



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 611

Int.Cl.³

3(51) C 01 B 19/00

C 01 G 49/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(1) AP C 01 B/ 2496 498
(31) 821233

(22) 07.04.83
(32) 07.04.82

(44) 16.05.84
(33) FI

(1) siehe (73)
(2) PEKKANEN, TIMO J., PROF., FI;
(3) ORION-YHTYMOE OY, HELSINKI, FI

4) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER EISEN- UND SELENHALTIGEN SPURENELEMENTLOESUNG

(57) Ziel und Aufgabe der Erfindung bestehen darin, ein Verfahren zur Herstellung einer eisen- und selenhaltigen Spurenelement-Lösung zur Behandlung von Eisen- und Selenmangelzuständen zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß eine lösliche Selenverbindung mit einem Eisen-Polysaccharid-Komplex kombiniert wird, um ein Selen : Eisen-Verhältnis von 10^{-5} bis 10^{-1} Masseanteilen zu ergeben.

24 96 49 8

- 1 -

Berlin, den 12.8.1983

62 251/13

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung vermittelt ein neues Verfahren zur Herstellung von Eisen und Selen enthaltenden Spurenelementlösungen zur Behandlung von Tieren und Menschen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eisen und Selen sind essentielle Elemente, ihr Mangel resultiert in Anämie (Eisenmangel) sowie in der Beeinträchtigung der Fähigkeit, unterschiedlichen Arten von Belastungen Widerstand entgegenzusetzen zu können (Selenmangel). Junge, schnellwachsende Tiere wie etwa Rinder, Schafe und insbesondere Schweine können unter Eisen- und Selenmangelerscheinungen leiden. Ein Ferkel erhält über die Sauenmilch täglich lediglich 1 mg Eisen, es benötigt aber 7 bis 8 mg. In Gegenden mit speziell selenarmem Boden nehmen die Ferkel nicht ausreichend Selen auf und sind daher gegenüber verschiedenen degenerativen Erkrankungen anfällig.

Um dem Eisen- und Selenbedarf eines wachsenden Tieres von Geburt an zu entsprechen, werden Ferkel derzeit im Alter von 1 bis 3 Tagen mit Eisen und Selen gewöhnlich in Form einer intramuskulären oder subkutanen Injektion versorgt. Eisen wird gewöhnlich als Eisenextran, entsprechend einer Gabe von 100 bis 200 mg Eisen, verabreicht. Selen wird als Natriumselenit in einer Dosierung von näherungsweise 0,06 mg Se^{+4} /kg verabreicht. Da die Halbwertszeit von Selen

24 96 49 8 - 2 -

12.8.1983

62 251/13

im Organismus kurz ist und ein verabreichter Überschuß in keinerlei nennenswertem Maße gespeichert werden kann, so vermittelt eine einzelne Selen-Injektion lediglich einen Kurzzeitschutz.

Da eine große Anzahl von Ferkeln mit Eisen und Selen über Injektionen versorgt werden muß, würde ein erheblicher Arbeitsaufwand eingespart werden können, wenn es möglich wäre, die beiden Substanzen in einer einzigen Injektionslösung zusammenzufassen. Durch das Verabreichen von nur einer Injektion anstelle von zwei Injektionen würden zudem Läsionen infolge der Impfung wie auch das Risiko von Infektionen verringert.

Bislang sind Selen und Eisen nicht in einer Lösung kombiniert worden, da es bekannt ist, daß Selen unlösliche Verbindungen mit Eisen eingeht. Dies wird beispielsweise bei der Selenanalyse ausgenutzt. In der Tat sind öffentliche Warnungen vor dem Einleiten von Selen Salzen oder deren Lösungen in Trinkwasserversorgungsanlagen erlassen worden, da Selen in Anwesenheit von Eisenverbindungen ausgefällt wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die vorgenannten Nachteile zu vermeiden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung einer eisen- und selenhaltigen Sprenelement-

249649 8 - 3 -

12.8.1983

62 251/13

Lösung zur Behandlung von Eisen- und Selen-Mangelzuständen zur Verfügung zu stellen.

Es ist herausgefunden worden, daß bei Kombination einer löslichen Selenverbindung mit einem Eisen-Polysaccharid-Komplex von hoher relativer Molekülmasse in einer Injektionslösung allen Erwartungen zuwider keine Ausfällung von Selen auftritt.

Desgleichen wurde beobachtet, daß das Einspritzen des neuen Präparates in Tiere eine zusätzliche Selenquelle schafft, welche überraschenderweise im Organismus gespeichert werden kann. Der Speicherungsorganismus ist unklar, nichtsdestoweniger wird das überschüssige Selen vermutlich in Form von Eisen-Selen-Komplexen gespeichert.

