

# Kapi za oči : kemijski sastav i povezanost s alergijskim reakcijama

---

**Buljan, Marijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:326568>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-13**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
I  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJANA BULJAN**

**KAPI ZA OČI: KEMIJSKI SASTAV I POVEZANOST  
S ALERGIJSKIM REAKCIJAMA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina: 2020./2021.**

**Mentorica: Prof. dr.sc. Davorka Sutlović**

**Split, rujan 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**

**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**

**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Farmaceutska toksikologija

**Tema rada** je odobrena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacija te odobrena na 8. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 5. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović

### KAPI ZA OČI: KEMIJSKI SASTAV I POVEZANOST S ALERGIJSKIM REAKCIJAMA

Marijana Buljan, broj indeksa: 211

#### Sažetak:

**Ciljevi istraživanja:** Kvalitativna analiza sastava kapi za oči, usporedba rezultata s deklaracijama na ambalaži te određivanje moguće povezanosti prisustva pronađenih sastojaka s alergijskim reakcijama.

**Materijali i metode:** Ispitano je 7 uzoraka kapi za oči, od toga 4 u receptnom, a 3 u bezreceptnom režimu izdavanja. Za pripremu uzoraka za analizu korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak volumena 100  $\mu$ L. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala: kloroforma, etil acetata i N-heksana u jednakom omjeru (v/v/v=1:1:1). Uzorci su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Uzorci u Petrijevim zdjelicama nekoliko su puta ispirani kloroformom kako bi se cijeli nanoseni sadržaj otopio. Nakon što su otopljeni uzorci filtrirani, preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu.

**Rezultati:** Od 7 analiziranih uzoraka u samo 2 uzorka (uzorci 1 i 3) detektirana je prisutnost tragova nekih tvari-organskih otapala. U četiri analizirana uzorka na deklaraciji je kao konzervans naveden benzalkonijev klorid, međutim, BAK nije detektiran korištenom metodom. Ostali konzervansi koji prema literaturi izazivaju alergijske reakcije: parabeni, tiomersal i klorheksidin nisu navedeni u sastavu analiziranih kapi za oči, niti su detektirani korištenom metodom. Neomicin, koji je naveden kao česti senzitizer, djelatna je tvar u uzorku 6, međutim, nije pronađen korištenom GC-MS metodom. Ostali ranije navedeni uzročnici alergijskih reakcija u kapima za oči nisu navedeni na deklaracijama analiziranih uzoraka, niti su detektirani instrumentalnom analizom.

**Zaključci:** Spojevi detektirani ovim istraživanjem mogu biti posljedica kontaminacije korištenih uzoraka prilikom izvođenja analize. Benzalkonijev klorid najčešći je alergen prisutan u kapima za oči, korištenom GC-MS metodom nije detektiran, međutim, to ne isključuje mogućnost da je bio prisutan već upućuje na to da korištena metoda vjerojatno nije dovoljno osjetljiva ili je njegova koncentracija bila niska. Najprikladnija metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje benzalkonijevog klorida u kapima za oči prema ranije navedenim istraživanjima bila bi HPLC. Ostali alergeni prisutni u kapima za oči nisu dovoljno istraženi, stoga je potrebno provođenje daljnjih istraživanja s prikladnim metodama.

**Ključne riječi:** kapi za oči, alergijske reakcije, GC-MS, benzalkonijev klorid

**Rad sadrži:** 51 stranicu, 8 slika, 9 tablica, 70 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med. – predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Zlatka Knezović
3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović - mentor

**Datum obrane:** 29. rujna 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku** pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine**

**Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy**

**University of Splitu, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Course title:** Pharmaceutical toxicology

**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 5

**Mentor:** Davorka Sutlović, PhD, full prof

### **EYE DROPS: CHEMICAL COMPOSITION AND ASSOCIATION WITH ALLERGIC REACTIONS**

Marijana Buljan, index number: 211

#### **Summary:**

**Objectives:** Qualitative analysis of the composition of eye drops, comparison of results with declarations on packaging and determination of possible connection between presence of found ingredients and allergic reactions.

**Material and methods:** In this study, 7 samples of eye drops were analyzed, of which 4 in prescripion and 3 in over-the-counter dispensing mode. In analysis preparation glass Petri dishes with a 100 µL sample were used. Samples were extracted with a mixture of organic solvents: chloroform, ethyl acetate and N-hexane (v / v / v = 1: 1: 1). The samples were then placed in a fume hood for drying in a stream of air. Samples in Petri dishes were washed several times with chloroform to dissolve the entire content. After dissolution samples were filtered and transferred to glass cuvettes for GC-MS analysis.

**Results:** Out of 7 analyzed samples, in only 2 samples (samples 1 and 3) were detected traces of some substances - organic solvents. Benzalkonium chloride was mentioned as a preservative on the declaration in four analyzed samples, however, BAK was not detected by the method used. Other preservatives that according to the literature cause allergic reactions: parabens, thiomersal and chlorhexidine are not listed in the composition of the analyzed eye drops, nor were they detected by the method used. Neomycin, which is listed as a common sensitizer, is the active substance in sample 6, but was not found by the GC-MS method used. Other previously mentioned causes of allergic reactions in eye drops are not listed on the declarations of the analyzed samples, nor were they detected by instrumental analysis.

**Conclusions:** Compounds detected by this study may be due to contamination of the samples during analysis. Benzalkonium chloride is the most common allergen present in eye drops, the GC-MS method used did not detect it, however, this does not rule out the possibility that it was present but suggests that the method used was probably not sensitive enough or its concentration was low. The most appropriate method for the qualitative and quantitative determination of benzalkonium chloride in eye drops according to eralier mentioned studies would be HPLC. Other allergens present in eye drops have not been sufficiently investigated, therefore further researches are needed with appropriate methods.

**Key words:** eye drops, allergic reactions, GC-MS, benzalkonium chloride

**Thesis contains:** 51 pages, 8 figures, 9 tables, 70 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Assoc. prof. Ivana Mudnić, MD. PhD – chair person
2. Assis. prof. Zlatka knezović, PhD
3. Full. prof. Davorka Sutlović, PhD - supervisor

**Defence date:** September 29th 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđer Bokškovića 35 and Library School of Medicine, Šoltanska 2

*Zahvala*

*Veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Davorki Sutlović, na strpljenju, pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom ovih godina.*

*Posebno hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i brizi tijekom cijelog studija.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Anatomija i fiziologija oka</b> .....	2
<b>1.2. Oftalmička primjena lijekova</b> .....	5
<b>1.3. Pripravci za oko</b> .....	6
1.3.1. Kapi za oko .....	7
1.3.2. Losioni za oko.....	7
1.3.3. Prašci za kapi za oko ili prašci za losione za oko .....	7
1.3.4. Polučvrsti pripravci za oko .....	7
1.3.5. Umeci za oko .....	8
<b>1.4. Sastav kapi za oči</b> .....	8
1.4.1. Djelatne tvari .....	8
1.4.1.1. Antimikrobne kapi za oči.....	8
1.4.1.2. Protuupalni lijekovi .....	9
1.4.1.3. Kombinacije protuupalnih i antimikrobnih lijekova.....	10
1.4.1.4. Lijekovi za liječenje glaukoma .....	10
1.4.1.5. Vazokonstriktori: simpatomimetici i antialergici .....	12
1.4.1.6. Umjetne suze .....	12
1.4.2. Pomoćne tvari .....	13
1.4.2.1. Voda ( <i>Aqua purificata</i> ).....	14
1.4.2.2. Sredstvo za puferiranje .....	14
1.4.2.3. Konzervansi .....	15
1.4.2.3.1. Benzalkonijev klorid.....	15
1.4.2.4. Sredstvo za izotonizaciju .....	16
1.4.2.5. Sredstva za povećanje viskoznosti.....	16
1.4.2.6. Bioadhezivna sredstva .....	16
1.4.2.7. Sredstvo za szspendiranje .....	17
1.4.2.8. Promotori apsorpcije.....	17
<b>1.5. Alergijske reakcije</b> .....	18
1.5.1. Alergijske reakcije povezane s kapima za oči .....	18
<b>1.6. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa</b> .....	20
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	22
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	24



<b>3.1. Kemikalije i uzorci za analizu.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Postupak pripreme uzoraka za analizu.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Instrumentalna analiza i radni uvjeti GC-MS metode .....</b>	<b>26</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>28</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>35</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>44</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>47</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>50</b>

## **1. UVOD**

## 1.1 Anatomija i fiziologija oka

Oko je primarni organ vida, najvažnijeg osjetila u ljudi. Oči i njihovi pomoćni organi smješteni su u očnim šupljinama sa svrhom reagiranja na vanjske podražaje i primanje informacija. Oko čine očna jabučica i vidni živac (1).

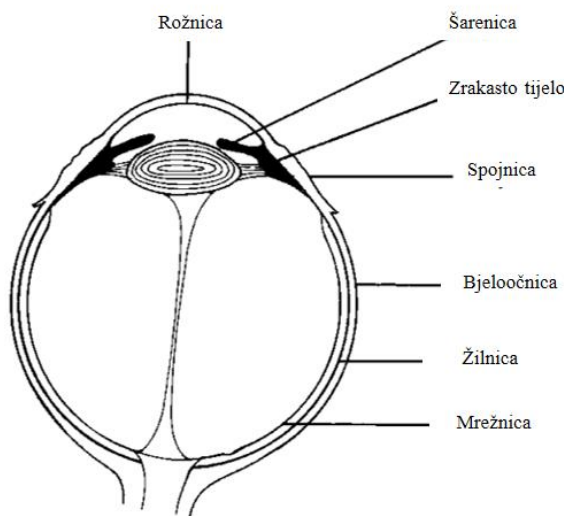
Očna jabučica sastoji se od vanjske ovojnice (rožnica, bjeloočnica), srednje očne ovojnice (šarenica, zrakasto tijelo, žilnica) i unutarnje očne ovojnice (mrežnica) (2). Bjeloočnica je neprozirni vanjski omotač oka, čvrst je i s prednje strane ima kontinuitet s rožnicom, a sa stražnje strane s ovojnicom ocnog živca. Neprozirna bjeloočnica se prema naprijed nastavlja na prozirnu rožnicu, ali na način da rub bjeloočnice prekriva rub rožnice pa tako izgleda da je rožnica umetnuta u bjeloočnicu kao staklo od sata (3). Uloga bjeloočnice je da štiti unutarnje strukture oka i amortizira promjene intraokularnog tlaka (1). Rožnica je dio prednje očne ovojnice, primarna funkcija rožnice je lom svjetlosti što zahtijeva prozirnost koja je postignuta anatomske i fiziološkim mehanizmima (2). Rožnica nema krvnih žila već se one nalaze na periferiji, nema ni limfne žile, limfa prolazi kroz limfne prostore među lamelama i na taj način se rožnica hrani, krvne žile smetale bi prolasku svjetlosnih zraka (3). Šarenica se nalazi između rožnice i leće, a djeluje poput dijafragme. Šarenica kontrolira količinu svjetla koja ulazi u oko preko otvora zjenice, veličina je određena ravnotežom između parasimpatičke konstrikcije i simpatičke dilatacije, a boja šarenice ovisi o količini melanina (1). Zjenice su jednako okrugle, a njihov promjer ovisi o brojnim čimbenicima: godinama, spolu, stanju budnosti i količini svjetla (3). Zrakasto tijelo sastoji se od cilijarnog mišića koji omogućava prilagodbu oka na daljinu (2). Cilijarni nastavci luče tekućinu koja održava očni tlak (3). Žilnica je postavljena između vanjske očne ovojnice i rožnice, kuglasta je oblika i ima unutrašnju i vanjsku stranu, vanjska strana ima udubljenja od žila i živaca, a unutarnja strana je glatka i služi kao podloga za vidni dio mrežnice (3). Žilnica hrani vanjske slojeve mrežnice (1). Mrežnica je višeslojna, tanka, prozirna ovojnica koja pokriva stražnji očni dio (1). Dio je oka koji je osjetljiv na svjetlo, sadrži čunjiće, koji zapažaju boje, i štapiće, koji registriraju svjetlost i zadušeni su za gledanje u mraku (4). Mrežnici je putem čunjića i štapića omogućeno primanje određenih podražaja, točnije putem zdrave mrežnice i optičkih putova razlikujemo osjete za svjetlo, pokret, oblik i boju (3).

