhkoputkivaivoja.

Vastikään on osoitettu, että määrätty seskviterpeenilaktonit ovat tehokkaita karrageenin aiheuttaman turvotuksen ja kroonisen apuaineen aiheuttaman niveltulehduksen ehkäiseviä aineita jyrsijöissä /katso Hall, Starnes, Lee ja Waddell, J. Pharm. Sci., (1979), 68, 537/. Tässä artikkelissa ei kuitenkaan ole mitään viittausta siihen, että millään seskviterpeeni-

laktonilla olisi farmaseuttista vaikutusta mitään vaivaa vastaan, puhumattakaan migreeniä vastaan.

Tarhapäivänkakkara-ainesta toistuvasti selektiivisesti uuttamalla ja testaamalla uutteita laajasti in vitro biologisen aktiivisuuden suhteen, erityisesti kouristusta laukaisevan vaikutuksen suhteen sileän lihaksen testeissä, on yllättäen havaittu, että määrätyillä läsnä oleviin seskviterpeenilaktoneihin kuuluvilla yhdisteillä on ominaisuuksia, jotka vahvasti viittaavat siihen, että ne ovat tehokkaita migreenin hoidossa. Tämä on erityisen yllättävää, koska muutamien tällaisten yhdisteiden esiintyminen kasvissa on ollut tunnettua monta vuotta ja silti kirjallisuudessa ei ole missään selostettu tai ehdotettu, että niillä olisi mitään käyttökelpoista aktiviteettia migreeniä vastaan. Ainakin joissakin näissä tarhapäivänkakkaran käyttöä koskevissa raporteissa migreenin hoidossa ehdotetaan lisäksi vesipitoisen uutteen ottamista kasvista "teenä". Tämä viittaisi siihen, että seskviterpeenilaktonit eivät olisi aktiivisia ainesosia, koska ne hyvin epätodennäköisesti uuttautuisivat kasvista tällä menetelmällä.

Näyttää siltä, että tällaiset yhdisteet ovat todennäköisesti myös tehokkaita hoidettaessa ei ainoastaan migreeniä vaan myös keuhkoputkiastmaa sekä niveltulehdustiloja, kuten nivelreumaa, luuniveltulehdusta ja sentapaisia niveltulehduksia. Tämä ei ollut ennustettavissa Lee et al:n (ks. yllä) raporttoimasta täysin toisentyyppisestä solumyrkyllisyysaktiviteetistä.

Esillä olevalla keksinnöllä aikaansaadaan menetelmä spasmo-lyyttisesti aktiivisen koostumuksen valmistamiseksi, joka koostumus käsittää seskviterpeenilaktonia sisältävän uutteen kasvista *Tanacetum parthenium* (jota tästä lähtien kutsutaan "tarhapäivänkakkaraksi"), jolle menetelmälle on tunnusomais- ta se, että

(a) suspendoidaan mainitun kasvin kuivien lehtien osasia öljyyn, joka on tyydyttynyt tai tyydyttymätön C₁₀₋₂₅-hiili-

vety, tyydyttynyt tai tyydyttymätön C₁₀₋₂₅-rasvahappo, mainitun rasvahapon polyoksietyloitu johdannainen tai mainitun rasvahapon rekonstituoitu glyseridi tai esteri,

(b) annetaan öljyn uuttaa kuivista lehdistä seskviterpeenilaktonia sisältävä uute, jolloin saadaan seos, jossa on öljyyn liuennutta, seskviterpeenilaktonia sisältävää uutetta ja kuivien lehtien osasia, joka seskviterpeenilaktonia sisältävä uute sisältää seskviterpeenilaktonin partenolidi spasmolyyttisesti aktiivisena aineosana, ja

(c) joko poistetaan seoksesta kuivien lehtien osaset tai lisätään seokseen stabiloimisaine pysyvän suspension muodostamiseksi, jossa on kuivien lehtien osasia öljyssä, jolloin molemmissa tapauksissa saadaan spasmolyyttisesti aktiivinen koostumus.

Mainittu öljy voi esim. olla kaupasta saatava kasvis- tai eläinöljy, kuten kookosöljy, soijapapuöljy tai kalaöljy.

Esillä oleva keksintö perustuu pääasiassa kolmeen yllättävään havaintoon, nimittäin että

(a) aineita, joilla on erityisen toivottava biologinen aktiivisuus, voidaan uuttaa tarhapäivänsäkkäkarasta käyttäen ei-polaarista liuotinta, joka on farmaseuttisesti hyväksyttävä öljy; ainakin joissakin tarhapäivänsäkkäkaran käyttöä koskevilla raporteilla migreenin hoidossa ehdotetaan vesipi-toisen uutteen ottamista kasvista "teenä".

(b) aktiivinen aineosa on seskviterpeenilaktoni; tarhapäivänsäkkäkarassa on useita muita yhdisteitä, joihin biologinen aktiivisuus olisi voinut perustua;

(c) seskviterpeenilaktonit ovat spasmolyyttisesti aktiivisia; on olemassa aikaisempia raportteja, joiden mukaan tietyt seskviterpeenilaktonit ovat biologisesti aktiivisia ja on ennustettu, että niillä on niveltulehdistä estäviä ominaisuuksia jyrsijöille annettuina, mutta aikaisemmin ei ole esitetty, että millään tarhapäivänsäkkäkarassa olevilla

seskviterpeenilaktoneilla olisi spasmolyyttistä aktiivisuutta. Spasmolyyttisen vaikutuksen merkitystä selitetään seuraavassa.

Tunnetaan useita lääkeaineita, jotka spesifisesti vastustavat tiettyjä kemikaalien vaikutuksia, joita kemikaaleja kutsutaan agonisteiksi, joita muodostuu kehossa ja jotka liittyvät tiettyjen sairauksien oireisiin, eli jokin antagonistin inhiboi tietyn agonistin, mutta ei inhiboi rakenteellisesti erilaista agonistia.

Suhteellisen harvat lääkeaineet vastustavat useiden erilaisten agonistien vaikutuksia. Nämä ei-selektiiviset antagonistit tunnetaan spasmolyyttisinä aineina, koska sileitä lihaksia sisältävissä elimissä ne inhiboivat (laukaisevat) useiden erilaisten agonistien aiheuttaman kouristuksen.

Koska seskviterpeenilaktonia sisältävällä uutteella tarhapäivänsäkkästä on tällainen spasmolyyttinen aktiivisuus, uskotaan, että tällaiset uutteet, sen lisäksi että ne ovat tehokkaita niveltulehdistä vastaan, myös ovat tehokkaita muita sellaisia sairauksia vastaan, jotka liittyvät agonistien vapautumiseen, kuten keuhkoputki-, astma- ja erikoisesti migreenisairaudet.

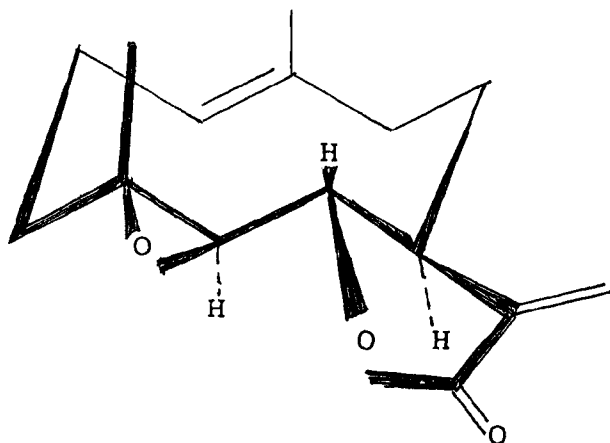
Seskviterpeenilaktonipitoisia uutteita voidaan aikaansaada sekoittamalla kuivattuja, jauhettuja tarhapäivänsäkkäralehtiä mainitun öljyn kanssa ja jättämällä seos seisomaan niin, että uuttautuminen voi tapahtua. Vaihtoehtoisesti voidaan kuiva jauhe perinpohjaisesti uuttaa öljyllä esim. Soxhlet-laitteessa.

Seskviterpeenilaktoniluokkia, jotka käsittävät sellaisia yhdisteitä, jotka todennäköisesti ovat tehokkaita migreeniä, astmaa ja/tai niveltulehdistiloja vastaan, ovat germa-
 15 kranoliitit ja guajanolidit, pseudoguajanolidit mukaanluet-
 tuna, erityisesti sellaiset seskviterpeenilaktonit,

5b

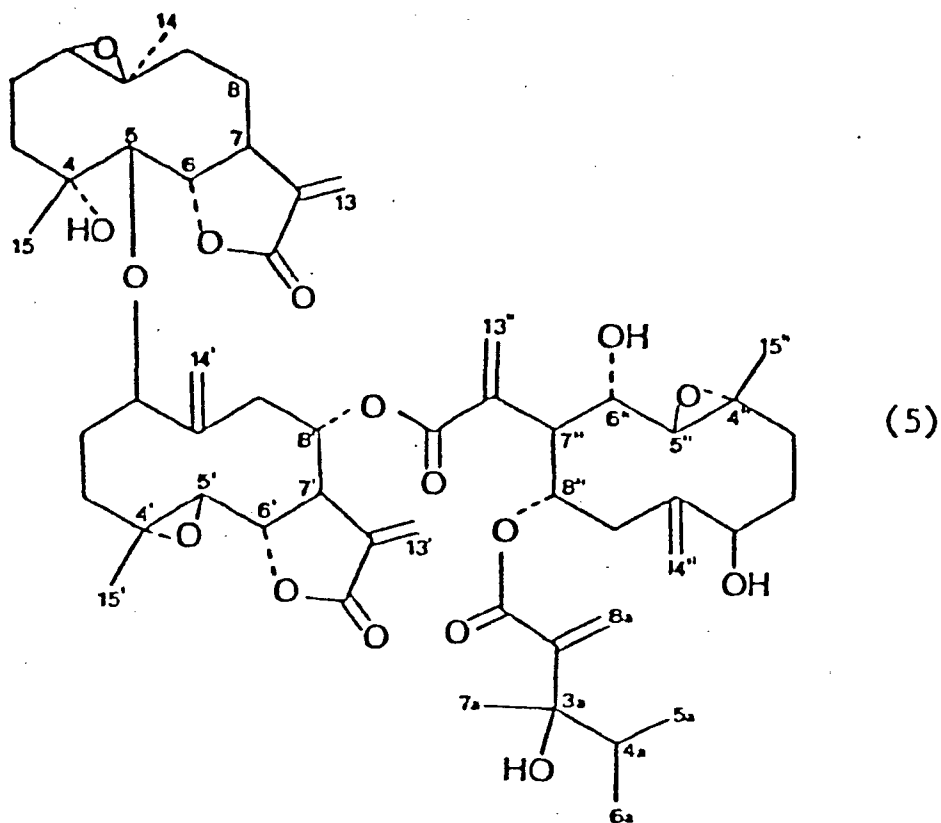
joiden laktonirenkaassa on α -metyleenisubstituentti. Uute voi sisältää useita tällaisia seskviterpeenilaktoneja.

Eräs germakranolidi, joka voidaan uuttaa tarhapäivänkakkarasta on parthenolidi, jolla on kaava



ja on havaittu, että tämä yhdiste ja uutteet tarhapäivänkakkarasta, jotka sitä sisältävät, ovat erityisen rodennäköisesti tehokkaita migreeniä, astmaa ja erilaisia niveltulehdustiloja vastaan.