Grundsätzlich kann jedwede physiologisch assimilierbare lösliche Selenverbindung in dem neuen Präparat Verwendung finden. Insbesondere geeignet sind Natriumselenit und Selen-dioxid.

Die besten Eisen-Polysaccharid-Komplexe sind Eisendextran und Eisenpolymaltose.

Die Eisen- und Selengehalte der Lösung können in einem beträchtlichen Bereich variiert werden, je nachdem, ob die Mangelzustände primär auf einen Mangel an Eisen oder einen Mangel an Selen zurückzuführen sind. Das Selen:Eisen-Verhältnis kann bei 10^{-5} bis 10^{-1} Masseanteilen liegen, besonders geeignet ist ein Verhältnis von 10^{-3} bis 10^{-2} .

249649 8 - 4 -

12.8.1983

62 251/13

Die Lösung wird einfach dadurch hergestellt, daß die Selenverbindung in einer wäßrigen Lösung von Eisen-Polysaccharid (oder dem entsprechenden Hydrolysat) aufgelöst und je nach Erfordernis mit Wasser versetzt wird. Anderenfalls können die pulverisierten Substanzen miteinander vermischt und später vor der Anwendung mit Wasser (oder irgendeinem anderen Lösungsmittel) versetzt werden, desgleichen kann auch eine Paste bereitet werden. Sofern gewünscht, können der Mischung auch andere Substanzen, wie etwa Vitamin E, zugesetzt werden.

Der neue Typ des Präparats, Natriumselenit und Eisendextran enthaltend, wurde drei Schweinen von 15 bis 25 kg Masse, die an Selenmangel litten, intramuskulär verabreicht. Weiteren drei an Selenmangel leidenden Schweinen wurde die gleiche Dosis Natriumselenit verabfolgt. Als ein Maß der Selen-Bioaktivität im Organismus wurden der Serum-Selengehalt und die Glutathionperoxidase-Enzymaktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß sowohl der Selengehalt als auch die Glutathionperoxidase (gSH-Px)-Aktivität bei den mit dem Präparat behandelten Schweinen signifikant höher waren als bei denjenigen Schweinen, welchen lediglich Selen verabreicht worden war (Tabelle 1). Sämtliche Schweine erhielten während der Prüfzeitspanne die gleiche Diät.

Tabelle 1

Nullprobe		am 8. Tag		am 15. Tag	
Nr.	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l
1	373	28	1065	63	632
2	298	19	796	47	437
3	325	23	926	47	484
$\bar{x}$	332	23	926	49	518
					35

249649 8 - 5 -

12.8.1983

62 251/13

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Nullprobe			am 8. Tag		am 15. Tag	
Nr.	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml
4	374	20	1288	65	804	46
5	279	18	1365	63	752	49
6	429	26	1643	90	706	51
$\bar{x}$	361	21	1432	73	754	49

Die Tiere 1, 2 und 3 erhielten 0,06 mg Se pro kg Körpermasse intramuskulär in Form von Natriumselenit.

Die Tiere 4, 5 und 6 erhielten 0,06 mg Se pro kg Körpermasse intramuskulär in Form von Natriumselenit, welches mit Eisendextran - 200 mg Fe pro Dosis - kombiniert worden war.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, bewirkt das Eisen-Selen-Präparat eine eindeutig erkennbare Steigerung der Selen-Bioaktivität. Nach 8 Tagen betrug die mittlere Bioaktivität bei den lediglich mit Selen versorgten Tieren 926 IE/l, wohingegen sie bei den mit dem Eisen-Selen-Präparat versorgten Tieren 1432 IE/l betrug. Nach 15 Tagen lagen die entsprechenden Werte bei 518 IE/l und 754 IE/l. Auch der Serum-Selenpegel verblieb auf einem beträchtlich erhöhten Niveau. Der Serum-Selenpegel der mit dem Präparat versorgten Tiere war noch nach 15 Tagen unverändert, wohingegen der der lediglich mit Selen versorgten Tiere nur über 8 Tage hinweg erhöht blieb.