Očni živac je "protruzija" mozga, stoga ga okružuju tri moždane ovojnice: vanjska dura, arahnoida i unutrašnja pia mater. Intraduralni dio živca počinje papilom i prolazi tri moždane

ovojnice očne jabučice. *Papilla nervi optici* je mjesto na kojem živčana vlakna napuštaju mrežnicu (3).

Leća je optičko bikonveksno tijelo koje omogućava fokusiranje zraka svjetlosti na mrežnici i stvaranje slike. Nalazi se između očne vodice i staklasta tijela (3). Sastoji se od 65% vode i 35% proteina, ima najviše proteina od svih tkiva u tijelu (1). Transparentnost je osnovna odlika leće, a proizlazi iz nedostatka staničnih elemenata, odnosno leća je acelularna (3).

Oko je ispunjeno intraokularnom tekućinom koja održava oblik očne jabučice. Dvije intraokularne tekućine su: očna vodica (vodenasta, optički čista otopina vode i elektrolita) i staklovina (prozirni gel ispunjen vlaknima kolagena i hijaluronskom kiselinom) (2). Očna vodica se stalno stvara i reapsorbira. Gotovo svu količinu očne vodice izlučuju cilijarni nastavci. Razinu očnog tlaka određuje otpor na koji nailazi očna vodica prilikom istjecanja (4).



**Slika 1.** Očna jabučica, prilagođeno prema referenci (2)

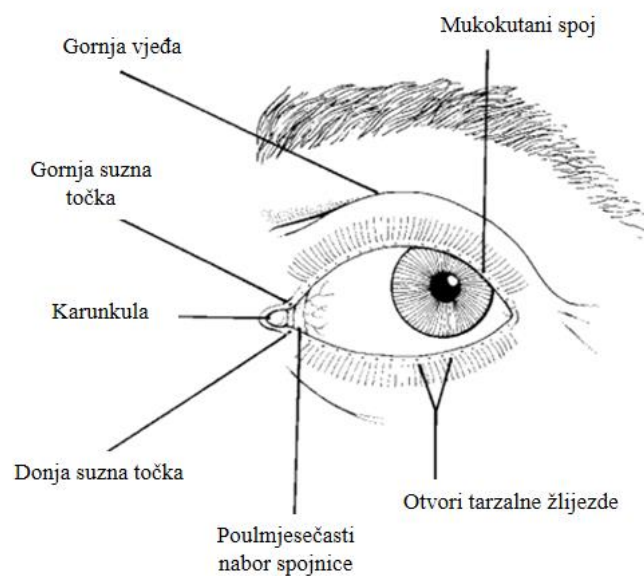
Pomoćni organi obuhvaćaju mišiće i fascijalne tvorbe u očnoj šupljini te spojnicu, suzni uređaj, obrve i vjeđe, kao i kosti koje tvore očnu šupljinu (orbita) (1).

Spojnica (konjunktiva) je prozirna, tanka i mukozna membrana koja pokriva stražnju površinu vjeđa i prednju površinu bjeloočnice. Opskrbljuje rožnicu kisikom kad su vjeđe zatvorene

i održava antimikrobno djelovanje suznih enzima. Konjuktiva je često zahvaćena patološkim procesima pri čemu mijenja izgled i oblik (1).

Suzni uređaj građen je od suzne žlijezde, suznih kanalića, suznih točaka, akcesornih suznih žlijezda, suzne vrećice i suznog kanala koji ulazi u donji nosni hodnik. Suze se usmjeravaju u suzne točke, ulaze u suznu vreću i tjeraju kroz suzni kanal u nos treptanjem i gravitacijom (1). Uloga suza je da vlaže i ispiru oko, a isparavanjem hlade očnu površinu i onemogućuju razmnožavanje mikroorganizama (1).

Obrve su zadebljali nabori kože prekrivene dlakama, skreću znoj sa čela i štite oči od jakog svjetla (1). Vjeđe su nabori kože koji štite prednji dio oka. Treptanjem se razmazuje suzni film koji štiti rožnicu i konjuktivu od dehidracije. Vjeđu čini kožni sloj, *musculus orbicularis oculi* koji omogućuje zatvaranje vjeđe te *tarsus* koji je potporna struktura vjeđa, građen od fibroznog tkiva. Gornja vjeđa prekriva rožnicu, a donja dolazi do ruba rožnice. Prednji rub vjeđa prekrivaju trepavice (1).



**Slika 2.** Oko i pomoćni organi oka, prilagođeno prema referenci (2)

## 1.2. Oftalmička primjena lijekova

Specifična anatomija ljudskog oka otežava lokalnu primjenu lijekova. Lijekovi primijenjeni za liječenje površinskih infekcija ili za liječenje poremećaja struktura ispod rožnice su u velikoj mjeri izgubljeni zbog suzenja, drenaže i izlivanja iz oka, procjena je da se 90-95 % lijeka izgubi prije dolaska na mjesto djelovanja (5). Rožnica i strukture povezane s njom sadrže mehanizme koji uklanjaju čestice s površine oka, ali i primijenjene lokalne pripravke, ti mehanizmi uključuju dinamiku suzne tekućine, vezanje lijeka na proteine suzne tekućine i njegovu razgradnju (6). Nakon topikalne primjene oftalmički pripravci miješaju se sa suznom tekućinom što razrjeđuje pripravak, a maksimalni volumen pripravka koji oko može podnijeti je 30  $\mu$ l, suzna tekućina zatim odlazi s površine oka nazolakrimalnim kanalom u nosnu šupljinu, a s njom i strana tijela ili naneseni pripravci, u slučaju prevelikog volumena pripravka aktivira se refleks treptanja koji dovodi do nazolakrimalne drenaže, svi navedeni mehanizmi uklanjaju lijek s površine oka (6). U oku također postoji detoksikacijski mehanizam kojim se transformiraju lijekovi i neke tvari, primjerice pilokarpin se hidrolizira u šarenici, rožnici i zrakastom tijelu. Enzimi faze I biotransformacije lijekova u oku su: esteraze, monoaminooksidaze, peptidaze, oksidoreduktaze i kateholortometiltransferaze, a enzimi faze II su: sulfattransferaze, glutation transferaze i glukuronidaze (3). Nakon topikalne primjene na očnu površinu većina se pripravaka apsorbira putem rožnice, apsorpcijska površina je relativno mala i iznosi 1.04 cm<sup>2</sup>. Apsorpcija je ograničena trima barijerama: vanjskim lipofilnim epitelom, središnjom hidrofilnom stromom i unutrašnjim lipofilnim endotelom. Upravo epitel rožnice predstavlja ograničavajući čimbenik za najčešće primijenjene oftalmike (7). Tvari kroz rožnični epitel prolaze aktivnim i pasivnim transportom, pasivni transport uključuje difuziju niz koncentracijski gradijent (transcelularno ili paracelularno bez proteina) i olakšanu difuziju (posredovanu proteinima nosača). Lijekovi kroz epitel rožnice najčešće prolaze pasivnim putem. Hidrofilni i makromolekularni lijekovi se prenose paracelularnim putem, a hidrofobni lijekovi transcelularnim putem ili olakšanom difuzijom. Za učinkovitu apsorpciju preko rožnice djelatna tvar bi trebala imati i lipofilna i hidrofilna obilježja i imati dovoljno male čestice (7).

Drugi put apsorpcije oftalmoloških lijekova je preko spojnice i bjeloočnice. Glavni mehanizam apsorpcije preko bjeloočnice je pasivna difuzija, a najbolje je propusna za makromolekulske lijekove (7). Spojnica i bjeloočnica su propusnije za molekule lijeka posebice

za hidrofилne i makromolekulske lijekove, međutim zbog njihove velike prokrvљenosti postoji mogućnost da lijek ne djeluje na ciljanom mjestu (5).

Primjena lijeka sistemskim putem je u oftalmologiji najčešće isključena zbog nedostupnosti očnih struktura putem sistemske cirkulacije. Naime, postoje dva osnovna optoka krvi u oku: krvotok srednje očne ovojnice i mrežnični krvotok, žile u oba krvotoka građene su od tijesno priljubljenih stanica što onemogućava prijenos tvari iz krvotoka u oko (5). Najčešće primijenjivani oralni lijekovi u oftalmologiji su: inhibitori karboanhidraze za liječenje povišenog očnog tlaka, kortikosteroidi za liječenje optičkog neuritisa, analgetici za liječenje boli zbog očne traume, antihistaminici za alergijski angioneuritički edem vjeđa (8).

Stražnji dio oka je izoliran od apsorbiranih tvari iz prednjeg dijela oka te iz tvari u sistemskoj cirkulaciji, zbog čega je primjena lijeka u ovaj dio oka moguća jedino putem intraokularnih injekcija (5). Primjer intraokularne primjene je intravitrealna injekcija antibiotika za liječenje endoftalmitisa, injekcija ganciklovira kod citomegalovirusa retinitisa u bolesnika sa stečenim sindromom imunodeficijencije, inhibitori vaskularno-endotelnoг čimbenika rasta kod makularne degeneracije, ovakav način primjene se koristi u slučajevima izostanka učinka prethodnih postupaka liječenja (8).

### **1.3. Pripravci za oko**

Pripravci za oko su sterilni, polučvrsti, tekući ili čvrsti pripravci namijenjeni za primjenu na očnim jabučicama ili konjunktivi (9). Većina pripravaka su otopine i suspenzije koje se daju izravno iz bočice koja služi i kao kapaljka (8). Prema Europskoj farmakopeji razlikuje se nekoliko skupina pripravaka za oko: kapi za oko, losioni za oko, prašci za oko, polučvrsti pripravci za oko i umeci za oko (8). Kapi za oči predstavljaju 90% svih oftalmoloških doziranih oblika, međutim danas postoji značajan napor usmjeren prema novim sustavima primjene lijekova u obliku hidrogelova, mikro i nano čestica, liposoma i kolagenskog omotača, cilj novih oblika je postići optimalnu apsorpciju bez magljenja vida i uz dnevno minimalan broj nanošenja (10). Svi očni pripravci moraju udovolјiti ispitivanјima za sterilnost, pomagala za nanošenje pripravka također moraju biti sterilna (9).