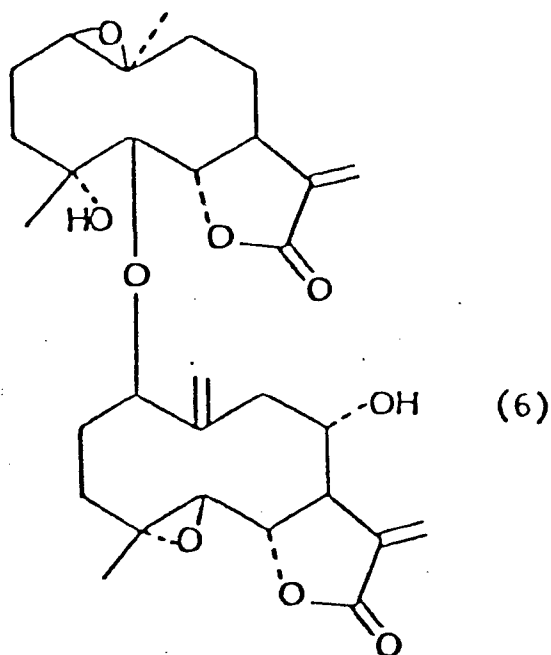
Toinen germakranolidi ja sitä sisältävät tarhapäivänkakkara-
uutteet, jotka on havaittu tehokkaiksi, voidaan kuvata kaavalla



75 Tämä yhdiste on saatu uuttamalla tarhapäivänkakkarasta ei-polaarisella liuottimella, ja ~~sen uskotaan olevan vasta eristetty. Sitä on kutsuttu "chrysanthemoniiniksi". Näyttää siltä, että yhdistettä ei ole selostettu missään kirjallisuudessa.~~

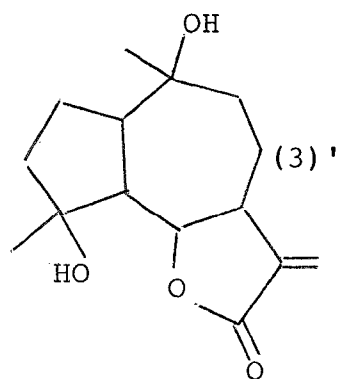
Chrysanthemoninia on myös hydrolysoitu, jolloin on saatu yhdiste, jolla on kaava

② Tätä yhdistettä ei ole selostettu kirjallisuudessa

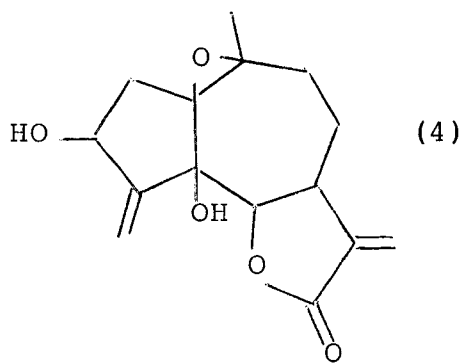


On ennustettu, kuten alla selostetaan, että nämä ovat erityisen tehokkaita yhdisteitä.

Erityisiä guaianolideja ja niitä sisältäviä tarhapäivänsäkkä-
rautitteita, jotka todennäköisesti ovat tehokkaita, ovat ne,
joilla on kaava

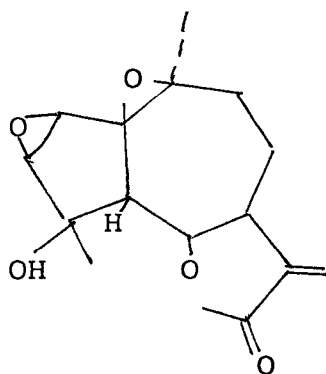


ja



Nämä yhdisteet on aikaansaatu uuttamalla tarhapäivänsäkkä-
raa ei-polaarisella liuottimella ja niitä ei ilmeisesti ai-
kaisemmin ole eristetty. Niitä kutsutaan "partholideiksi"
(3) ja "chrysanthemolidiksi" (4). Näyttää siltä, että näitä
yhdisteitä ei aikaisemmin kirjallisuudessa ole selostettu.

Eräs toinen mielenkiintoinen guaianolidi, joka on uutettu tar-
hapäivänsäkkä-
raasta, on chrysartemiini A, jolla on kaava



A

On myös havaittu, että tämä yhdiste ja sitä sisältävät tarhapäivänkakkarauutteet ilmeisesti ovat tehokkaita migreeniä, astmaa ja niveltulehdustiloja vastaan.

Koska germakranolidit, esim. dimeerit ja trimeerit, sisältävät useamman kuin yhden germakraaniryhmän, joissa kussakin edullisesti on yksi tai useampi funktionaalinen substituentti, ovat ne, näin uskotaan, todennäköisesti tehokkaampia kuin yhden ainoan germakraaniryhmän sisältävät germakranolidit. Näin ollen on ennustettavissa, että niitä voidaan antaa pienempinä annosmäärinä vastaavan vaikutuksen aikaansaamiseksi.

Samoin guajanolidit, joilla on moninkertainen funktionaalisuus, kuten ne, joilla on happifunktionaalisuus 10-asemassa, ovat, näin uskotaan, todennäköisesti tehokkaampia kuin sellaiset guajanolidit, joilla ei ole tällaista moninkertaista funktionaalisuutta.

Erityisen edullisia germakranolideja ovat edellä selostettu trimeerinen chrysanthemoniini (5) ja siitä hydrolysoimalla saatu dimeeri (6).

Erityisen edullisia guajanolideja ovat edellä määriteltujen kaavojen (3') ja (4) partholidi ja chrysanthemolidi.

Esillä olevan keksinnön mukainen seskviterpeenilaktonipitoinen uute tai valmiste voidaan aikaansaada tarhapäivänkakkarasta sekoittamalla kasvin kuivattuja, jauhettuja lehtiä

öljyn kanssa suspension muodostamiseksi ja antamalla seoksen seistä, niin että seskviterpeenilaktonit saavat uuttautua kasvista.

Suspensio voidaan sen jälkeen stabilisoida käyttäen sopivia kiinteitä rasvaseoksia ilman tai mehiläisvahan tai muiden mineraalivahojen, kolloidaalisen piioksidin, selluloosajohdannaisten, kuten karboksimeetyyliselluloosan ja/tai luonnonkumien, kuten agarin ja ksantaanin, tärkkelysten, tärkkelysjohdannaisien ja muiden sopivien hiilihydraattien kanssa, ilman kostutusaineita, kuten sorbitaanirasvahappoja ja lesitiiniä tai niiden kanssa.

Keksinnön mukaisesti valmistettua valmistetta voidaan antaa sellaisenaan, so. kasvisuutteen muodossa, mutta se sekoitetaan tavallisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän täyteaineen kanssa.

Kun uute on aikaansaatu muodostamalla stabiili suspensio kuivatusta, jauhetusta tarhapäivänsäkkäran lehdestä öljyssä, voidaan valmiste muodostaa kapseloimalla suspensio joko hermeettisesti suljettuun yhtä kappaletta olevaan pehmeään kuoreen tai kahdesta kappaleesta muodostuvaan kovakuoriseen gelatiinikapseliin, joka edustaa yhtä annosyksikköä, edullisesti 0,25-200 mg tarhapäivänsäkkäralehteä.

Vaihtoehtoisesti voidaan kuivattu, jauhettu tarhapäivänsäkkära jättää seisomaan öljyyn niin kauaksi, esim. 14 päiväksi, että uuttautuminen tapahtuu ja sen jälkeen se suodataan uuttoliuoksen aikaansaamiseksi.

Suspensio tai uuttoliuos voidaan sekoittaa pinta-aktiivisten aineiden tai niiden seosten kanssa, kuten polyoksietyleeniravahapposorbitaaniesterien, mono- ja diglyseridien ja asetyloitujen glyseridien kanssa itse emulgoituvien järjestelmien aikaansaamiseksi.

Migreenin hoitamiseksi voidaan valmisteita antaa suun kautta ja ne ovat tavallisesti tablettien tai nestesuspensioiden muodossa.

Aktiivisen ainesosan annos voi olla 0,25-200 mg päivässä. Yleensä 0,25-20 mg päivässä on riittävä, mutta akuutin migreenikohtauksen tai sen sukuisen häiriön hoidossa on optimaalinen annostusalue korkeampi, noin 2-200 mg päivässä.

Sitä annetaan parhaiten suun kautta tablettina, kapselina tai nestesuspensiona lääkärin määräämänä päiväannoksena tai säännöllisenä annoksena. Yhden annoksen tulisi olla tehokas, mutta voidaan uudistaa tarvittaessa. Voi kuitenkin

syntyä tapauksia, jolloin sitä parhaiten annetaan peräpuik-kona.

Suun kautta antamista varten sekoitetaan valmiste jonkin tavanomaisen tabletointi- tai kapselointikantajan kanssa tai minkä tahansa suun kautta annettavaksi hyväksytyn myr-kyttömän nestemäisen kantajan kanssa suspensioksi. Halutta-essa voidaan lääke aikaansaada kapseloidussa muodossa vii-västynyttä vapautumista varten pidemmän ajanjakson aikana.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettu valmiste on todennäköisesti erittäin tehokas (a) hoidettaessa klassista ja tavallista migreeniä, (b) hoidettaessa päähermonsärkyä (rypälepäänsärkyä) ja (c) hoidettaessa kuukautisia edeltävää ja kuukautisten aikaista migreeniä ja muita päänsärkyjä.

Valmisteet ovat todennäköisesti käyttökelpoisia yllä mainit-tua tyyppiä olevan päänsäryn ehkäisyssä, jolloin se tehok-kaasti vähentää kohtauksien taajuutta, ankaruutta ja kestoaa. Niiden pitäisi tehokkaasti vähentää tällaisiin kohtauksiin liittyvää pahoinvointia ja oksetusta tai pahoinvointia ja oksetusta erillisinä oireina. Niitä voidaan todennäköisesti myös käyttää edellä mainittua tyyppiä olevan päänsäryn äkillisten kohtausten hoitamiseksi niiden keston, ankaruuden ja niihin liittyvien oireiden vähentämiseksi.

Tarkkaa syytä valmisteiden tehokkuuteen migreenin hoidossa ei tunneta, mutta arvellaan että migreenihäiriöissä ja niihin liittyvissä tiloissa aivoverensuonet reagoivat vaih-televasti elosyntyisiin amiineihin ja prostaglandiineihin, joita vapautuu paikallisesti tai verenkiertojärjestelmään. Tämän olettamuksen perusteella uskotaan, että esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetun valmisteen vaikutukset migreenin hoidossa johtuvat verisuonen sileän lihaksen solukalvojen stabilisoitumisesta, mikä johtaa elosyntyisten amiinien ja prostaglandiinien aiheuttaman vaikutuksen suo-raan ehkäisyyn tai vähenemiseen tai epäsuoraan vaikutuk-

seen, kun näiden aineiden vaikutukset estyvät kallonsisäisiin verisuonihermoihin.

On havaittu, että esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetut valmisteet salpaavat hormonestevälittäjien ja autokoidien, kuten asetyylikoliinin, noradrenaliinin, 5-hydroksitryptamiinin, histamiinin, bradykiinin ja prostaglandiinin E₂ vaikutuksia sileään lihakseen. Uutteiden krooninen antaminen marsuille aiheuttaa lisäksi progressiivisen alenemisen näiden sileän lihaksen reaktiivisuudessa 5-hydroksitryptamiiniin ja histamiiniin. Tällaisia testejä voidaan tosiaankin suorittaa määrätylle valmisteelle sen todennäköisen tehokkuuden määrittämiseksi migreenin hoidossa.

Niveltulehdusten hoidossa keksinnön mukaisesti valmistettuja valmisteita voidaan antaa suun kautta tai peräsuoleen ja ne ovat edullisesti tabletin, kapselin, peräpuikon tai nestesuspension muodossa. Aktiivisen ainesosan annos voi olla 0,25-200 mg päivässä. Yleensä 0,25-20 mg päivässä on riittävä, mutta nivelreuman tai siihen liittyvän haitan akuuttikohtauksen hoidossa on optimaalinen annos suurempi, noin 2-200 mg päivässä.

Sitä annetaan parhaiten suun kautta tablettina tai nestesuspensionä päivittäisannoksena tai säännöllisesti lääkärin määräämällä tavalla. Yhden annoksen pitäisi olla tehokas, mutta se voidaan uudistaa tarvittaessa. Voi kuitenkin esiintyä sellaisia olosuhteita, että sitä annetaan parhaiten peräpuikkona.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetun valmisteen tehokkuus ilmenee (a) nivelreuman hoidossa, (b) luu-niveltulehduksen hoidossa ja (c) Felty'n oireyhtymään, Still'in tautiin, systeemiseen punahukkaan, valtimoiden kyhmytulehdukseen, ihon kovettumatautiin, kihtiin, mahansuun kouristukseen, Crohn'in tautiin, krooniseen luomatautiin, selkärangan niveljäykistymään, sarkoidoosiin, psoriasikseen ja tippuriin liittyvän niveltulehduksen hoidossa.