6 neugeborenen Ferkeln mit einer Masse von je etwa 1 kg wurde eine intramuskuläre Dosis von 2 ml des neuen Eisen-Selen-Präparates verabreicht, wobei jeder Milliliter 100 mg Fe^{+3} in Form von Eisendextran sowie 0,15 mg Se^{+4} in Form von Natriumselenit enthielt. Entgegen allen Erwartungen zeigte sich, daß die Serumpegel in bezug auf Selen und Glutathionperoxidase noch vier Wochen später erhöht waren (Tabelle 2). Dieser Zustand bestand trotz der Tatsache, daß die Tiere mit der Milch einer Sau gefüttert wurden, welche während dieser Zeit auf einer selenarmen Diät gehalten worden war. Fünf ähnliche Ferkel, denen die gleiche Diät verabfolgt wurde, bildeten die Kontrollgruppe. Den Kontrolltieren wurden zum Zeitpunkt der Impfung der Prüfgruppe 200 mg Fe^{+3} als Eisendextran intramuskulär verabreicht. Vier Wochen später wurden in ihrem Serum mittlere Selenpegel von 55,4 ng/ml sowie eine mittlere Glutathionperoxidase-Aktivität von 710,8 IE/l gefunden.

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Prüfgruppe und der Kontrollgruppe waren statistisch signifikant, der Glutathionperoxidase-Unterschied für einen Vertrauensbereich von 99 %, der Se-Unterschied für einen Vertrauensbereich von 95 % (Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest). Die Selen- und Glutathionperoxidase-Aktivitäts-Pegel in den Seren der mit dem neuen Präparat behandelten Ferkel können nach vier Wochen nach der Behandlung als ausreichend hoch angesehen werden, währenddessen die entsprechenden Werte der Kontrolltiere einen Mangelzustand signalisieren. Es sei angemerkt, daß die im Versuch eingesetzte Selendosis von 0,3 mg/kg 5mal höher als die Normaldosis liegt und daß Selen für eine rasche Eliminierung aus dem Organismus bekannt ist.

24 96 49 8 - 7 -

12.8.1983

62 251/13

Tabelle 2

Nullwerte		+ 1 Woche		+ 2 Wochen		+ 4 Wochen		
Nr.	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml	gSH-Px IE/l	Se ng/ml
7	467	53,6	520	68,9	648	70,2	1074	97,1
8	n.b.	n.b.	480	88,5	868	67,4	1010	69,5
9	402	76,4	601	105,2	953	86,3	1006	70,1
10	357	44,5	503	77,5	555	57,8	822	54,5
11	n.b.	n.b.	486	63,4	799	73,6	906	69,5
12	414	44,8	562	89,0	649	76,9	973	60,4
$\bar{x}$	410	54,8	525,3	98,5	745,3	72,0	965,2	70,2

0,3 mg/Se/kg gemeinsam mit 200 mg Fe^{+3}

n.b. = nicht bestimmt

In einer weiteren Untersuchung wurden zwei Sauen während der letzten vier Trächtigkeitswochen sowie während der Laktation auf einer selenarmen Diät gehalten. Die 25 lebendgeborenen Ferkel wurden im Alter von drei Tagen in zwei Gruppen unterteilt (12 + 13), wobei beide Gruppen Ferkel jeweils von beiden Sauen enthielten. Von sämtlichen Ferkeln wurden Blutproben zur Bestimmung der Selenwerte sowie der Werte der Glutathionperoxidase-Aktivität wie auch zur Blutzellenzählung entnommen. Der Prüfgruppe (13 Ferkel) wurde eine subkutane Injektion von 200 mg (2 ml) Fe^{+3} in Form von Eisendextran verabreicht, wobei Natriumselenit zwecks Erzielung eines Se^{+4} -Gehaltes von 0,15 mg/ml zugesetzt worden waren. Die Kontrollgruppe (12) erhielt 200 mg Fe^{+3} als Eisendextran ohne Se^{+4} . Ein Ferkel der Kontrollgruppe starb später. Nach

249649 8 - 8 -

12.8.1983

62 251/13

8 Tagen wurden von sämtlichen Ferkeln Blutproben entnommen. Bei Anwendung eines elektronischen Zählgerätes zeigte sich, daß der mittlere Anstieg bei der Erythrozytenzählung in der Prüfgruppe $1,76 \pm 0,44 \cdot 10^{12}/l$ und in der Kontrollgruppe $1,41 \pm 0,30 \cdot 10^{12}/l$ betrug. Bei Anwendung des parameterfreien Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentestes erwies sich der Unterschied für den Vertrauensbereich von 95 % als statistisch gesichert. Bislang ist noch kein Nachweis dafür geliefert worden, daß Selen die Erythrozytensynthese steigert. Dies ist ein wichtiger Befund, der sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin eine wichtige Rolle spielen wird. Der Einsatz von Selen in Kombination mit Eisen wird sich wahrscheinlich beträchtlich erhöhen. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß die Impfung von 3 Tage alten Ferkeln mit Eisen plus Selen (200 mg Fe^{+3} und 0,3 mg Se^{+4} pro Tier) - wie bereits früher herausgefunden - die Serum-Selen- und Glutathionperoxidase-Pegel sowie ein normales Wachstum für mindestens 3 Wochen aufrechterhalten kann, wohingegen die Kontrolltiere (200 mg Fe^{+3} pro Tier) während dieser Zeit an schwerem Selenmangel litten, wie dies an einem Zurückgehen der Massezunahme zu erkennen war. Selen wird wahrscheinlich in Gestalt eines Eisen-Selen-Komplexes gespeichert; dies erklärt die unerwartete Ergiebigkeit einer in einem frühen Stadium bis zu einer Masse von etwa 8 bis 10 kg verabreichten Einzeldosis.