### 1.3.1. Kapi za oko

Kapi za oko su sterilne vodene ili uljne otopine, emulzije ili suspenzije jedne ili više djelatnih tvari namijenjene za primjenu u oko. Sadržavaju i pomoćne tvari koje, primjerice, služe za prilagodbu viskoznosti ili toničnosti pripravka, za održavanje pH vrijednosti ili za povećanje stabilnosti pripravka, navedene pomoćne tvari ne utječu na učinak pripravka. Kapi pakirane u višedozirne spremnike sadrže i konzervanse koji moraju biti kompatibilni s ostalim sastojcima u pripravku i djelotvorni tijekom perioda primjene kapi. Ukoliko ne sadrže konzervans pakirane su u jednodozirne spremnike (9). Kapi za oko ukapavaju se u konjunktivalnu vrećicu oka. Kao vehikulum se najčešće upotrebljavaju voda ili fiziološka otopina, a rjeđe neutralno ulje. Vodene otopine djeluju brzo, ali se i brzo eliminiraju zbog čega se moraju primijenjivati često. Otopina mora biti izotonična u odnosu na suze što odgovara 1,32% do 1,42% otopine natrijeva klorida i sličnog pH što najčešće iznosi oko 7,4 ili alkalnije do pH 8,0 (3).

### 1.3.2. Losioni za oko

Losioni su sterilne vodene otopine namijenjene za pranje ili ispiranje oka ili za obloge za oko. Mogu sadržavati pomoćne tvari za prilagodbu toničnosti i viskoznosti pripravka i za održavanje pH vrijednosti (9).

### 1.3.3. Prašci za kapi za oko ili prašci za losione za oko

Prašci za pripravu kapi ili losiona dolaze u suhom, sterilnom obliku namijenjenom za otapanje u prikladnoj tekućini. Sadrže pomoćne tvari koje olakšavaju otapanje ili raspršivanje, sprečavaju zgrušavanje ili tvari za koje povećavaju stabilnost i održavaju pH vrijednost. Nakon otapanja u propisanoj tekućini udovoljavaju zahtjevima za kapi i losione za oko (9).

### 1.3.4. Polučvrsti pripravci za oko

Polučvrsti pripravci za oko su sterilne masti, gelovi ili kreme namijenjeni za nanošenje na spojnicu. Sadrže jednu ili više djelatnih tvari koje su otopljene u prikladnoj podlozi, homogene su i ne iritiraju očnu konjuktivu. Pakiraju se u male, sterilne tube ili u prikladne jednodozirne spremnike (9).



### 1.3.5. Umeci za oko

Umeci za oko su sterilni čvrsti ili polučvrsti pripravci namijenjeni za umetanje u konjunktivalnu vrećicu. Sastoje se od spremnika djelatne tvari koji se nalazi u matriksu ili vezan na membranu kojom se postiže postupno oslobađanje djelatne tvari. Pakiraju se u zasebne sterilne spremnike (9).

## 1.4. Sastav kapi za oči

### 1.4.1. Djelatne tvari

#### 1.4.1.1. Antimikrobne kapi za oči

Antimikrobna sredstva su tvari koje se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih mikroorganizama (3). Antibiotik je, u užem smislu, kemijska tvar proizvedena iz mikroorganizama koja inhibira rast ili uništava bakterije i druge mikroorganizame (11). U antimikrobne lijekove u oftalmologiji spadaju antibiotici, sulfonamidi, antiviroci, antifungici i antiparazitici. Česte očne infekcije su konjuktivitis, blefaritis, dakriocistitis, dakrioadenitis, orbitalni celulitis i endoftalmitis (8).

**Tablica 1.** Sastav antimikrobnih kapi za oči registriranih u Republici Hrvatskoj (12)

	SASTAV	INDIKACIJA
<i>ANTIBIOTICI</i>	azitromicin	Lokalno antibakterijsko kurativno liječenje konjuktivitisa uzrokovanog osjetljivim sojevima
	tobramicin	Lokalno liječenje vanjskih infekcija oka i njegovih pomoćnih organa uzrokovanih osjetljivim sojevima
<i>FLUOROKINOLONI</i>	ofloksacin	Topikalno liječenje bakterijskih upala prednjeg odčnog segmenta uzrokovanih patogenima osjetljivim na ofloksacin
	moksifloksacin	Topikalno liječenje purulentnog bakterijskog konjuktivitisa uzrokovanog sojevima osjetljivim na moksifloksacin

#### 1.4.1.2. Protuupalni lijekovi

Kortikosteroidi su najčešće korišteni protuupalni lijekovi u liječenju uveitisa i skleritisa, a primjenjuju se lokalno, subkonjuktivalno, a rjeđe sistemski (8). Uveitis je zajednički termin za upalu srednje očne ovojnice, smještene između bjeloočnice, spojnice i prednje očne sobice izvana te mrežnice s unutranje strane (13). Skleritis je upala bjeloočnice, ima karakterističnu kliničku sliku, obuhvaća pretežno bjeloočnicu, ali može uključiti i rožnicu i srednju očnu ovojnicu (14). Nesteroidni protuupalni lijekovi primijenjeni lokalno inhibiraju sintezu prostanglandina koji su medijatori upale (8). Farmakološka svojstva NSAID-a razlikuju se od steroidnih protuupalnih lijekova temeljem farmakodinamičkog učinka. Kortikosteroidi inhibiraju sintezu arahidonske kiseline putem inhibicije fofolipaze, a NSAID djeluju isključivo putem inhibicije enzima ciklooksigenaze, te su sigurnija alternativa u liječenju upalnih stanja oka (15).

**Tablica 2.** Sastav protuupalnih lijekova i njihovih kombinacija u kapima za oči registriranih u RH (12)

	SASTAV	INDIKACIJA
<i>KORTIKOSTEROIDI, ČISTI</i>	deksametazon	Liječenje neinfektivnih upalnih i alergijskih stanja konjunktive, rožnice i prednjeg segmenta oka, koja reagiraju na steroide
<i>NESTEROIDNI PROTUUPALNI SPOJEVI</i>	diklofenak	Inhibicija perioperativne mioze tijekom kirurškog liječenja katarakte, liječenje upale i tegoba nakon kirurškog liječenja strabizma, liječenje bolova nakon radijalne keratotomije, liječenje upale nakon kirurškog liječenja katarakte
	nepafenak	Prevenција i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte, smanjenje rizika edema povezanog s operacijom katarakte kod dijabetičara
	bromfenak	Liječenje postoperativne upale oka nakon ekstrakcije katarakte

#### 1.4.1.3. Kombinacije protuupalnih i antimikrobnih lijekova

Često se propisuju i kombinacije protuupalnih i antimikrobnih lijekova, međutim takva uporaba zahtjeva nadzor specijalista (8).

**Tablica 3.** Sastav kombinacija protuupalnih i antimikrobnih lijekova u kapima za oči registriranih u RH (12)

	<i>SASTAV</i>	<i>INDIKACIJA</i>
<i>KOMBINACIJE KORTIKOSTEROIDA I ANTIINFEKTIVA</i>	deksametazon, neomicin i polimiksin B	Upalna stanja oka koja reagiraju na steroide i kod kojih je indicirano liječenje kortikosteroidima, a istodobno je prisutna bakterijska infekcija ili postoji opasnost njezina nastanka
	tobramicin i deksametazon	Upalna stanja oka koja odgovaraju na liječenje kortikosteroidima, te gdje postoji površinska infekcija oka ili rizik infekcije mikroorganizmima koji su osjetljivi na tobramicin, a rezistentni su na ostale antibiotike
	deksametazon i levofloksacin	Sprečavanje i liječenje upala te sprječavanje infekcije povezane s operacijom sive mrežnice u odraslih

#### 1.4.1.4. Lijekovi za liječenje glaukoma

Glaukom je drugi vodeći uzrok sljepoće u svijetu (16). Glaukom obuhvaća skupinu poremećaja koje karakterizira oštećenje optičkog živca i gubitak mrežničnih ganglijskih stanica (17). Najčešći uzrok glaukoma je povišen očni tlak, a povišenje intraokularnog tlaka je uzrokovano otežanim istjecanjem sobne vodice iz oka (8). Najčešći oblici glaukoma su primarni očni glaukom otvorenog kuta i primarni kronični glaukom zatvorenog kuta, a njihovo razlikovanje utječe na odabir terapije i prognozu bolesti (3). Osnovni princip liječenja je smanjenje očnog tlaka što se postiže povećanjem istjecanja sobne vodice iz oka ili smanjenjem stvaranja sobne vodice u oku (3).

**Tablica 4.** Sastav lijekova za liječenje glaukoma registriranih u RH (12)

	<b>SASTAV</b>	<b>INDIKACIJA</b>
<i>SIMPATOMIMETICI ZA LIJEČENJE GLAUKOMA</i>	brimonidin	Snižavanje očnog tlaka u bolesnika s glaukomom otvorenog kuta ili okularnom hipertenzijom, kao monoterapija kod bolesnika kod kojih je kontraindicirana primjena beta blokatora, kao dodatna terapija kada se s jednim lijekom ne postiže zadovoljavajući intraokularni tlak
	dorzolamid	Kod glaukoma kao dodatna terapija beta blokatorima, kao monoterapija kada su beta blokatori kontraindicirani, kod liječenje povišenog očnog tlaka u bolesnika s očnom hipertenzijom
<i>INHIBITORI KARBOANHIDRAZE</i>	brinzolamid	Smanjene očnog tlaka kod očne hipertenzije i glaukoma otvorenog kuta, kao monoterapija kada su beta blokatori kontraindicirani ili kao dodatna terapija uz druge lijekove
	timolol	Liječenje očne hipertenzije kroničnog glaukoma otvorenog kuta, kao monoterapija kada su beta blokatori kontraindicirani ili kao dodatna terapija uz druge lijekove
<i>BLOKATORI ADRENERGIČKOG SUSTAVA</i>	betaksolol	Snižavanje intraokularnog tlaka kod bolesnika s očnom hipertenzijom ili glaukomom otvorenog kuta, kao monoterapija ili dodatna terapija
	latanoprost	Snižavanje očnog tlaka kod glaukoma otvorenog kuta i očne hipertenzije, smanjenje povišenog očnog tlaka u pedijatriji
<i>ANALOZI PROSTAGLANDINA</i>	bimatoprost	Snižavanje povišenog očnog tlaka kod odraslih s kroničnim glaukomom otvorenog kuta i očnom hipertenzijom
	travoprost	Snižavanje povišenog očnog tlaka kod odraslih s povišenim očnim tlakom ili glaukomom otvorenog kuta, snižavanje očnog tlaka u pedijatriji
	tafluprost	Snižavanje povišenog očnog tlaka kod glaukoma otvorenog kuta i očne hipertenzije, kao monoterapija kod bolesnika kojima će koristiti kapi bez konzervansa, koji nisu postigli zadovoljavajući odgovor na prvu liniju terapije te kao dodatna terapija uz beta blokator

#### 1.4.1.5. Vazokonstriktori: simpatomimetici i antialergici

Vazokonstriktorski učinak simpatomimetika i derivata imidazola koristi se u pripravcima za očnu dekongestiju (8). Vazokonstriktori smanjuju edem i na taj način ublažavaju simptome očne alergije. Simpatomimetici djeluju tako da stimuliraju alfa-adrenoreceptore koji se nalaze na prekapilarnim i postkapilarnim krvnim žilama, što rezultira stezanjem krvnih žila spojnice, smanjenim protokom krvi i skupljanjem tkiva (18). Antialergici koji se koriste topikalno su: antihistaminici, stabilizatori mastocita, kortikosteroidi, nesteroidni protuupalni lijekovi (19).

