

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

240957

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴

A 23 K 1/175

A 61 K 33/04

/22/ Přihlášeno 01 04 83

/21/ PV 2291-83

/32//31//33/ Právo přednosti od 07 04 82

/821233/ Finsko

(40) Zveřejněno 13 06 85

(45) Vydáno 14 08 87

(72) Autor vynálezu PEKKANEN TIMO JUHANI, VANTAA /Finsko/

(73) Majitel patentu ORION-YHTYMÄ OY, HELSINKI /Finsko/

(54) Způsob výroby stabilního roztoku, obsahujícího železo a selen

Způsob výroby roztoku s obsahem železa a selenu ve stabilní kompatibilní formě, určeného pro ošetřování jejich deficiencí ních stavů, zvláště u zvířat, se provádí zreagováním rozpustné sloučeniny selenu se železo-polysacharidovým komplexem ve vodném prostředí.

Vynález se týká způsobu výroby stabilních roztoků obsahujících železo a selen ve vzájemné kompatibilitě, určeného pro zvířata a lidi k ošetřování nedostatkových /deficienčních/ stavů těchto stopových prvků.

Želena a selen jsou esenciálními prvky a jejich nedostatek vede k anémii /při nedostatku železa/ a ke zhoršení schopnosti překonávat různé druhy námahy /při nedostatku selenu/. Mladá, rychle rostoucí zvířata, například jalovice, jehňata a zejména selata mohou trpět nedostatkem železa a selenu.

Sele získává z mléka prasnice denně jenom 1 mg železa, ačkoli potřebuje 7 až 8 mg. V oblastech, kde je půda obzvláště chudá na selen, nezískávají selata dostatek selenu a jsou náchylná k různým degenerativním chorobám.

S cílem vyhovět požadavkům na železo a selen u rostoucích zvířat od narození, podává se dnes selatům ve stáří 1 až 3 dnů železo a selen ve formě intramuskulární nebo subkutánní injekce. Železo se dodává obvykle ve formě ferri-dextranu, odpovídajícího 100 až 200 mg železa. Selen se podává jako seleničitan sodný v dávce přibližně 0,06 mg Se^{4+} /kg.

Protože poločas selenu je v organismu krátký a jeho nadbytek se neukládá ve významném stupni, poskytuje jediná injekce selenu jenom krátkodobou ochranu.

Protože injekce železa a selenu musí být podávány velikému počtu selat, uspořilo by se mnoho práce, kdyby tyto látky mohly být spojeny v roztoku jediné injekce. Podávání jedné injekce místo dvou by rovněž zmenšilo poranění způsobená injekcemi i riziko infekce.

Selen a železo nebyly zatím kombinovány v jednom roztoku, protože je známo, že selen vytváří se železem nerozpustné sloučeniny. Toho se využívá při analýze selenu. Ve skutečnosti byla veřejnost naopak varována proti zavádění solí selenu nebo jejich roztoků do zdrojů pitné vody, protože se v přítomnosti sloučenin železa vysrážejí.

Nyní bylo podle vynálezu shledáno, že připravuje-li se roztok reakcí rozpustné sloučeniny selenu s železo-polysacharidovým komplexem o vysoké molekulové hmotnosti, selen se proti očekávání nevysráží.

V případě přítomného vynálezu velmi pravděpodobně vzniká nová, v roztoku stálá, makromolekulární látka, obsahující selen a železo, rozpustná ve vodě /mající dosud přesně neobjasněnou chemickou konfiguraci/, která se získává vzájemnou reakcí sloučeniny selenu se železo-polysacharidovým komplexem.

Nevzniká však jednoduchá směs, což nepochybně plyne ze skutečnosti, že postupem podle vynálezu nevzniká ssedlina vypadávající z roztoku, jak tomu podle dosavadního stavu techniky je v případě smíšení běžných sloučenin železa se sloučeninami selenu.

Pro praktické účely sledované vynálezem postačuje aplikovat roztok této látky, přičemž není třeba ji z reakčního roztoku izolovat. Výhodným a překvapivým účinkem vynálezu je stabilita výsledného roztoku obsahujícího zároveň selen i železo, což jsou prvky až dosud pokládáné za vzájemně inkompatibilní /nesnášenlivé/ ve směsích svých sloučenin, zejména po rozpouštění ve vodě.