Valmisteet ovat ilmeisesti käyttökelpoisia edellä mainittujen niveltulehdusten ehkäisyyn, ollen tehokkaita kohtauksien taajuuden, ankaruuden ja keston vähentäjiä. Yhdisteitä voidaan myös käyttää edellä mainittujen niveltulehdusten akuuttien kohtauksien hoidossa niiden keston, ankaruuden ja niihin liittyvien oireiden vähentämiseksi.

Näiden aineiden todennäköisen tehon tarkkaa syytä niveltulehduksen hoidossa ei tunneta, mutta arvellaan, että nivelreumassa ja siihen liittyvissä tiloissa nivelten ympärillä vapautuu prostaglandiineja ja muita aineita, kuten histamiinia, 5-hydroksitryptamiinia ja bradykiiniä. Prostaglandiinit tehostavat muiden aineiden kipua tuottavia ominaisuuksia. Tämän oletuksen perusteella oletetaan, että keksinnön mukaisen valmisteen todennäköiset vaikutukset niveltulehdustilojen hoidossa voivat johtua niiden prostaglandiinin, histamiinin, 5-hydroksitryptamiinin ja bradykiinin vastaisista vaikutuksista.

On havaittu, että keksinnön mukaisesti valmistetuilla valmisteilla on merkittäviä kouristusta laukaisevia vaikutuksia hyvin monia sileälihasta kouristavia aineita vastaan. Siten ne salpaavat histamiinin, 5-hydroksitryptamiinin, bradykiinin ja prostaglandiinin E_2 vaikutuksia. Siten ne vaikuttavat useimpien sellaisten aineiden farmakologisiin vaikutuksiin, joiden väitetään välittävän kroonista tulehdusta. On havaittu, että tällaisia testejä voidaan suorittaa määrätylle valmisteelle sen todennäköisen tehokkuuden määrittämiseksi nivelreuman ja niihin liittyvien tilojen hoidossa.

Astman hoitamiseksi voidaan keksinnön mukaisesti valmistetuja valmisteita antaa suun kautta tai peräsuoleen.

Aktiivisen ainesosan annostus voi vaihdella 0,25-200 mg:n välillä päivässä. Yleensä 0,25-20 mg päivässä on riittävä, mutta hoidettaessa astman tai siihen liittyvän häiriön akuuttia kohtausta on optimaalinen annos yleensä korkeampi, noin 2-200 mg päivässä.

Sitä annetaan parhaiten suun kautta tablettina tai kapselina tai nestesuspensionona päivittäisannoksena tai säännöllisesti lääkärin määräämällä tavalla. Yksi annos voi olla tehokas, mutta se voidaan uudistaa tarvittaessa. Joissakin olosuhteissa voi kuitenkin olla parasta antaa sitä peräpuikkona.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetun valmisteiden tehokkuus ilmenee (a) keuhkoputkiastman hoidossa, (b) keuhkoputken kurouman hoidossa, joka liittyy pitkälliseen keuhkoputken tulehdukseen, (c) allergisissa yliherkkyyssilmiöissä, kuten heinänuhassa ja anafylaksiassa vapautuvaan histamiinin liittyvien oireiden hoidossa.

Tarkka syy näiden aineiden ehdotettuun tehokkuuteen astman ja muiden allergisten reaktioiden hoidossa perustuu niiden kykyyn ehkäistä tai inhiboida lukuisten sisäsyntyisten aineiden, kuten asetyylikoliinin, histamiinin, 5-hydroksitryptamiinin, bradykiinin ja prostaglandiinien aiheuttamaa sileän lihaksen kouristusta, jotka aineet kykenevät vapautumaan paikallisesti tai verenkiertojärjestelmään. Siten esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetun valmisteiden erinomaiset vaikutukset keuhkoputken kuroutuman hoidossa voivat johtua sileän lihaksen solukalvojen stabilisoinnista, mikä johtaa elosyntyisten amiinien, prostaglandiinien ja polypeptidien aiheuttaman vaikutuksen suoraan inhibitioon tai vähenemiseen tai epäsuoraan vaikutukseen, kun näiden aineiden vaikutukset keuhkoputkilihaksistoon ja/tai limaa erittäviin soluihin johtaviin hermoihin estyvät.

On havaittu, että keksinnön mukaisesti valmistetut valmisteet salpaavat asetyylikoliinin, 5-hydroksitryptamiinin, histamiinin, prostaglandiinin E₂ ja bradykiinin aiheuttamia sileän lihaksen kouristuksia (supistuksia). Itse asiassa on todettu, että tällaisia kouristusta laukaisen aktiviteetin testejä voidaan suorittaa määrätyle valmisteelle, sen todennäköisen tehokkuuden määrittämiseksi keuhkoputkihäiriöiden hoidossa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettujen valmisteiden uuttoa tarhapäivänkakkarasta kuvataan esimerkeissä 1-3.

Tutkittaessa tarhapäivänkakkarasta saatavaa uutetta on uuttoaaineena käytetty petrolieetteriä, joka ei ole keksinnön mukainen uuttoaaine. Tällöin seskviterpeenilaktonipitoinen uute tai valmiste voidaan aikaansaada tarhapäivänkakkarasta seuraavasti.

Tarhapäivänkakkaran lehtiä pakastekuivataan ja jauhetaan sen jälkeen. Kuivaa jauhetta uutetaan perinpohjaisesti Soxhlet-laitteessa orgaanisella liuottimella, esim. petrolieetterillä, joka kiehuu välillä 60/40°C. Uute haihdutetaan kuiviin ja kromatografoidaan, esim. piigeelikolonnilla. Kolonnin eluointi suoritetaan liuottimella, jonka polaarisuus nousee, esim. alkaen 100 %:sesta petrolieetteristä, joka kiehuu välillä 60/40°C ja päättyen 40 %:seen metanoliin kloroformissa. Jakeita otetaan talteen ja yhdistetään sopivalla tavalla niiden ohutkerroskromatografointia silmällä pitäen. Yhdistettyjen jakeiden kouristusta laukaisevaa vaikutusta ⁴⁰⁻⁴¹ ~~test~~ ^{test} ~~tetaan~~, kuten jäljempänä on selostettu. Ne jakeet, jotka näyttävät 100 %:sesti ehkäisevän agonisteja jaetaan vielä alijakeisiin. Näitä alijakeita ⁴⁰⁻⁴¹ ~~test~~ ^{test} ~~tetaan~~ sen jälkeen. Aktiiviset ainesosat voidaan mahdollisesti eristää jatkopuhdistuksen jälkeen (tavallisesti preparatiivinen ohutkerroskromatografia). Puhtaat yhdisteet voidaan uudelleenkiteyttää sopivista liuottimista ja analysoida spektroskooppisilla menetelmillä, esim. 1H NMR-, CNMR-, massaspektroskopiolla,

infrapunaspektroskopialla tai ultraviolettispektroskopialla.

Tällaisten valmisteiden uuttoa tarhapäivänkakkarasta ja niiden tehokkuutta havainnollistetaan seuraavassa yksityiskohtaisemmin viitaten oheiseen piirustukseen.

Oheisessa piirustuksessa on esitetty uutto- ja eristysmenetelmä, joka alkaa tarhapäivänkakkaran petrolieetteriuutosta.

Piirustuksessa "PTLC" tarkoittaa "preparatiivista ohutkerros-

kromatografiaa", luvut edustavat yhdistettyjä jakeita, esimerkiksi 1-8 ja uudet yhdisteet ja seokset on ilmaistu seuraavilla koodeilla:

DJ 156a - yllä olevan kaavan (3)' partholidi

DJ 177b - yllä olevan kaavan (4) krysanthemolidi

DJ 140a - yllä olevan kaavan (5) krysanthemoniini

DJ 140a H2 - yllä olevan kaavan (6) yhdiste

DJ 61a - pitkäketjuinen rasvahappoesteri

DJ 192a - parthenolidin ja määrittämättömän terpeenin seos.

DJ 125a - rasvahappoesterien seos

DJ 179a1 - mahdollisesti reynosiinin, krysartemiinin A ja uuden seskviterpeenilaktonidihydroreynosinin seos.

DJ 179c - kompleksinen seskviterpeenilaktoni, joka sisältää α -metyleeni- γ -laktonia.

1. Yleisiä yksityiskohtia

A. Kromatografia

(a) Adsorbentteja

Kaikkeen kromatografiaan käytettiin adsorbenttina piigeeliä. Kolonnikromatografiaan käytetty piigeeli oli Kieselgel 60 (Merck) ja ohutkerroskromatografiaan (TLC) Kieselgel G (Merck) ja Kieselgel GF₂₅₄ (Merck). TLC-levyjä rutiinityökentelyä, sekä analyttistä että preparatiivista varten, valmistettiin sekoittamalla 15 g Kieselgel G ja 15 g Kieselgel GF₂₅₄ 60 ml:n kanssa tislattua vettä. Lietettä suihkutettiin 0,25 mm:n paksuisena kerroksena 20 x 20 cm:n lasilevyille. Levyt kuivattiin avoimessa ilmassa ja aktivoitiin sen jälkeen 105°C:ssa tunnin ajan. Hopeanitraatilla impregnoituja levyjä valmistettiin sekoittamalla 30 g Kieselgel G 60 ml:n kanssa 10 %:sta paino/tilavuus hopeanitraattiliuosta tislatussa vedessä. Lietettä suihkutettiin kerroksena, kuten edellä.

(b) Liuotinjärjestelmiä

Kolonnien eluointiin ja TLC-levyjen kehittämiseen käytetyt liuottimet on yksilöity sopivissa osissa.

(c) Ainesosien havaitseminen TLC-levyillä

Lyhytaaltoista ultraviolettivaloa (254 nm) ja suihkutusta 20 %:sella tilavuus/tilavuus rikkihapolla tislatussa vedessä, jota seuraa kuumennus 105°C:ssa 10 minuutin ajan, käytettiin ainesosien toteamiseen.

B. Infrapunaspektri

Saatu kiinteinä filmeinä, Nujol-harsoina, kloroformiliuoksina tai KBr-levyinä käyttäen Unicam SP 200 spektrometriä.

C. Ultraviolettiskektrit

Otettu spektroskooppisessa etanolissa 1 cm:n pituudelta käyttäen Perkin-Elmer Lambda 3 UV/VIS-spektrofotometriä.

D. Sulamispiste

Otettu Electrotermal-sulamispistelaitteella ilman korjausta.

E. Vety-1 ydinmagneettiset resonanssispektrit

Mitattu 400 MHz:ssä käyttäen Bruker WH 400-spektrometriä tai 200 MHz:ssä Nicolet NT 200-spektrometrillä deuterokloroformissa käyttäen tetrametyylisilaa (TMS) sisäisenä standardina.

F. Hiili-13 ydinmagneettinen resonanssispektri

Mitattu 100,6 MHz:ssä käyttäen Bruker WH 400-spektrometriä deuterokloroformissa käyttäen tetrametyylisilaa sisäisenä standardina.

Sekä ^1H että ^{13}C -resonanssit on annettu δ (TMS δ 0,0) ja seuraavia lyhenteitä on käytetty: s, singletti; d, dubletti; t, tripletti; q, kvartetti; m, multipletti ja J, kytkentävakio.

G. Massaspektrit

Mitattu AEI MS 902-massaspektrometrillä, jolla on suuri erotelukyky tai VG Micromassa 16S-spektrometrillä 18 tai 70

eV:ssa, joissa suora tulolämpötila oli välillä 180°C ja 240°C.

2. Tanacetum partheniumin uutto petrolieetterillä (kiehumisalue 40-60°C)

5,8 kg Tanacetum parthenium'in lehtiä otettiin talteen tammiukuussa 1980 Chelsea Physic Garden'ista, Royal Hospital Road, Lontoo SW3 ja pakasteluivattiin käyttäen Chemical Laboratory Instruments'in SB4 pakastekuivainta. Kasvin kuivattujen maanpäällisten osien todistuskappale tallennettiin Chelsea Collegen museoon. Pakastekuivattujen lehtien paino putosi 82,8 % kuivatessa, jolloin saatiin lopulliseksi painoksi 1 kg. Nämä jauhettiin ja uutettiin perinpohjaisesti Soxhlet-laitteessa petrolieetterillä, jonka kiehumispistealue oli 40-60°C, 7 päivän ajan. Uute haihdutettiin kuiviin käyttäen pyörivää haihdutinta alennetussa paineessa, jolloin saatiin keltainen öljymäinen jäännös, joka painoi 44 g.