**Tablica 5.** Sastav dekonjestivnih i antialergijskih kapi za oči registriranih u RH (12)

	SASTAV	INDIKACIJA
<i>SIMPATOMIMETICI- DEKONGESTIVI</i>	nafazolin	Dekongestiv za ublažavanje crvenila i svrbeža oka uzrokovanih iritansima. Nije namijenjen za ublažavanje simptoma infekcije
	tetizolin	Dekongestija sluznice oka zbog neinfektivnog nadražaja oka
<i>OSTALI ANTIALERGICI</i>	azelastin	Liječenje i prevencija simptoma sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog konjuktivitisa
	olopatadin	Liječenje okularnih znakova i simptoma sezonskog alergijskog konjuktivitisa
	kromoglicinska kiselina	Ublažavanje i liječenje sezonskog ili cjelogodišnjeg alergijskog konjuktivitisa
	emedastin	Simptomatsko liječenje sezonskog alergijskog konjuktivitisa

#### 1.4.1.6. Umjetne suze

Umjetne suze su proizvodi korišteni za ublažavanje simptoma suhog oka. Suho oko je poremećaj suznog filma koji nastaje zbog nedostatka suza ili prekomjernog isparavanja suza, što posljedično dovodi do oštećenja očne površine i nelagode (20). Umjetne suze su prva linija liječenja sindroma suhog oka s godišnjom globalnom prodajom od 540 milijuna dolara, ponajprije zbog svoje niske invazivnosti i malog rizika od nuspojava (21). Sastavnice umjetnih suza se brzo razgrade nakon primjene, stoga ne zamjenjuju u potpunosti prirodne suze koje se luče neprestano, pa se umjetne suze doziraju učestalo. Umjetne suze moraju zadovoljiti metaboličke, optičke i

fizičke karakteristike prirodnih suza. Najvažnija karakteristika umjetnih suza je da sadrže tvari koje služe za liječenje primarnog i sekundarnog oštećenja oka. Prema kemijskom sastavu komponente umjetnih suza su: voda, vodene otopine elektrolita, glicerol, monosaharidi, disaharidi, polisaharidi, sintetski polimeri, zgušnjivači, biološki fluidi i lipidi. Prema biofizikalnim i biokemijskim osobinama komponente se dijele na: osmotske, površinski aktivne i lubrikantne (22). Umjetne suze najčešće sadržavaju vodotopljive polimere koji produžuju vrijeme zadržavanja na oku, održavaju vlažnost oka, vežu se na mucin oka i pospješuju cijeljenje rožnice (23). Kaboksimetilceluloza je često korišten aktivni sastojak umjetnih suza (24). Hijaluronska kiselina koristi se zbog poticanja cijeljenja, hidratacije i dobre viskoznosti (25). Navedeni polimeri, dostupni u različitim molekulskim masama, koriste se u kombinaciji s pomoćnim tvarima u vodenim otopinama (26). Umjetne suze su registrirane kao medicinski proizvod te su upisane u očevidnik medicinskih proizvoda (27). Medicinski proizvod je prema definiciji instrument, naprava, uređaj, programska podrška, materijal ili drugi predmet za humanu uporabu koji se upotrebljava samostalno ili zajedno s nekim drugim predmetom uključujući i programsku podršku za dijagnostičke ili terapijske svrhe, a koja je nužna za njegovu pravilnu primjenu. Medicinski proizvod svoje glavno namjeravano djelovanje u/ili na ljudskom tijelu ne postiže farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim učincima, iako njegovo djelovanje može biti potpomognuto takvim učincima. (28)

#### 1.4.2. Pomoćne tvari

Oftalmički ljekoviti oblici su godinama jedno od najistraživanijih područja farmaceutske tehnologije, prvenstveno zbog niske bioraspoloživosti lijekova nakon topikalne očne primjene. Zbog toga se razvijaju oftalmološki oblici koji će omogućiti postizanje odgovarajuće koncentracije djelatne tvari na mjestu primjene što će posljedično smanjuje učestalost primjene ovih farmaceutskih oblika, a to se postiže dodatkom pomoćnih tvari (29). Najčešće pomoćne tvari u kapima za oči su: nosači djelatne tvari, voda, sredstva za puferiranje, konzervansi, sredstva za izotonizaciju, soli, sredstva za povećanje viskoznosti, bioadhezivna sredstva, emulgatori, sredstva za suspendiranje, sredstva za solubilizaciju, promotori aposorpcije (30).

#### 1.4.2.1. Voda (*Aqua purificata*)

Pročišćena voda je voda koja je namijenjena za pripravu svih lijekova koji moraju biti i sterilni i apirogeni, ako nije drugačije odobreno i opravdano. Pročišćena voda na veliko pripravlja se destilacijom, reverznom osmozom, ionskom izmjenom ili nekom drugom prikladnom metodom, od vode koja udovoljava propisima za pitku vodu. Pročišćena voda na veliko čuva se i distribuira u uvjetima koji sprječavaju rast mikroorganizama i onemogućuju bilo kakvo drugo onečišćenje. Pročišćena voda na spremnicima je pročišćena voda na veliko koja je napunjena i čuvana u uvjetima koji osiguravaju propisanu mikrobiološku čistoću. Ne sadrži ni jednu dodanu tvar (9).

#### 1.4.2.2. Sredstvo za puferiranje

Izbor pH očnog pripravka ključan je za topljivost, stabilnost i permeabilnost lijekova. Većina oftalmičkih otopina ima pH između 4,0 i 8,0. Ako je pH dozirnog oblika izvan fiziološkog raspona, iritacija oka ili očna nelagoda mogu postati problem. Iritacija oka obično je popraćena povećanim lučenjem tekućine kako bi se pomoglo u obnavljanju normalnog fiziološkog stanja. Prekomjerno suženje također rezultira brzim ispiranjem lijeka do nazolakrimalnog kanala što smanjuje kontakt lijeka s očnom sluznicom. Pravilan odabir pufera i puferskog kapaciteta ključni su za bioraspoloživost i podnošljivost lijeka (31). Najčešće korišteni puferi u oftalmologiji su: citratni, fosfatni i Tris-HCl pufer (32).

**Tablica 6.** Puferi sustavi korišteni u oftalmologiji i njihov sastav (32)

<b>PUFERSKI SUSTAV</b>	<b>SASTAV</b>	<b>pH RASPON</b>
Citratni pufer	Citratna kiselina Natrijev citrat	3,0-6,2
Fosfatni pufer	Natrijev fosfat Natrijev hidrogen fosfat	5,8-8,0
Tris- HCl pufer	Tris (hidroksimetil) aminometan Klorovodična kiselina	7,2-9,0

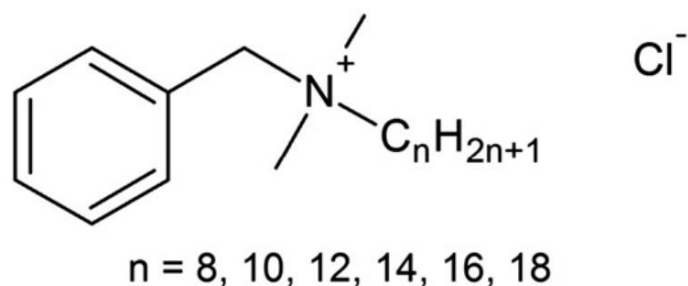
### 1.4.2.3. Konzervansi

Europska farmakopeja navodi da oftalmički vodeni pripravci pakirani u višedozne spremnike moraju sadržavati konzervans u odgovarajućoj koncentraciji, osim ako pripravak ima antimikrobna svojstva, izabrani konzervans mora biti kompatibilan s ostalim sastojcima u pripravku i učinkovit tijekom vremena primjene pripravka (9). Konzervansi djeluju na mikroorganizme na način da uzrokuju lizu plazma membrane, inhibiraju stanični metabolizam, koaguliraju stanične komponente ili dovode do hidrolize (33). Povijesno se konzervansi dijele na dvije skupine: detergente i oksidirajuća sredstva (34). Oksidativna sredstva su male molekule koje prodiru kroz staničnu membranu i modificiraju lipide, proteine i DNA uzrokujući poremećaj stanice, predstavnici su stabilizirani oksikloro kompleks (SOC) i natrijev perborat (35). Detergenti su uobičajeno monomeri ili polimeri koji imaju učinak površinski aktivnih tvari koje mijenjaju propusnost membrane djelujući na lipide i izazivajući lizu komponenti citoplazme, najznačajniji predstavnik je benzalkonijev klorid (BAK) (36). Najčešće korišteni konzervansi u oftalmologiji su: benzalkonijev klorid, cetrimonijev bromid, tiomersal, metilparahidroksibenzoat, polikvarterni amonijev klorid (PQAC), vodikov peroksid i poliaminopropil bigvanid (37).

#### 1.4.2.3.1. Benzalkonijev klorid

Benzalkonijev klorid je najčešće korišteni konzervans u oftalmologiji, pripada skupini kvarternih amonijevih soli, smjesa je alkildimetilbenzilamonijevih klorida opće kemijske formule  $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$ , gdje R predstavlja alkilne radikale od C8 do C18, najčešće se koristi u koncentracijama od 0.004 do 0.025%. Spektar djelovanja je usmjeren na Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus*), a djelovanje na Gram-negativne bakterije (*Pseudomonas aeruginosa*) se povećava dodatkom 0.1% etilendiamintetraoctene kiseline, djeluje i kao fungicid, posebice protiv vrsta *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*. Dodatni razlog njegove česte uporabe je pojačana apsorpcija lijeka u prednju očnu sobicu narušavanjem hidrofobne barijere rožničnog epitela čime se postiže veća djelotvornost lijeka (38). Iako izvrsnih antimikrobnih svojstava postoji sve više dokaza o kontaktnim alergijskim reakcijama na benzalkonijev klorid uključujući kontaktni dermatitis na kapcima, konjuktivitis, heilitis i dermatitis (39). Danas su razvijeni drugi konzervansi koji se koriste u pripravcima za ublažavanje simptoma suhog oka, primjeri su: polikvarternij (POLYQUAD®), stabilizirani oksikloro kompleks (SOC), natrijev perborat (GenAqua® i Dequest®), ionska puferska otopina s cinkom, kloridom, boratom i sorbitolom (Sofzia®) (40).