Způsob výroby stabilního roztoku, obsahujícího železo a selen ve vzájemné kompatibilitě, určeného pro ošetřování nedostatkových stavů těchto stopových prvků, spočívá tedy podle vynálezu v tom, že rozpustná sloučenina selenu se uvádí do reakce se železo-polysacharidovým komplexem ve hmotnostním poměru selenu k železu 10^{-5} až 10^{-1} ku 1.

Jako rozpustné sloučeniny selenu se výhodně používá oxidu seleničitého nebo seleničitanu sodného.

Jako železo-polysacharidového komplexu se používá s výhodou ferri-dextranu nebo ferri-polymaltózy.

Sloučenina selenu a sloučenina železa se uvádějí do reakce s výhodou ve hmotnostním poměru selenu k železu v reakčních složkách 10^{-3} až 10^{-2} ku 1.

Rovněž bylo pozorováno, že injekce roztoku připraveného podle vynálezu, podávané zvířatům, poskytují dodatkový zdroj selenu, který se může překvapivě ukládat v organismu. Mechanismus ukládání není jasný, lze však předpokládat ukládání přebytku selenu ve formě železo-selenových komplexů.

V podstatě lze v novém přípravku použít kteroukoli fyziologicky asimilovatelnou rozpustnou sloučeninu selenu. Seleničitan sodný a kysličník seleničitý jsou obzvláště vhodné.

Nejlepšími komplexy železa s polysacharidy jsou ferri-dextran a ferri-polymaltóza.

Obsahy železa a selenu v roztoku lze měnit v širokém rozpětí podle toho, zda stavy nedostatku jsou primárně způsobeny nedostatkem železa nebo nedostatkem selenu. Poměr selenu k železu může být od 10^{-5} do 10^{-1} ku 1 vyjádřeno hmotnostně, přičemž je obzvláště vhodný poměr od 10^{-3} do 10^{-2} ku 1.

Roztok se připravuje jednoduše uváděním sloučeniny selenu do vodného roztoku železo-polysacharidového komplexu nebo do odpovídajícího hydrolyzátu/ a přidáním tolika vody, kolik je třeba. Alternativně lze práškované látky smíchat a potom před použitím se přidává voda /nebo některé jiné rozpouštědlo/, nebo se může připravit pasta. Je-li to žádoucí, lze ke směsi přidávat jiné látky, například vitamín E.

Nový druh přípravku obsahujícího seleničitan sodný a ferridextran byl podáván intramuskulárně třem prasatům o hmotnosti 15 až 25 kg, trpícím nedostatkem selenu. Jiným třem prasatům trpícím nedostatkem selenu byly podávány stejné dávky seleničitanu sodného.

Obsah selenu v séru a aktivita enzymu glutathion-peroxidázy byly vzaty za míru bioaktivity selenu v organismu. Bylo zjištěno, že obsah selenu i aktivita glutathion-peroxidázy /gSH-Px/ byly významně vyšší u prasat, jimž byl podán přípravek, než u prasat, která dostala jenom selen /tabulka 1/. Po dobu zkoušení dostávala všechna prasata stejnou dietu.

T a b u l k a 1

Číslo	Vzorek O		osmého dne		patnáctého dne	
	gSH-Px	Se	gSH-Px	Se	gSH-Px	Se
	IU-1	ng/ml	IU-1	ng/ml	IU-1	ng/ml
1	373	28	1 065	53	632	40
2	298	19	796	47	437	32
3	325	23	926	47	484	34
průměr	332	23	926	49	518	35
4	374	20	1 288	65	804	46
5	279	18	1 365	63	752	49
6	429	26	1 643	90	706	51
průměr	361	21	1 432	73	754	49

Zvířata číslo 1, 2 a 3 dostala 0,06 mg Se na kg tělesné hmotnosti intramuskulárně ve formě seleničitanu sodného.

Zvířata číslo 4, 5 a 6 dostala 0,06 mg Se na kg tělesné hmotnosti intramuskulárně ve formě seleničitanu sodného kombinovaného s ferri-dextranem, 200 mg Fe v dávce.

Jak je uvedeno v tabulce č. 1, přípravek obsahující železo a selen působí zřetelně pozorovatelný vzrůst bioaktivity selenu. Po uplynutí 8 dnů byla průměrná bioaktivita u zvířat, kterým byl podán jenom selen, 926 IU/l, zatímco u zvířat, která dostala přípravek obsahující železo a selen byla 1 432 IU/l.