3. Petrolieetteriuutteen kouristusta laukaiseva vaikutus

50 mg petroliuutetta testattiin sen kouristusta laukaisevan aktiviteetin suhteen käyttäen asetyylikoliinia (Ach), 5-hydroksitryptamiinia (5-HT) ja histamiinia agonisteina, kuten alla on selostettu.

200-300 g painavia marsuja tapettiin iskulla päähän. Lähin sykkyräsuoli leikattiin pois ja 2-3 cm:n pituuksia puhdistettiin ja suspendoitiin Krebs'in liuokseen (NaCl 118,4, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25 ja glukoosia 11,5 mmoolia/l) 37°C:ssa, jonka läpi jatkuvasti kuplitettiin seosta, jossa oli 95 % O₂:ta ja 5 % CO₂:ta. Sykkyräsuolipituuksista mitattiin pituussuuntaiset supistukset isometrisesti. Log (annos) versus vaikutus-käyrät mitattiin asetyylikoliinille, 5-hydroksitryptamiinille ja histamiinille, josta otettiin ja annettiin ED₅₀-annokset toistuvasti, kunnes saatiin tasainen vaikutus. Antagonisti, so. petroliuute liuotettiin sen jälkeen mahdollisimman pieneen määrään dimetyyli-sulfoksidia ja siitä valmistettiin 10⁻⁴ g/ml:n pitoisuus

Krebs'in liuosta. Tämä lisättiin sykkyräsuolta sisältävään kylpyyn ja jätettiin 30 minuutiksi seisomaan. Perusteellisen pesun jälkeen Krebs'in liuoksella jäljellä olevan antagonistin poistamiseksi, mitattiin agonistien vaikutuksen kudokseen ja prosentuaalinen muutos lakettiin.

Vertailukoe suoritettiin täysin samalla tavoin, paitsi että antagonistit jätettiin pois. (Tämä oli olennaista, koska käsittelemättömän kudoksen jättäminen seisomaan 30 minuutiksi lisää usein sen herkkyyttä ulkosyntyiselle agonistille). Petroliuute ehkäisi 100 %:sesti kolmea agonistia.

4. Petrolieetteriuutteen raakaerotus

1,25 g petroliuutetta otettiin ja kromatografoitiin piigeeliekolonnilla (50 g) läsnä olevien ainesosien ja erotusasteen tutkimiseksi suurmittakaavatutkimukseen nähden. Tämä koemitakaavatutkimus osoittautui tyydyttäväksi ja siten 40 g petroliuutetta asetettiin kolonniin, jossa oli 1,2 kg piigeeliä sekoitettuna lietteeksi petrolieetterin kanssa, kp. 40-60°C. 200 ml:n suuruisia jakeita otettiin talteen. Jakeet tutkittiin TLC:llä ja yhdistettiin sopivalla tavalla (katso piirustusta).

Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden painot on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1Petrolieetteriuutteen kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeiden lukumäärä</u>	<u>Liuotin</u>
1 - 24	petrolieetteri, kp. 40-60°C
25 - 36	1,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
37 - 50	2,5 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
51 - 65	5,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
66 - 95	7,5 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
96 - 112	10,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
113 - 118	25,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
119 - 166	50,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
167 - 174	75,0 %:sta tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
175 - 180	etyyliasetaattia
181 - 185	1,0 %:sta tilavuus/tilavuus kloroformia etyyli- asetaatissa
186 - 188	5,0 %:sta tilavuus/tilavuus kloroformia etyyli- asetaatissa
189 - 192	10,0 %:sta tilavuus/tilavuus kloroformia etyyli- asetaatissa
193 - 195	25,0 %:sta tilavuus/tilavuus kloroformia etyyli- asetaatissa
196 - 201	50,0 %:sta tilavuus/tilavuus kloroformia etyyli- asetaatissa
202 - 217	kloroformia
218 - 237	10,0 %:sta tilavuus/tilavuus metanolia kloro- formissa
238	50,0 %:sta tilavuus/tilavuus metanolia klorofo- missa

Taulukko 2

Petrolieetteriuutteen kolonnikromatografian yhdistettyjen
jakeiden painot

<u>Yhdistetyt jakeet</u> <u>(jakeiden</u> <u>lukumäärä)</u>	<u>Paino</u> <u>(grammoissa)</u>	<u>% kokonaisuudesta</u> <u>(pyöritetty ensimmäiseen desimaaliin)</u>
1 - 8	2,995	7,5
9 - 26	2,692	6,7
27 - 50	0,380	1,0
51 - 61	5,850	13,7
62 - 70	1,170	2,9
71 - 74	0,230	0,6
75 - 80	0,700	1,8
81 - 84	1,800	4,5
85 - 86	0,764	1,9
87 - 92	2,380	6,0
93 - 101	1,520	3,8
102 - 111	1,878	4,7
112 - 118	1,409	3,5
119 - 123	1,743	4,4
124 - 143	7,625	19,1
144 - 176	2,059	5,2
177 - 200	0,796	2,0
201 - 228	1,646	4,1
229 - 238	2,046	5,1
	<u>39,633</u>	<u>98,5</u>

5. Petrolieetteriuutteen yhdistettyjen jakeiden kouristusta
laukaiseva vaikutus

Petroliuuton yhdistetyt jakeet testattiin kouristusta laukaisevan vaikutuksen suhteen, kuten on selostettu yllä olevassa osassa 3. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Petrolieetteriuuton yhdistettyjen jakeiden kouristusta laukaiseva vaikutus, testattu 10^{-4} g/ml:n pitoisuudessa

Jakeet n:o	Ach:n	5-HT:n	Histamiinin
	prosentuaalinen inhibiitio		
1 - 8	0	0	0
9 - 26	0	0	0
27 - 50	20	31	33
51 - 61	89	100	96
62 - 70	26	32	26
71 - 74	55	87	50
75 - 80	91	100	100
81 - 84	0	0	0
85 - 86	12	27	26
87 - 92	5	42	39
93 - 101	60	86	79
102 - 111	58	62	66
112 - 118	20	42	35
119 - 123	84	97	97
124 - 143	91	100	100
144 - 176	100	100	100
177 - 200	81	100	100
201 - 228	50	57	46

6. Tanacetum parthenium'in uutto kloroformilla

Kasviainesta, 950 g, jota sitä ennen oli uutettu petroli-eetterillä, kp. 40-60°C, uutettiin perinpohjaisesti kloroformilla Soxhlet-laitteessa 9 päivää. Uute haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa käyttäen pyörivää haihdutinta alennetussa paineessa, jolloin saatiin vihreä öljymäinen jäännös, joka painoi 46 g.

7. Kloroformiuutteen kouristusta laukaiseva vaikutus

50 mg kloroformiuutetta testattiin kouristusta laukaisevan vaikutuksen suhteen, kuten edellä (katso yllä oleva osa 3). Saatiin kolme agonistia inhiboiduksi 100 %:sesti.

8. Kloroformiuutteen raakaerotus

4,5 g kloroformiuutetta kromatogtafoitiin piigeelikolonnilla (120 g) läsnä olevien ainesosien ja erotusasteen tutkimiseksi suurmittakaavatutkimusta silmällä pitäen. Otettiin 100 ml:n suuruisia jakeita ja yhdistettiin sopivasti TLC:n suhteen. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden painot on esitetty taulukoissa 4 ja 5.

Taulukko 4

Kloroformiuutteen kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
1 -12	50,0 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
13 - 16	75,0 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia petrolieetterissä
17 - 27	etyyliasetaattia
28 - 32	10,0 % tilavuus/tilavuus kloroformia etyyliasetaatissa
33 - 36	20,0 % tilavuus/tilavuus kloroformia etyyliasetaatissa
37 - 40	50,0 % tilavuus/tilavuus kloroformia etyyliasetaatissa
41 - 45	kloroformia
46 - 54	10,0 % tilavuus/tilavuus metanolia kloroformissa
55 - 62	25,0 % tilavuus/tilavuus metanolia kloroformissa
63 - 68	50,0 % tilavuus/tilavuus metanolia kloroformissa

Taulukko 5

Kloroformiuuton kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden paino

<u>Yhdistetyt jakeet</u> <u>(jakeet n:o)</u>	<u>Paino</u> <u>(grammoina)</u>	<u>% kokonaisuudesta</u> <u>(pyöristetty ensim-</u> <u>mäiseen desimaaliin)</u>
1 - 2	0,429	9,5
3 - 4	0,417	9,3
5 - 6	0,171	3,8
7 - 8	0,097	2,2
9 - 12	0,201	4,5
13 - 18	0,362	8,1
19 - 22	0,273	6,1
23 - 25	0,410	9,2
26 - 39	0,264	5,9
40 - 54	0,940	20,9
55 - 68	0,805	17,9
	<u>4,369</u>	<u>97,4</u>

Kloroformiuutteen yhdistettyjen jakeiden kouristusta laukaiseva vaikutus

Kloroformiuutosta saatujen yhdistettyjen jakeiden kouristusta laukaiseva vaikutus testattiin, kuten on selostettu yllä olevassa osassa 3. Tulokset on esitetty taulukossa 6. Mikää jae ei antanut 100 %:sta antagonismia kaikkiin kolmeen agonistiin eikä niitä sen vuoksi tutkittu enempää farmakologisen aktiviteetin suhteen. Uute jakotislattiin kuitenkin uusien yhdisteiden eristämiseksi siinä toivossa, että nämä olisivat avuksi aktiivisten yhdisteiden rakenteellisessa selvittämisessä petrolieetteriuutteista.

Taulukko 6

Kloroformiuutosta saatujen yhdistettyjen jakeiden kouristus-
ta laukaiseva vaikutus, testattu pitoisuudessa 10^{-4} g/ml

Jakeet n:o	Ach	Prosentuaalinen inhi-	Histamiini
		biitio 5-HT	
1 - 2	9	0	26
3 - 4	46	50	100
5 - 6	91	94	93
7 - 8	60	65	78
9 - 12	52	54	63
13 - 18	22	33	80
19 - 22	0	0	0
23 - 25	0	0	0
26 - 39	43	32	16
40 - 54	48	47	35
55 - 68	23	37	14

Petrolieetteriuutosta saatujen jakeiden 144-175 (A) tutkimi-
nen

Petroliuutosta saadut jakeet 144-176 ehkäisivät 100 %:sesti
kolmea agonistia Ach, 5-HT ja histamiinia pitoisuudessa
 10^{-4} g/ml.

A Jakeiden 144-176 (A) lisäerotus

Nämä jakeet (1,959 g) kromatografoitiin piigeelekolonnilla
(40 g). Otettiin 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin sopivalla
tavalla referenssin kanssa TLC:tä varten. Kolonnin liuotin-
eluointi ja yhdistettyjen jakeiden paino on esitetty taulu-
koissa 7 ja 8.

Taulukko 7

Petrolieetteriuuton jakeiden 144-176 (A) kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
A 1 - 7	heksaani
A 8 - 25	10 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
A 26 - 50	20 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
A 51 - 65	40 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
A 66 - 78	60 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
A 79 - 85	etyyliasetaatti
A 86	kloroformi

Taulukko 8

Petrolieetteriuuton jakeiden 144-176 (A) kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden painot

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Paino (grammoissa)</u>	<u>% kokonaisuudesta (1 desimaalin tarkkuudella)</u>
A 1 - 7	0,022	1,1
A 8 - 9	0,014	0,7
A 10 - 18	0,017	0,9
A 19 - 24	0,048	2,5
A 25 - 29	0,096	4,9
A 30 - 34	0,211	10,8
A 35 - 36	0,146	7,5
A 37 - 38	0,102	5,2
A 39 - 46	0,262	13,4
A 47 - 52	0,177	9,0
A 53 - 58	0,218	11,1
A 59 - 65	0,267	13,6
A 66 - 67	0,104	5,3
A 68 - 72	0,125	6,4
A 73 - 85	0,156	8,0
	<u>1,965</u>	<u>100,2</u>

B Jakeiden 144-176 (A) kouristusta laukaiseva vaikutus

Ne jakeet, jotka painoivat yli 50 mg testattiin kouristusta laukaisevan aktiviteetin suhteen, kuten on selostettu osassa 3 yllä. Tulokset on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9

Kevytpetroliuuton jakeiden 144-176 (A) kouristusta laukaiseva vaikutus, testattu pitoisuudessa 10^{-4} g/ml.