Die Ergebnisse zeigen, daß das neue Eisen-Selen-Präparat sowohl recht überraschende Depot- und Langzeitwirkungen auf den Organismus ausübt als auch eine überraschend hohe Bioaktivität besitzt.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Ausführungsbeispiele beziehen sich auf den neuen Präparattyp.

Beispiel 1

Zusammensetzung:

Natriumselenit entsprechend Se^{4+}	0,150 mg
Eisendextran-Hydrolysat entsprechend Fe^{3+}	100,0 mg
Aqua sterilisata	bis zu 1,0 ml

Eine 150 mg Selen entsprechende Menge Natriumselenit wurde in 5 ml sterilisiertem Wasser aufgelöst, worauf diese Lösung der Eisendextranhydrolysat-Lösung zugesetzt wurde. Die so erhaltene Lösung wurde mit sterilem Wasser auf 1 Liter begrenzt und zur Abscheidung der Teilchen durch eine Filtermembran oder einen Glasklinker durchgesetzt. Das Filtrat wurde in mit Heißluft sterilisierte Glasampullen oder Injektionsflaschen abgefüllt. Die fertigverpackten Injektionslösungen wurden im Autoklaven sterilisiert.

Beispiel 2

Zusammensetzung:

Natriumselenit entsprechend Se^{4+}	0,150 mg
Eisenpolymaltose entsprechend Fe^{3+}	100,0 mg
Aqua sterilisata	bis zu 1,0 ml

Eine 100 mg Eisen entsprechende Menge Eisenhydroxypolymaltose-Komplex wurde in 500 ml sterilem Wasser aufgelöst und mit Natriumselenit versetzt. Die Lösung wurde mit sterilem

Wasser auf 1 Liter begrenzt, gefiltert, abgefüllt und sterilisiert.

Beispiel 3

Zusammensetzung:

Selendioxid entsprechend Se^{4+}	0,1 mg
Eisendextran-Hydrolysat entsprechend Fe^{3+}	100,0 mg
Aqua sterilisata	bis zu 10,0 ml

Die Injektionslösung wurde wie in Beispiel 1 zubereitet.

Beispiel 4

Zusammensetzung:

Natriumselenit entsprechend Se^{4+}	0,2 mg
Eisenpolymaltose entsprechend Fe^{3+}	100,0 mg

Auf bekannte Weise wurde ein homogenes Pulvergemisch hergestellt. Das Pulvergemisch kann mit Lösungsmitteln granuliert werden.

Beispiel 5

Natriumselenit entsprechend Se^{4+}	0,06 mg
Eisendextran-Hydrolysat entsprechend Fe^{3+}	100,0 mg
Bedarfsweise gereinigtes Wasser	
Polyethylenglykole	

Selen- und Eisen-Verbindungen wurden in einem kleinen Teil Wasser aufgelöst. In die wäßrige Lösung wurde unter wirkungsvollem Vermischen Polyethylenglykol zugesetzt, bis sich eine Paste bildete.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung einer eisen- und selenhaltigen Spurenelement-Lösung zur Behandlung von Eisen- und Selen-Mangelzuständen, gekennzeichnet dadurch, daß eine lösliche Selenverbindung mit einem Eisen-Polysaccharid-Komplex kombiniert wird, um ein Selen : Eisen-Verhältnis von 10^{-5} bis 10^{-1} Masseanteilen zu ergeben.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß Selen-dioxid oder Natriumselenit als Selenquelle genutzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei der verwendeten Selenverbindung um Natriumselenit handelt.
4. Verfahren nach den oben genannten Punkten, gekennzeichnet dadurch, daß als Eisenpolysaccharid Eisendextran oder Eisenpolymaltose verwendet wird.
5. Verfahren nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem verwendeten Eisen-Polysaccharid um Eisendextran handelt.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß das Selen : Eisen-Verhältnis 10^{-3} bis 10^{-2} Masseanteile ausmacht.