**Slika 3.** Kemijska struktura benzalkonijevog klorida (38)

#### 1.4.2.4. Sredstvo za izotonizaciju

U oftalmologiji se najčešće primjenjuju otopine koje su izotonične sa suzama, količina natrijeva klorida (NaCl) ekvivalentna 0.9% se primjenjuje zbog dokazano najbolje podnošljivosti. Oko može tolerirati koncentraciju NaCl-a od 0.6-2% bez znakova nelagode (41).

#### 1.4.2.5. Sredstva za povećanje viskoznosti

Dodatak tvari za povećavanje viskoznosti oftalmičkim pripravcima produljuje vrijeme kontakta površine oke i lijeka, za tu svrhu se koriste hidrofilni polimeri velike molekularne mase koji ne prolaze kroz biološke membrane i koji s vodom tvore mrežastu trodimenzionalnu strukturu (29). Oftalmičke formulacije sadrže sredstva za povećanje viskoznosti kako bi se produžilo vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka, najčešće se koriste hidroksipropilmetilceluloza, polialkoholi, natrijeva karboksimetilceluloza i hidroksimetilceluloza (42).

#### 1.4.2.6. Bioadhezivna sredstva

Bioadhezija se odnosi na proces vezanja nosača lijeka na određeno biološko mjesto npr. epitelno tkivo ili sluznicu, u ovom slučaju vezanje na mucin u oku, na taj način se produljuje vrijeme kontakta oftalmika i površine oka. Najčešće korišteni bioadhezivi su makromolekularni hidrokoloidi s velikim brojem hidrofilnih skupina koje su potrebne za stvaranje vodikovih veza, a mogu biti topivi ili netopivi u vodi, primjeri su: hidroksipropil celuloza, hidroksipropil metilceluloza, hitozan, derivati poliakrilne kiseline (43).

#### 1.4.2.7. Sredstvo za suspendiranje

Sredstva za suspendiranje koriste se kako bi se spriječila sedimentacija, moraju biti kompatibilni s drugim sastojcima pripravka i netoksični, najčešće korišteni su: metilceluloza, karboksimetilceluloza, hidroksipropilmetil celuloza, sintetski polimeri poput karbomera, poloksamera i polivinil alkohola (31).

#### 1.4.2.8. Promotori apsorpcije

Promotori apsorpcije olakšavaju isporuku djelatne tvari očnog pripravka na ciljano mjesto djelovanja jednim od tri mehanizma djelovanja: mijenjanjem stabilnosti suznog filma, modifikacijom komponenti membrane ili djelovanjem na čvrste međustanične spojeve u očnom epitelu. Danas postoje različiti pojačivači apsorpcije (ciklodekstrini, kelatna sredstva, krunski eteri, žučne kisline), ali isporuka lijeka do ciljanog mjesta djelovanja u oku i dalje predstavlja problem u oftalmologiji (44). Najčešći promotori apsorpcije i njihov mehanizam djelovanja naveden je u tablici 7.

**Tablica 7.** Promotori apsorpcije korišteni u oftalmologiji i njihov mehanizam djelovanja (44)

<b>VRSTA APSORPCIJE</b>	<b>PROMOTORA</b>	<b>PRIMJER</b>	<b>PRETPOSTAVLJENI MEHANIZAM</b>
Ciklodekstrin		$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -ciklodekstrin	Ekstrakcija lipida i kolesterola iz membrane
Kelirajući agens		EDTA	Ekstrakcija kalcijevih iona iz čvrstih međustaničnih spojeva
Krunski eter		12-kruna-4, 15-kruna-5, 18-kruna-6	Ekstrakcija kalcijevih iona iz čvrstih međustaničnih spojeva
Surfaktanti		Benzalkonijev klorid	Morfološke promjene u epitelu
Žučne kiseline i soli		Deoksikolat, glikokolat, taurodeksikolat	Različiti mehanizmi koji dovode do promjene integriteta membrane

## 1.5. Alergijske reakcije

Lijekovi mogu potaknuti imunološki sustav na neželjene reakcije koje se očituju kao štetni učinci lijekova, a te se reakcije obično karakteriziraju kao alergije na lijekove (4). Alergijske reakcije na lijekove nisu slične farmakološkom učinku lijeka, a mogu ih izazvati koncentracije lijeka niže od terapijskih (45). Reakcije preosjetljivosti se klasificiraju na temelju imunoloških mehanizama koji su odgovorni za oštećenje tkiva i nastanak bolesti. Rana preosjetljivost odnosno I. oblik preosjetljivosti uzrokovana je otpuštanjem medijatora upale iz mastocita, reakcija najčešće ovisi o stvaranju imunoglobulina E (IgE) na antigene iz okoliša i vezanja IgE na mastocite. Bolesti posredovane protutijelima koja nisu IgE, a usmjerena su na stanice ili tkiva spadaju u II. oblik preosjetljivosti. Bolesti stvaranja imunokompleksa koji se zatim odlažu u tkiva i krvne žile izazivajući oštećenja tkiva spadaju u III. oblik preosjetljivosti. Bolesti posredovane T stanicama predstavljaju IV. tip preosjetljivosti (46). Preosjetljivost posredovana stanicama uzrok je alergijskog kontaktnog dermatitisa kojeg uzrokuju lijekovi za lokalnu primjenu (4). Određeni lijekovi, primjerice, penicilini izazivaju alergijske reakcije aktivacijom različitih imunoloških mehanizama (47). Molekula lijeka koja sama po sebi ne inducira imunološki sustav već se veže na neki protein (nosač) djeluje kao haptent, imunološki sustav prepoznaje spoj haptena i nosača kao nevlastiti i reagira stvaranjem IgE ili IgG protutijela (4).

### 1.5.1. Alergijske reakcije povezane s kapima za oči

Oftalmološki lijekovi mogu izazvati brojne neželjene reakcije, a alergijske reakcije su najčešće spominjane iako su manje česte od kroničnih promjena očne površine izazvane dugotrajnom uporabom lijekova. Uz alergijski konjuktivitis, koji je rijetko izazvan imunološkom reakcijom tipa I, najčešća alergijska reakcija izazvana lijekovima je periokularni dermatitis, nastao reakcijom preosjetljivosti tipa IV. Veliki postotak bolesnika s periokularnim dermatitisom testiran je na lijekove, a rezultati su pokazali da postoje alergijske reakcije na djelatnu tvar ili konzervanse u dvije trećine bolesnika (48). Simptomi konjuktivalnih alergija (suzenje, kongestija, fotofobija, pečenje i žarenje) koje izaziva primjena kapi za oči s konzervansima su različiti, može se razviti jednostavna konjuktivalna kongestija ili papilarni konjuktivitis s ili bez ekcema, a u nekim primjerima se razvija teški oblik preosjetljivosti tipa IV. Simptomi alergije se najčešće javljaju nekoliko dana nakon početka primjene, a povlače se brzo nakon prestanka korištenja lijeka,

međutim ponekad se javljaju reakcije odgođene preosjetljivosti, u takvim stanjima je teško dokazati povezanost između kapi za oči i upalnog procesa (38). Alergijski kontaktni dermatitis izazvan lokalnim oftalmičkim lijekovima se najčešće karakterizira ekcemom na kapcima i periorbitalnoj koži, a rjeđe na spojnicu. Ukoliko se pojavi dermatitis na kapku, periokularni dermatitis ili konjuktivitis jatrogenog uzroka potrebno je napraviti kožni test (tzv. *prick* ili *scratch* test) s korištenim očnim lijekom, ali i test na pojedinačne sastojke lijeka (49). Alergijski kontaktni dermatitis je česti uzrok periokularnog dermatitisa, razlog je tanka koža u periokularnom području (0.55 mm u usporedbi s 2 mm na drugim područjima lica) koja ovo područje čini lako dostupnim za penetraciju alergena (50). Topikalni oftalmički lijekovi su česta skupina haptena. Uzrok kontaktnog dermatitisa mogu biti djelatne i pomoćne tvari kapi za oči (51). Alergijski kontaktni dermatitis na  $\beta$  blokatore je čest, alergeni uključuju befunolol, betaksolol, levobunolol, metipranolol i timolol (52). Nekoliko slučajeva opisuje alergijski kontaktni dermatitis uzrokovan dorzolamidom (51). Dokumentirani su i pozitivni kožni testovi na kapi s pilokarpinom (53). Diklofenak natrij, nesteroidni protuupalni lijek, pokazao je jaki postoperativni alergijski kontaktni dermatitis koji je dokazan kožnim testovima (54). Lokalni antibiotici, posebice aminoglikozidi su učestali senzitizeri, zabilježene su visoke stope senzitivacije na gentamicin, neomicin i kanamicin (51). Neomicin je česti senzitizer, a dokazana je i križna reaktivnost s drugim aminoglikozidima (55). Alergijski kontaktni dermatitis na makrolidske antibiotike je rijedak (51). Prvi slučaj je opisan za azitromicin, kožni test je pokazao snažnu reakciju na jednodozne kapi bez konzervansa (56). Alergijski kontaktni dermatitis na kortikosteroide je čest iako oni sami djeluju protuupalno, a najčešće su reakcije na hidrokortizon korišten periokularno (57). Od pomoćnih tvari najčešće su alergijske reakcije na benzalkonijev klorid (51). Konzervansi koji najčešće izazivaju alergijske reakcije u oftalmologiji su: benzalkonij klorid (BAK), tiomersal, parabeni i klorheksidin (58). Benzalkonijev klorid je dobro poznati iritans u dermatologiji, ali je rijetko glavni alergen odgovoran za kontaktni dermatitis (59). Svojim proupalnim i toksičnim djelovanjem BAK može izazvati ili pogoršati sindrom suhog oka ili alergijski konjuktivitis (38). Benzalkonij klorid izaziva povećanu permeabilnost rožnice i dovodi do oštećenja epitela rožnice, a visoke koncentracije narušavaju stabilnost lipidne komponente suza što rezultira nestabilnošću suznog filma (34). Alergenost benzalkonij klorida u postotku od 0.1 % je u porastu, s obzirom na važnost benzalkonija kao alergena bitno je određivanje ispravne koncentracije uzorka za provedbu kožnih testova (60). Zabilježena su i dva slučaja teških anafilaktičkih reakcija uzrokovanih kapima za oči s

benzalkonijevim kloridom, testiranje na koži je potvrdilo da je BAK uzrok anafilaksije (61). U budućnosti će naglasak biti na izbjegavanju dugotrajne uporabe konzervansa, smanjenjem njihove koncentracije (toksičnost je ovisna o dozi i vremenu primjene) i razvitku netoksičnih konzervansa (48). Napori industrije bit će usmjereni na proizvodnju jednodozirnih oblika koji ne zahtijevaju konzervanse i proizvodnju višedozirnih spremnika s mehanizmima koji onemogućavaju mikrobiološku kontaminaciju. Razvijanje farmaceutskih oblika s duljim učinkom djelovanja smanjit će potrebu za učestalim doziranjem, a time i smanjiti izloženost oka konzervansima (34).