Jakeet n:o	Ach	Prosentuaalinen inhibiitio	Histamiini
		5-HT	
A 25 - 29	77	100	87
A 30 - 34	60	48	55
A 35 - 36	94	100	100
A 37 - 38	97	98	97
A 39 - 46	83	93	92
A 47 - 52	100	100	100
A 53 - 58	100	100	100
A 59 - 65	100	100	100
A 66 - 67	90	100	100
A 68 - 72	87	90	92
A 73 - 85	75	80	70

Taulukosta 9 nähdään, että esillä olevan keksinnön mukaisesti tarhapäivänsäkkäristä saadut uutteen, jotka on saatu uuttamalla ei-polaarisella liuottimella, omaavat erityisen korkean kouristusta laukaisevan aktiviteetin, jonka uskotaan olevan käyttökelpoinen migreenin hoidossa. Sen vuoksi on odotettavissa, että ainakin ne jakeet, jotka 100 %:sti inhiboivat kaikkia kolmea agonistia Ach, 5-HT ja histamiinia tulevat olemaan tehokkaita migreeniä vastaan. On myös odotettavissa, että nämä jakeet ovat käyttökelpoisia tulehduksenvastaisia aineita ja hoidettaessa nivel- ja keuhkoputkivaivoja. Kaikki nämä jakeet sisältävät seskviterpeenilaktoneja, kuten seuraavasta nähdään.

C Kolmea agonistia 100 %:sesti inhiboivien jakeiden lisätutkimukset

(a) Jakeet A 59 - 65

Koska jakeet A 59-65 painoivat eniten 100 %:sesti aktiivisista jakeista, ne tutkittiin ensiksi.

Päätettiin erottaa jakeet A 59-65 preparatiivisella TLC:llä. 204 mg asetettiin neljälle 20 x 20 cm:n TLC-levylle (0,25 mm paksuja) ja kehitettiin kloroformi:metanolissa (98:2).

Kahdeksan nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm). Kussakin nauhassa olevat ainesosat uutettiin kloroformilla tavanomaiseen tapaan.

Jakeiden A 59-65 pääainesosat, so. nauha 6, kiteytyivät kloroformista ja metanolista DJ140a:n, 8' α - $\overline{4}$ ' α ,5' β -epoksi-1' β -(1 β ,10 β -epoksi-4 α -hydroksigermakr-11(13)-eeni-12, 6 α -olaktoyyli-5 β -yylioksi)-germakra-10'(14'), 11'(13')-dieeni-12', 6' α -olaktoyyli-7-8" α -(3 α -hydroksi-3 α , 4 α -dimetyyli-2 α -metyleeni-pentanoyyli)-4" α ,5" β -epoksi-1" β , 6" α -dihydroksigermakra-10"(14"), 11"(13")-dieeni-12"oaatin (chrysanthemoniinin,), hienoina neuloina (26 mg), sp. 211^o (hajoaa); UV: λ _{maks}^{EtOH} (log ϵ) 210 (4,01) nm; IR: ν _{maks}^{kiinteä kalvo} 3470 (hydroksyyli), 1760 ($>C=O$, γ -laktoni, 1715 ($>C=O$, esteri), 1665 ($>C=C<$, konjugoitu), 1640 ($>C=C<$), 1265 ($-C-O-C-$, epoksidi) cm⁻¹; ¹H NMR; δ (400 MHz, CDCl₃), 1,07 (3H, hajoaa, J = 7,0 Hz, H-5as tai 6as), 1,21 (3H, hajoaa, J = 7,0 Hz, H-6as tai 5as), 1,32 (3H, s, H-15s), 1,33 (3H, s, H-7as), 1,43 (3H, s, H-15's), 1,44 (3H, s, H-15"s), 1,59 (3H, s, H-14s), 1,97 (1H, dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 8-9'), 2,03 (1H, m, H-9"), 2,18 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-5), 2,38 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-5"), 2,42 (1H, d, J = 11,5 Hz, H-5'), 2,58 (1H, m, H-3a), 2,82 (1H, dd, J = 9,0, 9,0 Hz, H-7'), 2,89 (1H, dd, J = 9,5, 9,5 Hz, H-7"), 2,99 (1H, m, H-1"), 3,08 (1H, m, H-7), 3,36 (1H, s, H-1), 3,99 (1H, m, H-1'), 4,01 (1H, dd, J = 11,5, 9,0 Hz, H-6'), 4,09 (1H, dd, J = 9,5, 9,5 Hz, H-6"), 4,13 (1H, dd, J = 10,0, 10,0 Hz, H-6), 4,78 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-14'), 4,81

(1H, d, J = 2,0 Hz, H-14"), 5,09 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-14'), 5,12 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-14"), 5,19 (1H, m, H-8'), 5,33 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13a), 5,36 (1H, m, H-8"), 5,39 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13"a), 5,94 (2H, m, H-8a), 6,05 (1H, dd, J = 5,5, 1,0 Hz, H-13'a), 6,07 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13b), 6,09 (1H, dd, J = 5,5, 1,0 Hz, H-13'b), 6,13 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13"b); MS: m/z (% rel. int.), 381 (1,7), 367 (2,0), 273 (2,1), 261 (1,7), 259 (1,9), 247 (2,4), 246 (8,1), 245 (4,7), 243 (11,0), 229 (13,0), 228 (39,0), 226 (14,2), 213 (12,2), 202 (6,3), 201 (10,7), 200 (10,2), 199 (6,0), 198 (5,2), 197 (5,7), 185 (7,0), 183 (9,1), 173 (6,4), 169 (7,1), 167 (7,9), 157 (8,6), 156 (8,2), 97 (34,5), 95 (15,2), 94 (100,0), 83 (33,1), 71 (19,8), 43 (11,3).

(i) DJ140a:n hydrolyysi

52 mg DJ140a (yhdistetty emäliuosten kanssa) liuotettiin dioksaaniin (5 ml) ja stökiometrinen määrä K_2CO_3 :a (so. 245 mikrolitraa liuosta, jossa on 500 mg 5 ml:ssa) lisättiin. Reaktiota seurattiin TLC:llä. Seitsemän päivän jälkeen asteittaisella lämpötilan lisäyksellä ja lisäämällä vielä emästä voitiin havaita ainoastaan lähtöainetta.

2 ml KOH:n 2 %:sta vesiliuosta lisättiin sen jälkeen ja liuos refluksoitiin 30 minuuttia. Tavanomaisen käsittelyn jälkeen erotettiin seos preparatiivisella TLC:llä käyttäen $CHCl_3$:MeOH:ta (49:2) kehitysliuottimena. Yli 20 nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm) ja kun levyn reunaa suihkutettiin 20 %:sella tilavuus/tilavuus rikkihapolla ja kuumennettiin. Nauhassa 2 oleva pääainesosa uutettiin $CHCl_3$:lla. DJ140a (so. lähtöaine) paikallistettiin nauhas-
sa 3 ja tämä uutettiin ja hydrolysoitiin uudestaan käyttäen 2 %:sta paino/tilavuus KOH-liuosta ja jatkokäsiteltiin kuten yllä. Tämän nauhan orgaaniseen liuottimeen liukeneva osa ja alkuperäisen hydrolyysin nauhan 2 uute olivat identtisiä TLC:ssä. Ne yhdistettiin ja puhdistettiin TLC:llä käyttäen $CHCl_3$:MeOH:ta (98:2) kehitysliuottimena. Levy kehitettiin kolme kertaa. Pääainesosa paikallistettiin nauhaan 2 suihkut-

tamalla levyn reunaa rikkihapolla, kuten yllä ja kuumentamalla.

Tämä ainesosa puhdistettiin edelleen TLC:llä käyttäen kehitysluottimena $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$:ta (98:2). Kloroformiin uuttamisen jälkeen kiteytyi aine kloroformista ja heksaanista värittöminä levyinä (5 mg), joka oli DJ 140aH2, 4' α ,5' β -epoksi-8' α -hydroksi-1' β -(1 β ,10 β -epoksi-4 α -hydroksigermakr-11(13)-eeni-12,6 α -olaktoyyli-5 β -yylioksi)-germakra-10'(14'), 11'(13')-dien-12',6 α -olaktoni), sp. 159°C (d); UV: $\lambda_{\text{maks}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ), 209 (3,99) nm; IR: ν_{maks} kiinteä kalvo, 3500 (OH), 1760 ($>\text{C}=\text{O}$, γ -laktoni), 1665 ($>\text{C}=\text{C}<$, konjugoitu), 1640 ($>\text{C}=\text{C}<$), 1260 ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, epoksidi) cm^{-1} ; ^1H NMR: δ (400 MHz, CDCl_3), 1,32 (3H, s, H-15s), 1,40 (3H, s, H-15's), 1,48 (1H, m, H-8), 1,55 (3H, s, H-14s), 1,77 (1H, m, H-9'), 2,06 (1H, m, H-9'), 2,23 (1H, m, H-8), 2,30 (1H, d, J = 14,5 Hz), 2,44 (1H, m, H-7'), 2,46 (1H, d, J = 11,5 Hz, H-5'), 2,59 (1H, dd, J = 14,5, 5,0 Hz), 2,68 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-5), 3,01 (1H, m, H-8'), 3,20 (1H, m, H-7), 3,35 (1H, s, H-1), 3,92 (1H, dd, J = 11,5, 8,0 Hz, H-6'), 4,03 (1H, m, H-1'), 4,13 (1H, dd, J = 9,5, 9,5 Hz, H-6), 4,91 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-14'), 5,15 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-14'), 5,35 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13a), 5,89 (1H, dd, J = 5,5, 0,7 Hz, H-13'a), 6,07 (1H, dd, J = 5,5, 0,7 Hz, H-13'b), 6,09 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13b); ^{13}C NMR: δ (100,6 MHz, CDCl_3), 15,10, 18,69 ja 29,10 (C-14, C-15 ja C-15'), 23,40, 33,35, 34,64, 38,09, 38,77, 65,04 ja 66,08 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-8, C-9 ja C-9'), 43,24 ja 44,31 (C-7 ja C-7'), 50,72 (C-8'), 55,30, 61,39 ja 73,27 (C-4, C-10 ja C-4'), 50,86, 62,90, 65,66 ja 68,88 (C-1, C-1', C-5 ja C-5'), 75,35 ja 79,95 (C-6 ja C-6'), 118,00 ja 118,64 (C-13 ja C-13'), 135,69 (C-14'), 137,92 (C-10'), 140,98 (C-11), 170,60 ja 178,64 (C-12 ja C-12'), C-11' ei havaittu; MS: m/z (% rel.int.), 430 (1,1), 356 (1,3), 342 (1,3), 281 (2,7), 281 (1,0), 280 (4,3), 279 (12,9), 266 (1,4), 265 (7,1), 261 (1,3), 247 (2,7), 228 (5,0), 207 (8,9), 167 (15,4), 150 (10,5), 149 (100), 113 (5,3), 99 (6,1), 98 (5,4), 97 (6,4), 94 (9,7), 87 (5,5), 85,1 (11,1), 85,0 (30,6), 83,1 (7,8), 83,0 (46,0), 71 (18,4), 70 (10,5), 69

(15,2), 60 (5,6), 57 (50,7), 56 (16,9), 55 (22,9); tarkat massaspektrimittaukset: saatu: 265,1449; $C_{15}H_{21}O_4$ edellyttää 265,1440; havaittu: 279,1241; $C_{15}H_{19}O_5$ edellyttää 279,1232.

(b) Jakeet A 53-58 ja A 66-67

Nämä ~~jakeet~~ ~~jakeset~~ yhdistettiin (0,236 g) ja kromatografoitiin piigeelikelonnilalla (10 g). 100 ml:n jakeita otettiin ja yhdistettiin sopivasti TLC:tä varten. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden painot on esitetty taulukoissa 10 ja 11.