Po 15 dnech byly odpovídající hodnoty 518 IU/l a IU/l. Hladina selenu v séru zůstala rovněž značně zvýšena. Hladina selenu v séru zvířat, kterým byl podán přípravek, byla po uplynutí doby 15 dnů nezměněna, zatímco u zvířat, která dostala samotný selen, zůstala zvýšena jenom po dobu 8 dnů.

Šesti novorozenejším selatům vážícím asi 1 kg byla podána intramuskulárně dávka 2 ml nového přípravku obsahujícího železo a selen, přičemž každý ml obsahoval 100 mg Fe^{+3} ve formě ferri-dextranu a 0,15 mg Se^{+4} ve formě seleničitanu sodného.

Proti očekávání bylo shledáno, že hladiny selenu a glutathion-peroxidázy v séru byly vysoké ještě po dobu 4 dalších týdnů /tabulka 2/. K tomu docházelo přesto, že zvířata byla krmena mlékem prasnic udržovaných během tohoto období při dietě s nízkým obsahem selenu.

Pět podobných selat se stejnou dietou tvořilo kontrolní skupinu. Kontrolním zvířatům bylo podáno intramuskulárně 200 mg Fe^{+3} ferri-dextranu ve stejnou dobu jako injekce hodnocené skupiny.

O čtyři týdny později byly v jejich séru zjištěny průměrné hladiny selenu 55,4 ng/ml a průměrné hladiny glutathionové peroxidázové aktivity 710,8 IU/l. Rozdíly mezi průměrnými hladinami u hodnocené skupiny a u kontrolní skupiny byly statisticky významné, rozdíl glutathion-peroxidázové aktivity při 99 % spolehlivosti a rozdíl Se-aktivity při 95 % spolehlivosti /test podle Wilcoxonsona, Manna a Whitneye/.

Hladiny selenu a glutathion-peroxidázy v sérech selat ošetřených novým přípravkem lze považovat za ještě dostatečně vysoké po 4 týdny po podání, zatímco odpovídající hodnoty kontrolní skupiny ukazují stav nedostatku. Je třeba poznamenat, že dávka selenu 0,3 mg/kg užitá v pokuse je pětkrát vyšší než normální dávka; přitom je o selenu známo, že se rychle vylučuje z organismu.

T a b u l k a 2

Číslo	hodnoty 0		+1 týden		+2 týdny		+4 týdny	
	gSH-Px	Se	gSH-Px	Se	gSH-Px	Se	gSH-Px	Se
	IU/l	ng/ml	IU/l	ng/ml	IU/l	ng/ml	IU/l	ng/ml
7	467	53,6	520	68,9	648	70,2	1 074	97,1
8	n.	n.	480	88,5	868	67,4	1 010	69,5
9	402	76,4	601	105,2	953	86,3	1 006	70,1
10	357	44,5	503	77,5	555	57,8	822	54,5
11	n.	n.	486	63,4	799	73,6	906	69,5
12	414	44,8	562	89,0	649	76,9	973	60,4
Průměr	410	54,8	525,3	98,5	745,3	72,0	965,2	70,2

Vysvětlivky:

0,3 mg/Se/kg spolu s 200 mg Fe^{+3}

n. = nehodnoceno

V jiné studii byly dvě prasnice udržovány při dietě s nízkým obsahem selenu po dobu posledních čtyř týdnů březivosti a po dobu laktace. 25 živě narozených selat bylo ve stáří tří dnů rozděleno do dvou skupin /12 + 13 zvířat/, přičemž obě skupiny obsahovaly selata od obou prasnic.

Všem selatům byly odebírány vzorky krve pro stanovení hodnot selenu a glutathion-peroxidázy a počtu krvinek. Hodnocené skupině /13 selat/ byla podána subkutánní injekce 200 mg /2 ml/ Fe^{+3} ve formě ferri-dextranu, ke kterému byl přidán seleničitan sodný do obsahu Se^{+4} 0,15 mg/ml.

Kontrolní skupina /12 selat/ dostala 200 mg Fe^{+3} ve formě ferri-dextranu bez Se^{+4} . V kontrolní skupině později uhynulo 1 sele. Všem selatům byly po uplynutí doby 8 dní odebrány vzorky krve.

Za použití elektronického počítače bylo zjištěno, že průměrný vzrůst počtu erythrocytů v hodnocené skupině byl $1,76 \pm 0,44 + 10^{12}/l$ a v kontrolní skupině $1,41 \pm 0,30 + 10^{12}/l$. Rozdíl byl statisticky významný při 95% spolehlivosti podle neparametrického hodnocení dle Wilcoxsona, Manna a Whitneye.