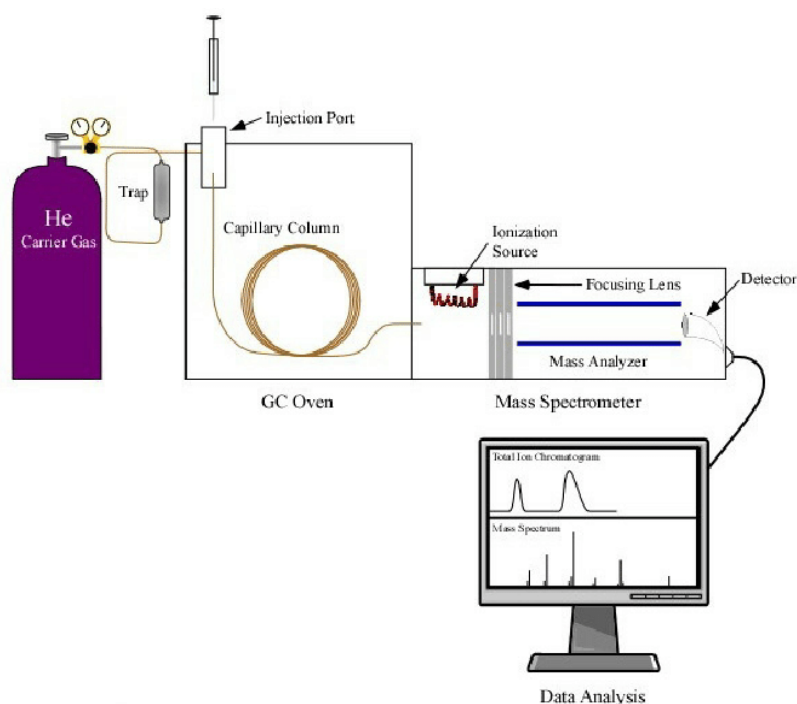
### **1.6. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa**

Plinska kromatografija je instrumentalna tehnika odjeljivanja često primjenjivana u modernoj kemijskoj analizi još od njezina razvoja 1952. godine. Kod plinske kromatografije uzorak mora biti preveden u plinovito stanje. Pokretna faza je kemijski inertan plin: argon, dušik, helij ili ugljikov dioksid. Nepokretna faza je nehlapljiva tekućina nanosena na kruti nosač. Uzorak se injektira na temperaturi koja omogućuje prelazak u plinovito stanje (62). Plinska kromatografija koristi se samo za termički stabilne hlapljive spojeve te spojeve koji se mogu prevesti u hlapljivi oblik (63). Razdvajanje je temeljeno na različitoj brzini gibanja sastavnica nošenih pokretnom fazom, a posljedica je različitog afiniteta sastavnica prema nepokretnoj fazi, zbog čega razdvojene sastavnice dolaze do detektora u različito vrijeme (vrijeme zadržavanja) (64). Usporedbom vremena zadržavanja supstance s vremenima zadržavanja standarda čistih tvari moguće je kvalitativno odrediti o kojem je spoju riječ, a površina ispod kromatografske krivulje proporcionalna je koncentraciji supstance te predstavlja kvantitativni signal (65).

Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) instrumentalna je metoda identifikacije kemijskih struktura kroz dva procesa: ionizaciju uzorka i razdvajanje fragmenata djelovanjem magnetskog polja (65). Uzorak se uvodi u ionizator gdje se molekule i/ili fragmenti molekula ioniziraju. Ioni se razdvajaju prema odnosu masa i naboja ( $m/z$ ). Razdvojeni ioni se detektiraju, a signal se pohranjuje u bazi podataka kao  $m/z$  omjer i može se prikazati u obliku  $m/z$  spektra (66).

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) zlatni je standard u kvantitativnim i kvalitativnim analizama. Predstavlja

spoj plinsko-tekućinske kromatografije, koja služi za odjeljivanje sastojaka iz smjese te spektrometrije masa kojom se analiziraju pojedinačni sastojci (65). Visoka osjetljivost, selektivnost, preciznost, pouzdanost te male količine uzoraka korištenih za analizu samo su neke od prednosti GC-MS metode. Visoka temperatura injektora je nedostatak metode zbog čega nije pogodna za analizu termički labilnih tvari. Ovom metodom se analiziraju spojevi koji se prevode u plinovito stanje na temperaturama nižim od 400 °C, a da se pri tome ne raspadaju. Nedostatak je također skup i dugotrajan postupak pripreme, posebice pri kvantitativnim analizama (63).



**Slika 4.** Shematski prikaz osnovnih dijelova GC-MS tehnike (67)

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Primjenom GC-MS metode odrediti kvalitativni sastav kapi za oči
2. Usporediti rezultate sastojaka s deklaracijom na ambalaži
3. Odrediti moguću povezanost prisustva pronađenih sastojaka s alergijskim reakcijama



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Kemikalije i uzorci za analizu

U ovom istraživanju korištene su kemikalije:

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

N-Heksan p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

Provedeno je kvalitativno ispitivanje uzoraka, za određivanje njihovog sastava.

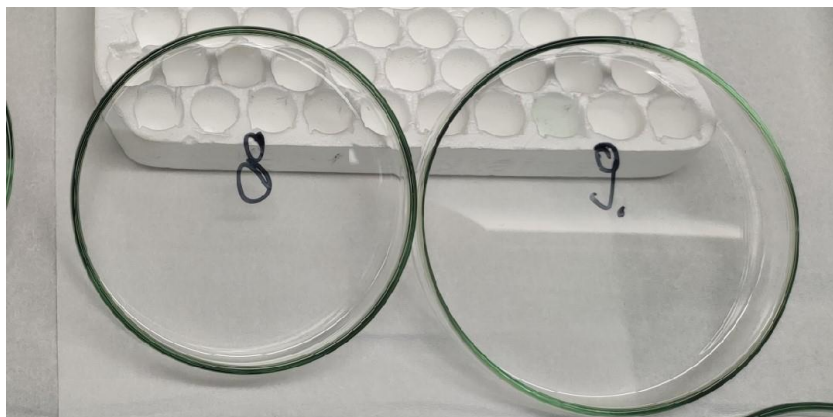
### 3.2. Postupak pripreme uzoraka za analizu

Svi su uzorci označeni nekim laboratorijskim brojem, a prikaz nekih od označenih uzoraka je na slici 5. Ukupno je obrađeno 7 uzoraka:

**Tablica 8.** Popis analiziranih uzoraka

UZORAK	VRSTA	REŽIM IZDAVANJA *
1	miotik (pilocarpin)	R
2	antiseptik	R
3	umjetne suze	BR
4	antiseptik	BR
5	antibiotik	R
6	kortikosteroid + antiinfektiv	R
7	umjetne suze (hipromeloza)	BR

\* R- na recept, BR- bez recepta



**Slika 5.** Ispitivani uzorci na sušenju u digestoru

Za pripremu uzoraka korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak volumena 100  $\mu$ L. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala: kloroforma, etil acetata i N-heksana u jednakom omjeru ( $v/v/v= 1:1:1$ ), te su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Uzorci u Petrijevim zdjelicama nekoliko su puta ispirani kloroformom kako bi se cijeli naneseni sadržaj otopio. Nakon što su otopljeni uzorci filtrirani, preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu.

### **3.3. Instrumentalna analiza i radni uvjeti GC-MS metode**

U ovom istraživanju za kvalitativnu analizu ispitivanih uzoraka korišten je plinski kromatograf s masenim spektrometrom: Mass Hunter GC-MS Agilent Technologies .



**Slika 6.** Mass Hunter GC-MS Agilent Technologies (68)

Kromatografska analiza pripremljenih ekstrakata izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa, metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (*engl.* Total ion chromatogram, TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (*engl.* Single ion monitoring, SIM). Optimiran je temperaturni program.

- Radni uvjeti:

-volumen injektiranja: 1  $\mu$ L (splitless)

-temperatura injektora 250 °C

-protok plina nosioca 1,0 mL/min

- Ukupno trajanje temperaturnog programa: 25 minuta:

I 100 °C izotermno 2 min

II 10 °C /min do 275 °C

III 275 °C izotermno 5 min

## **4. REZULTATI**

Nakon ekstrakcije uzorci su podvrgnuti instrumentalnoj analizi koristeći GC-MS metodu. Prikaz izvješća uzoraka 1 i 3 je na slikama (7. i 8.). Istraživanje je obuhvatilo isključivo kvalitativnu analizu te nijedna tvar nije kvantitativno određena. Rezultat GC-MS metode prikazan je tablično i grafički. Tablica sadržava podatke o potencijalno pronađenim tvarima s nazivom, kemijskom formulom, CAS podacima (eng. *Chemical Abstract Service* ), te postotkom podudaranja s bazom podataka kao i bazom s kojom se uspoređivalo. Usporedba tvari se bazira na podudaranju s poznatim spojevima iz komercijalnih biblioteka (npr. već spomenuta CAS baza). Grafički prikaz obuhvaća ukupni kromatogram. Na slici broj 7. dat je grafički prikaz koji uključuje pojedinačne podatke za svaki određeni signal. Rezultat predstavlja TIC (eng. *total ion chromatogram* ) odnosno ukupni kromatogram svih prisutnih tvari koje se mogu odrediti ovom tehnikom na prethodno opisan način ekstrakcije. Grafički prikaz daje na x osi vrijeme analize koje je karakteristično za vrstu tvari dok je na y osi prikazan intezitet samog signala koji je proporcionalan količini prisutne tvari.

U tabličnom prikazu na slici 7. koji se odnosi na uzorak 1 detektirane su 3 tvari. U uzorku 3 detektirano je značajno više tvari, čak 53, koje su na razini tragova, a prikazane su na slici 8. kao kromatografski pikovi. Ovom metodom nije detektirana nijedna tvar u ostalim uzorcima.

U sastavu uzorka 1 navedeni su: pilokarpinklorid kao aktivna tvar (miotik) te natrijev klorid, dinatrijev edetat, benzalkonijev klorid, voda i pročišćena voda kao pomoćne tvari. Navedene tvari nisu detektirane ovom metodom.

U sastavu uzorka 3 navedeni su: propilenglikol kao aktivna tvar (lubrikant) te boratna kiselina, dimiristol fosfatidilglicerol, natrijev edetat, hidroksipropil guar, mineralno ulje, polioksil 40 stearat, POLIQUAD®, sorbitan tristearat, sorbitol, natrijev hidroksid te pročišćena voda kao pomoćne tvari. Navedene tvari nisu detektirane ovom metodom.