Taulukko 10

Petrolieetteriuuton jakeiden A 53-58 ja A 66-67 kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
Aa 1 - 19	2,5 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Aa 20 - 22	5 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Aa 23 - 30	10 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Aa 31 - 63	20 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Aa 64 - 98	30 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa

Taulukko 11

Petrolieetteriuuton jakeiden A 53-58 ja A 66-67 kolonnikromatografoinnin yhdistettyjen jakeiden painot

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Paino</u>	<u>% kokonaisuudesta</u>
Aa 1 - 46	0,007	3,0
Aa 47 - 49	0,019	8,1
Aa 50 - 63	0,039	16,5
Aa 64 - 69	0,048	20,3
Aa 70 - 76	0,030	12,7
Aa 77 - 93	0,056	23,7
Aa 94 - 98	0,028	11,9
	<u>0,227</u>	<u>96,2</u>

Jakeet Aa 70-76 sisälsivät ainoastaan pääainesosaa, joka kiteytyi kloroformista ja metanolista, jolloin saatiin 14 mg DJ140a, joka oli identtinen yllä olevista jakeista A 59-65 saadun kanssa.

Jakeet Aa 50-63 (0,039 g) erotettiin edelleen preparatiivisesti TLC:llä käyttäen kloroformi:metanolia (98:2) kehitysluottimena. Kolme nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm) ja niiden ainesosat uutettiin kloroformilla. Jakeiden Aa 50-63, so. nauhassa 2, pääainesosat painoivat 18 mg ja kiteytyivät kloroformista ja heksaanista värittöminä neuloina (8 mg), jotka olivat DJ177b, 9,10-epoksi-3,5-dihydroksiguja-4(15), 11(13)-dieeni-12, 6 α -olaktonia (chrysanthemolidia,), sp. 116-117^o (d); UV: $\lambda_{\text{maks}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ) 215 (4,10) nm; IR: ν_{maks} kiinteä kalvo, 3540 (OH), 1760 ($>\text{C}=\text{O}$, γ -laktoni), 1665 ($>\text{C}=\text{C}<$, konjugoitu), 1640 ($>\text{C}=\text{C}<$), 1250 ($-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{O}-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-$, epoksidi) cm^{-1} ; ^1H NMR: δ (400 MHz, CDCl_3), 1,57 (3H, s, H-14s), 1,73 (2H, m, H-9s), 1,98 (2H, m, H-8s), 2,18 (2H, m, H-2s), 2,31 (1H, dd, $J = 13,5, 11,0$ Hz, H-7), 2,81 ja 3,97 (1H, kukin, br ss, C-3 ja C-5 OHs), 4,41 (1H, m, H-3), 4,88 (1H, s, H-15a), 5,21 (1H, s, H-15b), 5,23 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-6), 5,45 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-13a), 6,18 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-13b); MS: m/z (% rel.int.), 280 (2,0), 279 (2,6), 278 (0,2), 267 (3,4), 266 (5,5), 265 (16,8), 264 (40,8), 263 (17,9), 262 (6,2), 258 (4,9), 260 (8,0), 258 (4,9), 230 (22,0), 226 (10,5), 223 (7,2), 222 (18,2), 220 (10,7), 180 (18,6), 179 (11,9), 169 (10,9), 166 (13,2), 165 (18,0), 164 (14,7), 163 (14,6), 161 (10,4), 157 (20,4), 155 (14,1), 153 (10,7), 152 (19,2), 151 (21,9), 150 (24,7), 143 (24,0), 137 (32,9), 135 (21,1), 129 (20,1), 125 (25,8), 124 (30,1), 123 (37,4), 111 (43,4), 110 (45,4), 109 (46,6), 101 (54,0), 97 (68,1), 95 (74,3), 85 (58,9), 84 (65,7), 83 (100,0), 81 (64,0), 69 (68,7); tarkat massaspektromittaukset: saatu 278,1150; $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$ edellyttää 278,1154.

(i) DJ177b:n asetylointi

4 mg DJ177b:tä asetyloitiin tavalliseen tapaan käyttäen

pyridiiniä ja etikkahappoanhydridiä. Tavanomaisen jatkokäsittelyn jälkeen havaittiin TLC-tutkimuksessa täpliä sekä lähtöaineesta että väjemmän polaarista tuotteesta. Ainetta oli liian vähän täydellistä puhdistusta varten, mutta raaka-tuotteen ^1H NMR-spektri antoi seuraavia lisäsignaaleja, jotka johtuivat asetaattituotteesta: δ , CDCl_3 : 2,16 (3H, s, CH_3CO_2^-) ja 4,60 (1H, m, H-3).

(c) Jakeet A47-42

Jakeet 47-52 (0,123 g) kromatografoitiin piigeelikolonnilla (10 g). 100 ml:n jakeita otettiin ja yhdistettiin sopivalla tavalla TLC:tä silmällä pitäen. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden paino on esitetty taulukoissa 12 ja 13.

Jakeet Ab 34-56 erotettiin edelleen edelleen preparatiivisella TLC:llä käyttäen kloroformi/metanolia (98:2) kehitysliuottimena. Neljä nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm) ja niiden ainesosat uutettiin kloroformilla. Pääainesosa, so. nauhassa 3 oleva painoi 20 mg ja kiteytyi kloroformista ja n-pentaanista, jolloin saatiin DJ179c. Tämä aine oli seskviterpeenilaktonien seos, joka vastusti kaikkia puhdistusyrityksiä. Sitä ei sen vuoksi tutkittu enempää.

Taulukko 12

Petrolieetteriuuton jakeiden A47-52 kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
Ab 1 - 8	10 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Ab 9 - 20	20 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Ab 21 - 56	25 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
Ab 57	kloroformia

Taulukko 13

Petrolieetteriuuton jakeiden A47 - 52 kolonnikromatografoinnin yhdistettyjen jakeiden painot

Jakeet n:o	Paino (grammoina)	% kokonaisuudesta
Ab 1 - 19	0,015	12,2
Ab 20 - 23	0,004	3,3
Ab 24 - 33	0,039	31,7
Ab 34 - 56	0,053	43,0
Ab 57	0,007	5,7
	0,118	95,9

Nauhassa 1 olevat ainesosat (11 mg) puhdistettiin edelleen preparatiivisella TLC:llä. Levy ajettiin seitsemän kertaa käyttäen kloroformi:metanolia (98:2) kehitysliuottimena. Neljä nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm) ja niiden komponentit uutettiin kloroformilla. Ainesosat jälkimmäisen levyn nauhassa 1 painoivat 6 mg ja kiteytyivät kloroformista ja n-penttaanista, jolloin saatiin DJ179a1. Tämä aine oli mahdollisesti myös seskviterpeenilaktonien seos, siitä huolimatta, että se antoi ainoastaan yhden täplän TLC-tutkimuksessa. ¹H-NMR-spektrissä nähtiin signaaleja, jotka voivat johtua reynosinista, chrysarteminista B ja mahdollisesti reynosinin dihydro-johdannaisesta. Aineen vähäisyys esti lisätutkimukset tässä vaiheessa, mutta se lisämahdollisuus, että aine on trimeerinen yhdiste, joka on melko lähellä DJ140a:ta, on otettava huomioon.

16 Petrolieetteriuuton jakeiden 124-143 (B) tutkimukset

Petroliuutosta saadut jakeet 124-143 eihkäisivät 100 %:sesti molempia agonisteja 5-HT:tä ja histamiinia ja 91 %:sesti Ach:ta.

A Jakeiden 124-143 (B) jatkoerotus

Nämä jakeet (7,526 g) kromatografoitiin piigeelelikolonnilla (150 g). Otettiin 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin TLC:tä varten sopivalla tavalla. Kolonnin liuotineluointi ja

yhdistettyjen jakeiden paino on esitetty taulukoissa 14 ja 15.

Taulukko 14

Petrolieetteriuutin jakeiden 124-143 (B) kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
B 1 - 27	heksaani
B 28 - 45	1 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 46 - 51	2 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 52 - 60	5 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 61 - 67	10 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 68 - 80	20 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 81 - 136	40 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 137 - 149	60 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 150 - 170	75 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
B 171 - 194	kloroformia
B 195 - 203	90 % tilavuus/tilavuus kloroformia metanolissa
B 204	50 % tilavuus/tilavuus kloroformia metanolissa

Taulukko 15.

Petrolieetteriuuton jakeiden 124-143 (B) kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden painot

Jakeet n:o	Paino (grammoina)	% kokonaisuudesta
B 1 - 9	0,011	0,1
B 10 - 90	0,040	0,5
B 91 - 106	0,025	0,3
B 107 - 111	2,484	33,0
B 112 - 115	1,537	20,4
B 116 - 122	0,490	6,5
B 123 - 130	0,316	4,2
B 131 - 147	0,252	3,3
B 148 - 163	0,454	6,0
B 164 - 171	0,200	2,6
B 172 - 196	0,810	10,8
B 197 - 198	0,682	9,1
B 199	0,078	1,0
B 200	0,083	1,1
B 201 - 204	0,048	0,6
	<u>7,510</u>	<u>99,6</u>

B Jakeiden 124-143 (B) kouristusta laukaiseva vaikutus

Yli 50 mg painavien jakeiden kouristusta laukaiseva vaikutus testattiin, kuten on selostettu yllä osassa 3. Tulokset on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16

Petrolieetteriuuton jakeiden 124-143 (B) kouristusta laukaiseva vaikutus, ⁴⁺¹testattu pitoisuudessa 10^{-4} g/ml

Jakeet n:o	Prosentuaalinen inhibiitto		
	Ach	5-HT	Histamiini
B 107 - 111	100	100	100
B 112 - 115	100	100	100
B 116 - 122	95	100	100
B 123 - 130	82	100	98
B 131 - 147	78	100	100
B 148 - 163	51	88	97
B 164 - 171	22	29	90
B 172 - 196	3	44	100
B 197 - 198	16	58	33
B 199	31	72	65
B 200	27	42	20

C Kolmea agonistia 100 %:sesti ehkäisevien jakeiden jatkotutkimus

Jakeet B 107 - 111 ehkäisivät 100 %:sesti kaikkia kolmea agonistia. Jakeet (2,434 g) kromatografoitiin piigelikolonnilla (120 g). Otettiin 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin sopivalla tavalla TLC:tä varten. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden paino on esitetty taulukoissa 17 ja 18.

Taulukko 17

Petrolieetteriuuton jakeiden B 107 - 111 kolonnikromatografian liuotineluointi

Jakeet n:o	Liuotin
Ba 1 - 5	10 % kloroformia heksaanissa
Ba 6 - 11	20 % kloroformia heksaanissa
Ba 12 - 70	30 % kloroformia heksaanissa
Ba 71 - 73	kloroformia

Taulukko 18

Petrolieetteriuuton jakeiden B 107 - 111 kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden painot

Jakeen n:o	Paino (grammoina)	% kokonaisuudesta
Ba 1 - 20	0,112	4,6
Ba 21 - 32	0,465	19,1
Ba 33	0,057	2,3
Ba 34 - 55	1,421	58,4
Ba 56 - 58	0,128	5,3
Ba 59 - 68	0,130	5,3
Ba 69 - 70	0,094	3,9
Ba 71 - 73	0,030	1,2
	2,437	100,1

B 107 - 11 pääkomponentti, so. alajakeissa Ba 34 - 55 oleva, kiteytettiin kloroformistaja heksaanista, jolloin saatiin parthenolidia (478 mg) värittöminä levyinä, sp. 113-114°;

UV: $\lambda_{\text{maks}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ) 213 (4,20) nm; IR: $\nu_{\text{maks}}^{\text{KBr}}$ 1760 ($>\text{C}=\text{O}$, γ -laktoni), 1660 ($>\text{C}=\text{C}<$, konjugoitu), 1640 ($>\text{C}=\text{C}<$), 1250 ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) cm^{-1} ; ^1H NMR: δ (400 MHz, CDCl_3), 1,32 (3H, s, H-15s), 1,73 (3H, s, H-14s), 2,81 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-5), 2,81 (1H, m, H-7), 3,87 (1H, dd, J = 8,5 Hz, H-6), 5,23 (1H, dd, J = 12,5, 3,0 Hz, H-1), 5,64 (1H, d, J = 3,8 Hz, H-13a), 6,35 (1H, d, J = 3,8 Hz, H-13b); ^{13}C NMR: δ (100,6 MHz, CDCl_3), 16,97, 17,24 (C-14 ja C-15), 24,11, 30,64 (C-8 ja C-3), 36,35, 41,19 (C-2 ja C-9), 47,65 (C-7), 61,45 (C-5), 66,36 (C-4), 82,38 (C-6), 121,08 (C-1), 125,24 (C-13), 134,51 (C-10), 139,21 (C-11), C-12 ei havaittu; MS: m/z (% rel. int.), 248 (1,5), 233 (1,1), 230 (8,1), 190 (9,3), 107 (8,4), 105 (12,2), 95 (8,9), 91 (13,6), 81 (12,4), 79 (11,7), 77 (9,2), 67 (9,6), 58 (24,8), 55 (12,0), 53 (17,3), 43 (100,0).