O selenu nebylo předtím uváděno, že zvyšuje tvorbu erythrocytů. To je důležitý poznatek, který bude hrát důležitou roli jak v lidské, tak ve veterinární medicíně. Použití selenu v kombinaci se železem, jak se zdá, značně vzroste.

Bylo rovněž nalezeno, že injekce železa a selenu /200 mg Fe^{+3} a 0,3 mg Se^{+4} na zvíře/ selatům stáří tří dnů může, jak bylo shledáno dříve, udržovat hladiny selenu a glutathion-peroxidázy v séru a normální růst nejméně po dobu tří týdnů, zatímco kontrolní zvířata /100 mg Fe^{+3} na zvíře/ trpěla ve stejné době nedostatkem selenu, jak je ukázáno zpožděním přírůstkem hmotnosti.

Selen se pravděpodobně ukládá jako komplex železo a selen, což vysvětluje neočekávanou dostatečnost jediné dávky podávané v časném stadiu až do hmotnosti asi 8 až 10 kg.

Výsledky ukazují, že nový přípravek obsahující železo a selen má zcela překvapivé depotní a dlouhodobé působení na organismus, jakož i překvapivě vysokou bioaktivitu.

Následující příklady se týkají nového typu přípravku.

P ř í k l a d 1

Složení:

Seleničitan sodný, odpovídající množství Se^{+4}	0,150 mg
Ferri-dextranový hydrolyzát, odpovídající množství Fe^{+3}	100,0 mg
Sterilizovaná voda	do 1,0 ml

Seleničitan sodný odpovídající 150 mg selenu byl rozpuštěn v 5 ml sterilizované vody a tento roztok byl přidán k roztoku ferri-dextranového hydrolyzátu. Roztok byl doplněn sterilizovanou vodou do 1 litru a filtrován membránovým filtrem nebo skleněným sintrem k odstranění částic.

Filtrát byl naplněn do skleněných ampulí nebo injekčních lahviček sterilizovaných horkým vzduchem. Připravené injekční roztoky byly sterilizovány v autoklávu.

P ř í k l a d 2

Složení:

Seleničitan sodný, odpovídající množství Se^{+4}	0,150 mg
ferri-polymaltóza, odpovídající množství Fe^{+3}	100,0 mg
Sterilizovaná voda	do 1,0 ml

Ferri-hydroxydipolymaltózový komplex odpovídající množství 100 mg železa byl rozpuštěn v 500 ml sterilizované vody a byl přidán seleničitan sodný. Roztok byl doplněn sterilizovanou vodou do 1 litru, naplněn do nádob a sterilizován.

P ř í k l a d 3

Složení:

Kysličník seleničitý, odpovídající množství Se^{+4}	0,1 mg
Ferri-dextranový hydrolyzát, odpovídající množství Fe^{+3}	100,0 mg
Sterilizovaná voda	do 10,0 ml

Injekční roztok byl připraven jako v příkladě 1.

P ř í k l a d 4

Složení:

Seleničitan sodný, odpovídající množství Se^{+4}	0,2 mg
Ferri-polymaltóza odpovídající množství Fe^{+3}	100,0 mg

Homogenní prášková směs byla připravena známým způsobem. Prášková směs může být granulována za použití rozpouštědel.

P ř í k l a d 5

Složení:

Seleničitan sodný, odpovídající množství Se^{+4}	0,06 mg
Ferri-dextranový hydrolyzát, odpovídající množství Fe^{+3}	100,0 mg
Přečištěná voda podle potřeby	
Polyethylenglykoly	

Sloučeniny selenu a železa byly rozpuštěny v malém množství vody. Polyethylenglykol byl přidán ve vodném roztoku za účinného míchání až do vzniku pasty.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby stabilního roztoku, obsahujícího železo a selen ve vzájemné kompatibilitě, určeného pro ošetřování nedostatkových stavů těchto stopových prvků, vyznačující se tím, že rozpustná sloučenina selenu se uvádí do reakce se železo-polysacharidovým komplexem ve hmotnostním poměru selenu k železu 10^{-5} až 10^{-1} ku 1.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako rozpustné sloučeniny selenu se používá oxidu seleničitého nebo seleničitanu sodného.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že jako železo-polysacharidového komplexu se používá ferri-dextranu nebo ferri-polymaltózy.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že sloučenina selenu a sloučenina železa se uvádějí do reakce v hmotnostním poměru selenu k železu v reakčních složkách 10^{-3} až 10^{-2} ku 1.