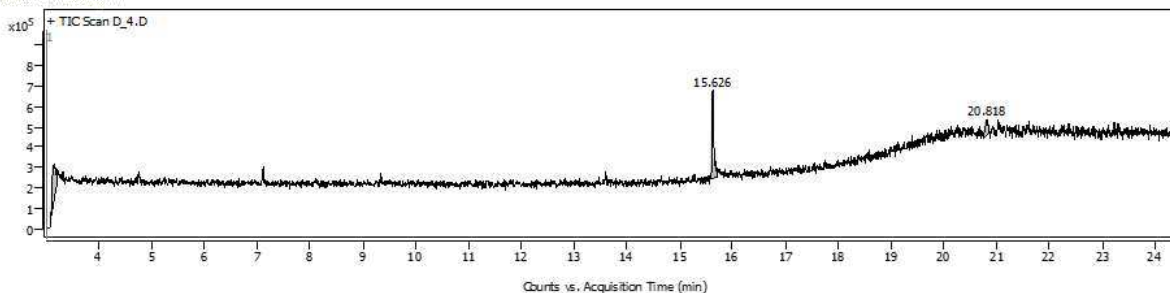
# Analysis Report



## Sample Information

Name	4	Data File Path	D:\MassHunter\GOM5(1\data)\Davorika_D_4.D
Sample ID		Acq. Time (Local)	7/27/2021 12:39:58 PM (UTC+02:00)
Instrument	KTF_GOM5_QQQ	Method Path (Acq)	D:\MassHunter\GOM5(1\methods)\Davorika_1.M.M
MS Type	QQQ	Version (Acq SW)	MassHunter GC/MS Acquisition 10.0.368 14-Feb-2019 Copyright © 1989-2018 Agilent Technologies, Inc.
Inj. Vol. (ul)	1	IRM Status	
Position	4	Method Path (DA)	D:\MassHunter\Methods\10.0\Davorika.m
Plate Pos.		Target Source Path	
Operator	Davorika	Result Summary	

## Sample Chromatogram



### Chromatogram Peaks

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	SNR
1	3.088	3.142	3.201	176307	812813	38.87	
2	15.581	15.626	15.709	428483	1010016	48.30	
3	20.756	20.818	20.853	78585	268229	12.83	

## Sample Spectra

### + Scan (rt: 3.09-3.20 min)

#### Peak 1 from + TIC Scan (Acetaldehyde; C2H4O)

#### Spectrum Identification Table

Best ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	CAS	Score	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Lib/DB
Yes	LibSearch	Acetaldehyde	C2H4O			75-07-0	84.01	84.01			W9N08.L
No	LibSearch	ethanol	C2H4O			57239-63-1	83.74	83.74			W9N08.L
No	LibSearch	Formic acid, ethenyl ester	C3H4O2			692-45-5	75.47	75.47			W9N08.L

### + Scan (rt: 15.60-15.70 min)

#### Peak 2 from + TIC Scan (Isopentylacetylene; C7H12)

#### Spectrum Identification Table

Best ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	CAS	Score	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Lib/DB
Yes	LibSearch	Isopentylacetylene	C7H12			999008-44-2	82.21	82.21			W9N08.L
No	LibSearch	(1R,4S)-5,5-Dimethyl-2-cyclopentene-1,4-diol	C7H12O2			999033-85-2	80.07	80.07			W9N08.L
No	LibSearch	2-Propylbuta-2,3-dien-1-ol	C7H12O			999018-29-2	77.45	77.45			W9N08.L

### + Scan (rt: 20.76-20.85 min)

#### Peak 3 from + TIC Scan (1-(Pent-4-ynyl)pyrano[3,4-b]indol-3-one; C16H13NO2)

#### Spectrum Identification Table

Best ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	CAS	Score	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Lib/DB
Yes	LibSearch	1-(Pent-4-ynyl)pyrano[3,4-b]indol-3-one	C16H13NO2			116705-58-9	85.34	85.34			W9N08.L
No	LibSearch	3-[o-Methoxyphenyl]-5,6-[[1,2'-cyclohexylidene]thiazol[2,3-c]s-triazole	C15H17N3OS			999422-75-2	68.41	68.41			W9N08.L

MassHunter Qual 10.0  
(End of Report)

Slika 7. Izvještaj s instrumenta za uzorak 1

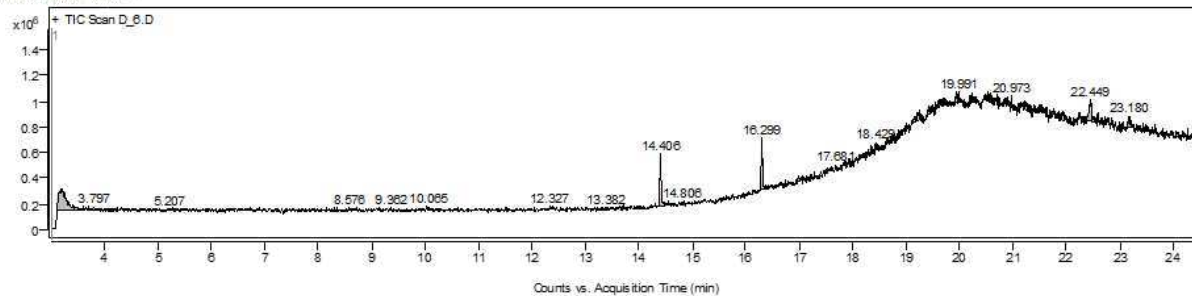
# Analysis Report



## Sample Information

Name	6	Data File Path	D:\MassHunter\GCMS\1\data\Davorika_D_6.D
Sample ID		Acq. Time (Local)	7/28/2021 9:22:50 AM (UTC+02:00)
Instrument	KTF_GCMS_QQQ	Method Path (Acq)	D:\MassHunter\GCMS\1\methods\Davorika_1.M.M
MS Type	QQQ	Version (Acq SW)	MassHunter GC/MS Acquisition 10.0.368 14-Feb-2019 Copyright © 1989-2018 Agilent Technologies, Inc
Inj. Vol. (ul)	1	IRM Status	
Position	1	Method Path (DA)	D:\MassHunter\Methods\10.0\1\ZVIESTAJ.m
Plate Pos.		Target Source Path	
Operator		Result Summary	

## Sample Chromatograms



### Chromatogram Peaks

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	SNR
1	3.059	3.204	3.583	168423	1728707	26.43	
2	3.763	3.797	3.839	27073	57061	0.87	
3	4.091	4.104	4.121	27461	24382	0.37	
4	5.178	5.207	5.223	16676	26936	0.41	
5	8.554	8.576	8.579	19923	17849	0.27	
6	9.345	9.362	9.374	20453	19360	0.30	
7	9.627	9.645	9.693	22956	58455	0.89	
8	10.045	10.065	10.077	23897	20689	0.32	
9	12.308	12.327	12.358	24150	33381	0.51	
10	13.358	13.382	13.382	21388	23499	0.36	
11	14.297	14.308	14.320	26588	18903	0.29	
12	14.362	14.406	14.471	410269	740481	11.32	
13	14.475	14.551	14.560	29287	58905	0.92	
14	14.799	14.806	14.831	22346	20207	0.31	
15	16.284	16.299	16.343	402108	688417	10.22	
16	16.735	16.743	16.759	32264	21087	0.32	
17	16.956	16.985	17.015	40373	67110	1.03	
18	17.098	17.071	17.098	30454	30874	0.47	
19	17.388	17.402	17.419	31245	34310	0.52	
20	17.665	17.661	17.698	31971	29190	0.45	
21	18.333	18.350	18.367	50898	43496	0.67	
22	18.412	18.429	18.443	63412	58128	0.89	
23	18.864	18.867	18.877	63853	27935	0.43	
24	19.126	19.167	19.174	43170	73000	1.12	
25	19.191	19.253	19.273	68563	176671	2.70	
26	19.392	19.419	19.455	74988	139622	2.13	
27	19.624	19.636	19.666	50891	57946	0.89	
28	19.669	19.677	19.683	47623	22926	0.35	
29	19.907	19.943	19.976	81235	157643	2.41	
30	19.978	19.991	20.029	83923	103223	1.58	
31	20.213	20.232	20.239	67087	56694	0.87	
32	20.515	20.522	20.545	65732	56917	0.86	
33	20.734	20.739	20.748	46782	23299	0.36	
34	20.965	20.973	20.980	70430	22548	0.34	
35	21.222	21.232	21.277	64592	126249	1.93	
36	21.311	21.332	21.351	58963	57325	0.88	
37	21.466	21.487	21.497	65108	57113	0.87	
38	21.612	21.632	21.649	72514	80921	1.24	
39	21.901	21.928	21.966	78467	201435	3.08	
40	22.125	22.128	22.139	47119	24696	0.38	
41	22.385	22.449	22.627	167259	591197	9.04	
42	22.572	22.604	22.614	75457	74521	1.14	
43	22.721	22.728	22.732	59624	17734	0.27	
44	22.849	22.856	22.863	57334	29634	0.45	
45	23.008	23.011	23.021	46926	18613	0.28	
46	23.028	23.039	23.049	63890	37996	0.58	
47	23.137	23.180	23.218	91367	229214	3.50	
48	23.656	23.666	23.690	61416	49265	0.75	
49	23.802	23.811	23.834	53838	43053	0.66	
50	24.048	24.062	24.095	44705	62054	0.95	
51	24.170	24.173	24.193	45492	23540	0.36	
52	24.202	24.207	24.231	40909	41233	0.63	
53	24.289	24.278	24.290	75607	54618	0.84	

Slika 8. Izvještaj s instrumenta za uzorak 3



## **5. RASPRAVA**

Od ukupno sedam analiziranih uzoraka kapi za oči, korištenom metodom pripreme uzoraka te korištenom instrumentalnom tehnikom, u samo dva uzorka detektirana je prisutnost tragova nekih tvari - organskih otapala. Spojevi detektirani GC-MS metodom predstavljaju potencijalne spojeve s obzirom na to da postotak podudarnosti s komercijalnim bibliotekama nije 100 % . Detektirani spojevi mogu biti posljedica kontaminacije uzorka prilikom izvođenja analize. Nedostatak GC-MS metode je detekcija samo organskih tvari, stoga anorganske tvari poput soli, koje mogu tvoriti sastavnice kapi za oči, ostaju nedetektirane.

S aspekta alergijskih reakcija povezanih s kapima za oči jedan od zanimljivijih sastojaka je benzalkonijev klorid kao najčešće korišteni konzervans, a ujedno i dokazani alergen. Od sedam analiziranih uzoraka, četiri kao konzervans sadrže benzalkonijev klorid (tablica 9.). Instrumentalna analiza, međutim, nije dokazala prisutnost benzalkonijevog klorida u analiziranim uzorcima. Dobiveni rezultati ne isključuju mogućnost da je bio prisutan, već samo upućuju na to da korištena metoda možda nije dovoljno osjetljiva ili je njegova koncentracija bila niska te zbog toga nije detektirana. Najčešće metode za određivanje benzalkonijevog klorida u kapima za oči su: ekstrakcijska spektrofotometrija, HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) i kapilarna elektroforeza (69). AlAani i AlNukkary u svom radu navode da je HPLC metoda specifična, brza, robusna, precizna i točna za kvantitativnu analizu benzalkonijevog klorida (70). Navedena istraživanja ne navode GC-MS kao metodu izbora kod određivanja benzalkonijevog klorida u oftalmičkim pripravcima, stoga ne iznenađuje činjenica da u analiziranim uzorcima nije pronađen. Ostali konzervansi koji izazivaju elergijske reakcije poput parabena, tiomersala i klorheksidina nisu navedeni u sastavu analiziranih kapi za oči.