Tämä aine oli identtinen kaikissa suhteissa F. Sorm'in autenttisen näytteen kanssa.

17 Petrolieetteriuuton jakeiden 75-80 (C) tutkimukset

Petroliuuton jakeet 75-80 (C) ehkäisivät 100 %:sesti kahta agonistia, 5-HT histamiinia ja 91 %:sesti Ach:ta.

A Jakeiden 75-80 (C) jatkoerotus

0,65 g kromatografoitiin piigeelelikolonnilla (60 g). Otettiin talteen 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin TLC:tä silmällä pitten sopivalla tavalla. Yhdistettyjen jakeiden painot ja kolonnin liuotineluointi on esitetty taulukoissa 19 ja 20.

Taulukko 19

Petrolieetteriuuton jakeiden 75-80 (C) kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
C 1 - 3	5 % kloroformia heksaanissa
C 4 - 12	10 % kloroformia heksaanissa
C 13 - 29	20 % kloroformia heksaanissa
C 30 - 33	40 % kloroformia heksaanissa
C 34	kloroformia

Taulukko 20

Petrolieetteriuuton jakeiden 75-80 (C) kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden painot

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Paino (grammoina)</u>	<u>% kokonaisuudesta</u>
C 1 - 15	0,020	3,1
C 16 - 19	0,036	5,5
C 20 - 24	0,446	68,6
C 25 - 26	0,044	6,8
C 27 - 39	0,103	15,8
	<u>0,649</u>	<u>99,8</u>

Kaikilta näiltä alajakeilta puuttui kouristusta laukaiseva vaikutus pitoisuudessa 10^{-4} g/ml eikä niitä sen vuoksi tutkittu enempää.

18 Petroliuuton jakeiden 177 - 200 (D) tutkimukset

Petroliuuton jakeet 177 - 200 ehkäisivät 100 %:sesti molempia agonisteja 5-HT ja histamiinia ja 81 %:sesti Ach:ta.

A Jakeiden 177 - 200 (D) jatkoerotus

Nämä jakeet (0,729 g) kromatografoitiin piigeelelikolonnilla

(30 g). Otettiin 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin sopivasti TLC:tä varten. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistettyjen jakeiden painot on esitetty taulukoissa 21 ja 22.

Taulukko 21

Petrolieetteriuuton jakeiden 177-200 (D) kolonnikromatografian liuotineluointi

<u>Jakeet n:o</u>	<u>Liuotin</u>
D 1 - 12	25 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
D 13 - 17	40 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
D 18 - 24	60 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
D 25 - 31	80 % tilavuus/tilavuus etyyliasetaattia heksaanissa
D 32 - 36	etyyliasetaattia
D 37 - 40	10 % tilavuus/tilavuus kloroformia etyyliasetaatissa
D 41 - 45	30 % tilavuus/tilavuus kloroformia etyyliasetaatissa

Taulukko 22

Petrolieetteriuuton jakeiden 177-200 (D) kolonnikromatografian yhdistettyjen jakeiden painot

<u>Jakeen n:o</u>	<u>Paino (grammoina)</u>	<u>% kokonaisuudesta</u>
D 1 - 3	0,037	5,1
D 4 - 8	0,090	12,3
D 9 - 10	0,049	6,7
D 11 - 15	0,088	12,1
D 16 - 20	0,240	32,9
D 21 - 26	0,160	21,9
D 27 - 45	0,070	9,6
Yhteensä = 0,734		100,6

B Kokeiden 177 - 200 (D) kouristusta laukaiseva vaikutus

Yli 50 mg painavia jakeita testattiin kouristusta laukaisevan vaikutuksen suhteen, kuten on selostettu yllä osassa 3. Tulokset on esitetty taulukossa 23.

Taulukko 23

Petrolieetteriuuton jakeiden 177 - 200 (D) kouristusta laukaiseva vaikutus, ~~testattu~~ ^{testattu} pitoisuudessa 10^{-4} g/ml

Jakeet n:o	Prosentuaalinen inhibiito		Histamiini
	Ach	5-HT	
D 1 - 4	64	96	91
D 4 - 8	81	92	93
D 11 - 15	97	100	100
D 16 - 20	100	100	100
D 21 - 26	100	100	100
D 27 - 45	47	52	67

C Agonisteja 100 %:sesti ehkäisevien jakeiden jatkotutkimus

(a) Jakeet D 16 - 20

Jakeet D 16-20 (0,175 g) erotettiin edelleen preparatiivisella TLC:llä käyttäen kloroformi:metanolia (95:5) kehitysluottimena. Levyjä ajettiin kolme kertaa. Kolme nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalossa (254 nm) ja niiden ainesosat uutettiin kloroformilla. Pääkomponentti, so. nauhassa 1, painoi 59 mg ja kiteytyi kloroformista ja metanolista väritöminä levyinä (26 mg), joka oli DJ 154a, sp. 248⁰; UV: $\lambda_{\text{maks}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ) 208 (3,98) nm; IR: $\nu_{\text{maks}}^{\text{KBr}}$ 3420 (OH), 1760 ($>\text{C}=\text{O}$, γ -laktoni), 1675 ($>\text{C}=\text{C}<$, konjugoitu), 1260 ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, epoksidi) cm^{-1} ; ^1H NMR: δ (400 MHz, CDCl_3), 1,5 (3H, s, H-15s), 1,58 (3H, s, H-14s), 2,87 (1H, d, J = 11,0 Hz, H-5), 3,30 (1H, m, H-7), 3,32 (1H, d, J = 1,3 Hz, H-3), 3,57 (1H, d, J = 1,3 Hz, H-2), 4,09 (1H, dd, J = 11,0, 10,0 Hz, H-6), 5,54 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13a), 6,19 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13b); MS: m/z (% rel. int.) 279 (0,7), 278 (2,1), 263 (2,3), 262 (4,7), 260 (3,1), 249 (3,1), 231 (6,3), 217 (8,6), 203 (9,4), 189 (12,5), 175 (15,6), 165 (26,6), 151 (40,6), 149 (23,4), 147 (28,9), 123 (26,6), 121 (33,6), 112 (88,3), 109 (42,2), 97 (35,9), 95 (93,8), 91 (41,4), 85 (47,7), 83 (44,5), 81 (36,7), 79 (38,3), 77 (35,9), 71 (78,1), 69 (52,3), 67 (49,2), 57 (93,8), 55 (71,1), 53 (75,8), 43 (100,0). Kirjallisuudesta sp. 250⁰.

Tämä aine oli identtinen kaikissa suhteissa chrysarteminin A kirjallisuutietojen kanssa.

(b) Jakeet D 21 - 26

Jakeet D 21 - 26 (0,110 g) erotettiin edelleen preparatiivisella TLC:llä käyttäen kloroformi:metanolia (95:5) kehitysluottimena. Levyjä ajettiin kolme kertaa. Kolme nauhaa paikallistettiin ultraviolettivalolla (254 nm) ja suihkuttamalla levyn reunaa H_2SO_4 :llä ja kuumentamalla. Niiden ainesosat uutettiin kloroformilla.

Jakeiden D 21 - 26 pääkomponentti, s0. nauhassa 2, kiteytyi kloroformista ja heksaanista, jolloin saatiin värittömiä neuvoja (16 mg), jotka olivat DJ156a, $4\alpha,10\beta$ -dihydroki- $1\beta,5\alpha$ -guija-11(13)-eeni-12,6 α -olaktonia (partholidia), sp. 1540; UV: $\lambda_{\text{maks}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ) 208 (3,95) nm; IR: ν_{maks} kiinteä kalvo, 3490 (OH), 1750 ($>C=O$, γ -laktoni), 1660 ($>C=C<$, konjugoitu), 1640 ($>C=C<$); 1H NMR: δ (400 MHz, $CDCl_3$), 1,25 (3H, s, H-14s), 1,35 (3H, s, H-15s), 1,47 (1H, m, H-8), 1,62 (2H, m, H-2s), 1,67 - 2,04 (6H, leveä m, H-3s, H-9s, 2 x OHs), 2,16 (1H, m, H-8), 2,39 (1H, dd, J = 12,3, 12,3 Hz, H-5), 2,63 (1H, m, H-1), 2-70 (1H, m, H-7), 4,24 (1H, dd, J = 12,3, 9,5 Hz, H-6), 5,54 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13a), 6,25 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-13b); ^{13}C NMR: δ (100,6 MHz, $CDCl_3$), 23,51, 24,25 (C-14 ja C-15), 25,01, 25,33 (C-2 ja C-8), 39,34, 43,77 (C-3 ja C-9), 47,22 (C-7), 49,78 (C-1), 55,35 (C-5), 74,72 (C-4), 79,88 (C-10), 82,74 (C-6), 120,37 (C-13), 138,45 (C-11), 169,37 (C-12); MS: m/z (% rel.int.), 266 (0,4), 265 (0,9), 264 (1,8), 263 (1,8), 262 (3,6), 261 (2,7), 260 (4,5), 249 (3,0), 248 (6,0), 247 (7,2), 246 (18,0), 245 (6,3), 244 (13,5), 232 (4,5), 231 (15,3), 230 (10,0), 229 (9,0), 228 (19,8), 215 (12,6), 213 (18,9), 203 (22,5), 191 (22,5), 190 (27,0), 188 (24,3), 175 (24,3), 173 (22,5), 159 (24,3), 105 (45,0), 95 (44,6), 93 (44,1), 91 (59,5), 83 (85,6), 81 (51,4), 79 (49,5), 71 (42,3), 69 (47,7), 57 (59,5), 55 (91,9), 43 (100,0); tarkat massaspekttrimittaukset: saatu: 264,1364; $C_{15}H_{20}O_4$ edellyttää 264,1362.

19 Petrolieetteriuuton jakeiden 119 - 123 (E) tutkimukset
 Petroliuuton jakeet 119-123 ehkäisivät 97 %:sesti 5-HT:tä
 ja histamiinia ja 84 %:sesti Ach:ta.

A Jakeiden 119 - 123 (E) jatkoerotus

Nämä jakeet (1,583 g) kromatografoitiin piigeelekolonnilla
 (30 g), Otettiin 100 ml:n jakeita ja yhdistettiin sopivalla
 tavalla TLC:tä varten. Kolonnin liuotineluointi ja yhdistet-
 tyjen jakeiden painot on esitetty taulukoissa 24 ja 25.

Taulukko 24

Petrolieetteriuuton jakeiden 119-123 (E) kolonnikromatogra-
 fian liuotineluointi

Jakeet n:o	<u>Liuotin</u>
E 1 - 2	heksaania
E 3 - 5	10 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
E 6 - 31	20 % tilavuus/tilavuus kloroformia heksaanissa
E 32	kloroformia

Taulukko 25

Petrolieetteriuuton jakeiden 119 - 123 (E) kolonnikromato-
 grafian yhdistettyjen jakeiden painot

Jakeen n:o	Paino (grammoina)	% kokonaisuudesta
E 1 - 13	0,010	0,6
E 14	0,007	0,4
E 15	0,058	3,7
E 16 - 18	0,450	28,4
E 19 - 21	0,201	12,7
E 22 - 31	0,148	9,3
E 32 - 36	0,251	15,9
E 37 - 38	0,064	4,0
E 39	0,395	25,0
	<u>1,584</u>	<u>100,0</u>

B Jakeiden 119 - 123 (E) kouristusta laukaiseva vaikutus

Yli 50 mg painavien jakeiden kouristusta laukaiseva vaikutus testattiin, kuten on selostettu yllä osassa 3. Tulokset on esitetty taulukossa 26.

Taulukko 26

Petrolieetteriuuton jakeiden 119 - 123 (E) kouristusta laukaiseva vaikutus, testattu pitoisuudessa 10^{-4} g/ml.

Jakeen n:o	Prosentuaalinen inhibiito		
	Ach	5-HT	Histamiini
E 15	67	97	91
E 16 - 18	57	96	89
E 19 - 21	85	100	100
E 22 - 31	28	100	92
E 32 - 36	85	100	98
E 37 - 38	56	100	100
E 39	78	100	91

C Agonisteja 100 %:sesti inhiboivien jakeiden lisätutkimus

Jakeet E 15 - 21 yhdistettiin ja puhdistettiin TLC:llä käyttäen kloroformi:heksaania (75:25) kehitysliuottimena. Pääkomponentti uutettiin ja identifioitiin parthenolidiksi vertaamalla kromatografisesti autenttisen näytteen kanssa ja spektroskooppisilla menetelmillä.

Kuten yllä olevasta nähdään, voidaan uuttamalla tarhapäivänkakkaraa ei-polaarisella liuottimella aolaansaada jakeita, joilla on korkea kouristusta laukaiseva aktiivisuus, joista jakeista voidaan saada puhtaita seskviterpeenilaktoneja.

Yhdisteet 140a, 156a ja 177b , joita ilmeisesti ei kirjallisuudessa aikaisemmin ole selostettu, liikkuvat ohutkerroskromatografiassa seuraavasti:

Yhdiste	Liuotin	R _f
140a	kloroformi/metanoli (98/2) - kehitetty kerran	0,49
156a	kloroformi/metanoli (95/5) - ajettu kolme kertaa	0,35
177b	kloroformi/metanoli (98/2) - kehitetty kerran	0,34

Kapselien valmistus

Esimerkki 1

Jauhettuja tarhapäivänsäkkäran lehtiä ja soi-japapuöljyä sekoitettiin seuraavissa suhteissa:

jauhettua tarhapäivänsäkkäran lehteä	10,0 kg
soi-japapuöljyä	100,0 kg

Seoksen annetaan seistä 14 päivää sekoittaen aktiivisten ainesosien uuttamiseksi ja stabiloitiin sen jälkeen:

lesitiiniä	2,2 kg
hydrattuja rasvoja	30,0 kg
mehiläisvahaa	10,0 kg

Seos kapseloidaan pehmeäkuoriseen kapseliin tai kovakuoriseen kapseliin, edustaen 25 mg:n annosta kuivattua lehteä. Tämä pannaan 7,5 ovaaliin pehmeäkuoriseen kapseliin tai numero 2:n kovakuoriseen kapseliin täyttöpainon ollessa 380,5 mg.

Eräässä vaihtoehtoisessa menetelmässä seos siivilöidään ja saatu massa, kapseloitu öljymäisenä uutteenä, stabiloidaan yhdellä tai useammalla yllä selostetulla suspendointiaineella pehmeäkuoriseen tai kaksiosaiseen kovakuoriseen gelatiinikapseliin.

Esimerkki 2

Jauhettua tarhapäivänsäkkäran lehteä ja turskanmaksiiöljyä sekoitetaan seuraavissa suhteissa:

kuivaa tarhapäivänkakkaran lehteä	10,0 kg
turskanmaksaöljyä	100,0 kg

Seoksen annetaan seistä 14 päivää aktiivisten ainesosien uuttamiseksi.

Saatu seos suodatetaan ja suodate kapseloidaan täyttöpainon ollessa 250 mg annosyksikköä kohti, joka vastaa suurin piirtein 250 mg kuivattua lehteä pehmeäkuoriseen tai kaksiosaiseen kovakuoriseen kapseliin.

Eräässä vaihtoehtoisessa menetelmässä suspensio tai massa sekoitetaan pinta-aktiivisten aineiden tai niiden seoksien kanssa, kuten polyetoksirasvahapposorbitaaniesterien, mono- ja diglyseridien, asetyloitujen glyseridien kanssa itse-emulgoivan järjestelmän aikaansaamiseksi.

Saatu formulaatti kapseloidaan pehmeäkuoriseen tai kahdesta osasta olevaan kovakuoriseen kapseliin.

On odotettavissa, että seokset ja annokset edistävät öljymäisten aktiivisten perusteiden vapautumista säädetyllä nopeudella.

Esimerkki 3

Alla olevat aineet sekoitetaan keskenään:

Puriste tarhapäivänkakkaran kuivista kehdistä (kuten yllä)	100,0 kg
Polyetoksisorbitaanomono-oleaattia	37,0 kg
Mono- ja diglyseridien seos	29,0 kg

Nämä sekoitetaan ja kapseloidaan annostäyttöpainon ollessa 415 mg pehmeäkuoriseen tai kahdesta osasta koostuvaan kovakuoriseen kapseliin, joka edustaa suurin piirtein 25 mg kuivia tarhapäivänkakkaran lehtiä.

Pehmeäkuorista tai kahdesta osasta muodostuvaa kovakuorista gelatiinikapselia voidaan käyttää suun kautta tai peräsuoleen otettuna.

Hajoamisen tai absorption viivyttämiseksi voidaan ne käsitellä käyttämällä mahanesteille vastustuskykyisiä päällysteitä, kuten hydroksimetyylipropyyliselluloosaa tai sisältö voidaan sekoittaa polymeeristen matriisiaiaineiden kanssa farmaseuttisesta teollisuudesta tunnetulla tavalla aktiivisten prinssiipien vapauttamiseksi säädetyllä nopeudella.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä spasmolyttisesti aktiivisen koostumuksen valmistamiseksi, joka koostumus käsittää seskviterpeenilaktonia sisältävän uutteen kasvista *Tanacetum parthenium*, tunnettu siitä, että

(a) suspendoidaan mainitun kasvin kuivien lehtien osasia öljyyn, joka on tyydyttynyt tai tyydyttymätön C₁₀-25-hiilivety, tyydyttynyt tai tyydyttymätön C₁₀-25-rasvahappo, mainitun rasvahapon polyoksietyloitu johdannainen tai mainitun rasvahapon rekonstituoitu glyseridi tai esteri,

(b) annetaan öljyn uuttaa kuivista lehdistä seskviterpeenilaktonia sisältävä uute, jolloin saadaan seos, jossa on öljyyn liuennutta, seskviterpeenilaktonia sisältävää uutetta ja kuivien lehtien osasia, joka seskviterpeenilaktonia sisältävä uute sisältää seskviterpeenilaktonin partenolidiⁿ spasmolyttisesti aktiivisena aineosana, ja

(c) joko poistetaan seoksesta kuivien lehtien osaset tai lisätään seokseen stabiloimisaine pysyvän suspension muodostamiseksi, jossa on kuivien lehtien osasia öljyssä, jolloin molemmissa tapauksissa saadaan spasmolyttisesti aktiivinen koostumus.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa (c) lisätään seokseen stabiloimisaine pysyvän suspension muodostamiseksi, jossa on kuivien lehtien osasia öljyssä.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että öljy on kasvis- tai eläinöljy.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kasvisöljy on kookosöljy tai soijaöljy.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että eläinöljy on kalaöljy.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kalaöljy on turskanmaksaöljy.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en spasmolytiskt aktiv komposition, vilken komposition innefattar ett seskviterpenlakton innehållande extrakt ur växten *Tanacetum parthenium*, **kännetecknat** av att man

(a) suspenderar partiklar av torra blad av nämnda växt i en olja som utgöres av ett mättat eller omättat C₁₀₋₂₅-kolväte, en mättad eller omättad C₁₀₋₂₅-fettsyra, ett polyoxietylerat derivat av nämnda fettsyra eller en rekonstituerad glycerid eller ester av nämnda fettsyra,

(b) låter oljan utextrahera det seskviterpenlakton innehållande extraktet ur de torra bladen, varvid man erhåller en blandning av det seskviterpenlakton innehållande extraktet upplöst i oljan och partiklarna av de torra bladen, vilket seskviterpenlakton innehållande extrakt innehåller seskviterpenlaktonet partenolid som en spasmolytiskt aktiv komponent, och

(c) antingen avlägsnar från blandningen partiklarna av de torra bladen eller tillsätter i blandningen en stabilisator för bildande av en stabil suspension av partiklarna av de torra bladen i oljan, varvid man i båda fallen erhåller en spasmolytiskt aktiv komposition.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att man i steg (C) tillsätter i blandningen en stabilisator för bildande av en stabil suspension av partiklarna av de torra bladen i oljan.

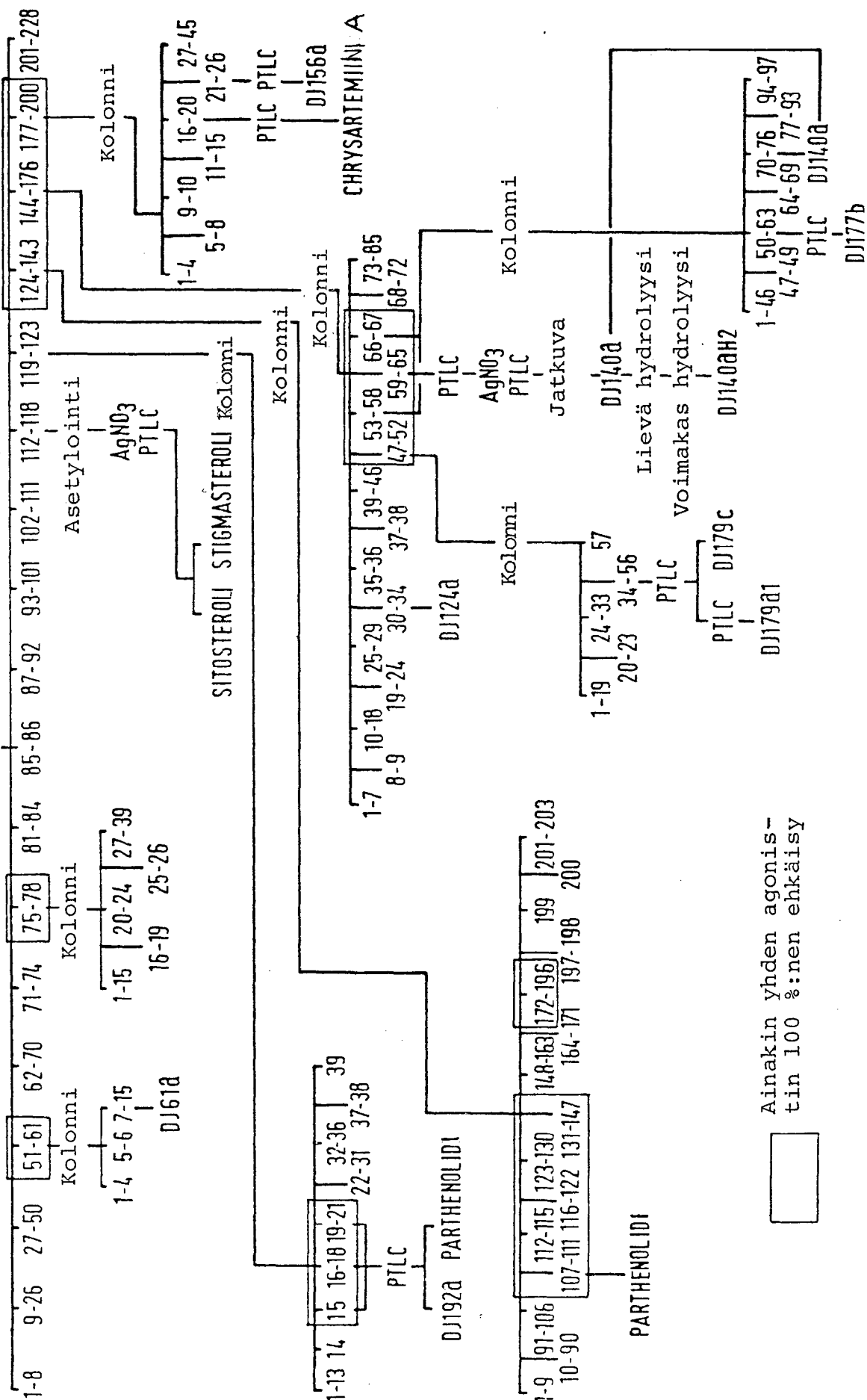
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** av att oljan är en vegetabilisk eller animalisk olja.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, kännetecknat av att den vegetabiliska oljan är kokosolja eller sojaolja.

5. Förfarande enligt patentkravet 3, kännetecknat av att den animaliska oljan är fiskolja.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, kännetecknat av att fiskoljan är torskleverolja.

Kolonne



Ainakin yhden agonis-
tin 100 %:nen ehkäisy

L 19

HYV. NAHT.

Hak.n:o 831740

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga.

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.



Missing part