**Tablica 9.** Prikaz uzoraka s obzirom na prisutnost benzalkonijevog klorida

UZORAK	VRSTA	BENZALKONIJEV KLORID
1	miotik (pilocarpin)	DA
2	antiseptik	NE
3	umjetne suze	NE
4	antiseptik	NE
5	antibiotik	DA
6	kortikosteroid + antiinfektiv	DA
7	umjetne suze (hipromeloza)	DA

Neomicin je naveden kao česti senzitizer, djelatna je tvar u uzorku 6, međutim nije pronađen korištenom GC-MS metodom. Ostali ranije navedeni uzročnici alergijskih reakcija u kapima za oči nisu navedeni na deklaracijama analiziranih uzoraka, niti su detektirani instrumentalnom analizom.

Iritacije oka nakon primjene lokalnih pripravaka nisu rijetkost, a često su posljedica alergijskih reakcija. Potencijalni alergeni u kapima za oči nisu dovoljno istraženi. Pretraživana literatura navodi da reakcije najčešće nastaju nakon primjene pripravaka koji sadrže benzalkonijev klorid. GC-MS metoda koja je korištena u ovom radu nije dovoljno osjetljiva za detekciju benzalkonijevog klorida. Prema ranije navedenim istraživanjima metoda izbora kod kvalitativnog i kvantitativnog određivanja benzalkonijevog klorida u kapima za oči bila bi HPLC. Potrebno je proširiti istraživanje koristeći druge metode za ispitivanje sastojaka navedenih na deklaraciji kapi za oči te razviti metode za određivanje drugih poznatih alergena u oftalmičkim pripravcima.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Provedena je GC-MS analiza kapi za oči, od 7 uzoraka u samo 2 uzorka (uzorci 1 i 3) detektirana je prisutnost tragova nekih tvari – organskih otapala.
2. Analiza je bila isključivo kvalitativna te nijedna tvar nije kvantitativno određena.
3. U četiri uzorka je kao konzervans naveden benzalkonijev klorid, međutim, korištenom tehnikom on nije detektiran.
4. Rezultati istraživanja ne isključuju mogućnost da je benzalkonijev klorid bio prisutan, već upućuju na to da korištena metoda nije dovoljno osjetljiva ili je njegova koncentracija bila niska za detekciju.
5. Kao metoda izbora kod kvalitativnog i kvantitativnog određivanja benzalkonijevog klorida navodi se HPLC, stoga je potrebno provesti dodatne analize navedenom metodom
6. Ostali alergeni prisutni u kapima za oči nedovoljno su istraženi, potrebno je razvijanje metoda za njihovu detekciju i provođenje daljnjih ispitivanja

## **7. LITERATURA**

1. Ivanišević M. i sur. Oftalmologija, udžbenik za studente medicine. Split: Medicinski fakultet, 2015.
2. Galloway N.R., Amoaku W.M.K. (1999) Basic Anatomy and Physiology of the Eye. In: Common Eye Diseases and their Management. Springer, London.
3. Čupak, K., Gabrić, N., Cerovski, B., Bojić, L., Bradamante, Ž., Beradetić, T., Bubaš, N., Cerovski, B., Cvetnić, B. & Čurković, T. (2004) Oftalmologija. Zagreb. Nakladni zavod Globus.
4. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ: Temeljna i klinička farmakologija .11 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
5. Chamber-Fox S. (2004) Remnington education, Pharmaceutics. Pharmaceutical press, London
6. Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči, Farmaceutski glasnik 2004;60:311–329.
7. Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanja bioraspodjelivosti lijeka u oku, Farmaceutski glasnik 2012;68.
8. Igor Francetić i suradnici (2010) Farmakoterapijski priručnik (6. izdanje). Zagreb, Medicinska naklada.
9. Tomić, S. (ur.) (2007) Hrvatska farmakopeja 2007 s komentarima. Zagreb, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
10. Bourlais CL, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems--recent advances. Prog Retin Eye Res. 1998 Jan;17(1):33-58.
11. Waksman SA (1947) What is an antibiotic or an antibiotic substance? Mycologia 39:565–569
12. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Baza lijekova, Dostupno na poveznici: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/> . Datum pristupa: 14.5.2021. godine.
13. Muñoz-Fernández S, Martín-Mola E. Uveitis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006 Jun;20(3):487-505.
14. Okhravi N, Odufuwa B, McCluskey P, Lightman S. Scleritis. Surv Ophthalmol. 2005 Jul-Aug;50(4):351-63.

15. Gaynes, B. I., & Fiscella, R. (2002). Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Ophthalmic Use. *Drug Safety*, 25(4), 233–250.
16. World health organisation (WHO), Blindness and vision impairment, dostupno na poveznici: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>. Datum pristupa: 17.5.2021.
17. Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, Dietlein T, Pfeiffer N. The Diagnosis and Treatment of Glaucoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2020;117(13):225-234.
18. Johnson, D.A. and Hricik, J.G. (1993) The Pharmacology of Alpha-Adrenergic Decongestants. *Pharmacotherapy*, 13, 110S-115S.
19. Carr W, Schaeffer J, Donnenfeld E. Treating allergic conjunctivitis: A once-daily medication that provides 24-hour symptom relief. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2016;7(2):107-114.
20. Buckley, R. Assessment and management of dry eye disease. *Eye* 32, 200–203 (2018).
21. Moshirfar M, Pierson K, Hanamaikai K, Santiago-Caban L, Muthappan V, Passi SF. Artificial tears potpourri: a literature review. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1419-1433. Published 2014 Jul 31.
22. Sullivan, David A., Dartt, Darlene A., Meneray, Michele A. (1998) *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes*. Springer US
23. US Food and Drug Administration. *Ophthalmic Demulcents*. Washington: US Government Printing Office; 2000.
24. Grene RB, Lankston P, Mordaunt J, Harrold M, Gwon A, Jones R. Unpreserved carboxymethylcellulose artificial tears evaluated in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Cornea*. 1992;11(4):294–301.
25. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86(2):181–184.
26. Simmons, P., & Vehige, J. (2017). Investigating the potential benefits of a new artificial tear formulation combining two polymers. *Clinical Ophthalmology*, Volume 11, 1637–1642.



27. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Baza medicinskih proizvoda , Dostupno na poveznici: <https://www.halmed.hr/Medicinski-proizvodi/Baza-medicinskih-proizvoda/>. Datum pristupa: 27.6..2021. godine.
28. Članak 3 Zakona o medicinskim proizvodima, Narodne novine, br. 76/13., dostupno na [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_06\\_76\\_1521.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1521.html). Datum pristupa: 27.6.2021.
29. Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:861904. Published 2014 Mar 18.
30. Lang, J. C. (1995). Ocular drug delivery conventional ocular formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(1), 39–43.
31. Ali, Y., & Lehmuusaari, K. (2006). Industrial perspective in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(11), 1258–1268.
32. Schuerer N, Stein E, Inic-Kanada A, Pucher M, Hohenadl C, Bintner N, et al. Implications for Ophthalmic Formulations: Ocular Buffers Show Varied Cytotoxic Impact on Human Corneal-Limbal and Human Conjunctival Epithelial Cells. *Cornea*. 2017 Jun;36(6):712-718.
33. Tripathi BJ, Tripathi RC, Kolli SP. Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens Eye Toxicol Res*. 1992;9:361-375
34. P. David Freeman & Malik Y Kahook (2009) Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspectives, *Expert Review of Ophthalmology*, 4:1, 59-64
35. Block SS. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Malvern, Pa: Lea & Febiger; 1991.
36. Kreiner C. Biochemical aspects of ophthalmic preservatives. *Contacto*. 1979;Nov:10-14
37. Noecker, R. (2001). Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Advances in Therapy*, 18(5), 205–215.
38. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res*. 2010 Jul;29(4):312-34
39. Isaac J, Scheinman PL. Benzalkonium Chloride: An Irritant and Sensitizer. *Dermatitis*. 2017 Nov/Dec;28(6):346-352.

40. Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol*. 2019 Aug 1;13:1409-1425.
41. Y. Pramar, "Compounding Ophthalmic Liquids", *The Louisiana Pharmacist* (Continuing Education web publication), Fall 2009
42. Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular Drug Delivery: Present Innovations and Future Challenges. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Sep;370(3):602-624.
43. Kaur, I. P., & Smitha, R. (2002). Penetration Enhancers and Ocular Bioadhesives: Two New Avenues for Ophthalmic Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(4), 353–369.
44. Moiseev RV, Morrison PWJ, Steele F, Khutoryanskiy VV. Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019 Jul 9;11(7):321.
45. Greenberger, P. A. (2019). Drug allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(6), 474–479.
46. Abbas A., Lichtman A. H., Pillai S. *Osnove imunologije. Funkcije i poremećaji imunološkog sustava*, 5. izdanje. Medicinski fakultet Sveučilište u Splitu, 2017.
47. Lieberman P, Nicklas RA, Randolph C, Oppenheimer J, Bernstein D, Bernstein J, et al. Anaphylaxis—a practice parameter update 2015. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015; 115:341–384
48. Baudouin C. Allergic reaction to topical eyedrops. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005 Oct;5(5):459-63.
49. Gilissen L, De Decker L, Hulshagen T, Goossens A. Allergic contact dermatitis caused by topical ophthalmic medications: Keep an eye on it! *Contact Dermatitis*. 2019 May;80(5):291-297.
50. Landeck, L., John, S. M., & Geier, J. (2013). Topical ophthalmic agents as allergens in periorbital dermatitis. *British Journal of Ophthalmology*, 98(2), 259–262.
51. Grey KR, Warshaw EM. Allergic Contact Dermatitis to Ophthalmic Medications: Relevant Allergens and Alternative Testing Methods. *Dermatitis*. 2016 Nov/Dec;27(6):333-347.
52. Jappe U, Uter W, Menezes de Pa´dua CA, et al. Allergic contact dermatitis due to beta-blockers in eye drops: a retrospective analysis of multicentre

53. Ortiz FJ, Postigo C, Ivars J, et al. Allergic contact dermatitis from pilocarpine and thimerosal. *Contact Dermatitis* 1991;25(3):203-204
54. Ueda K, Higashi N, Kume A, et al. Allergic contact dermatitis due to diclofenac and indomethacin. *Contact Dermatitis* 1998;39(6):323
55. Sanchez-Perez, J., Lopez, M. P., de Vega Haro, M. J. M., & Garcia-Diez, A. (2001). Allergic contact dermatitis from gentamicin in eyedrops, with cross-reactivity to kanamycin but not neomycin. *Contact Dermatitis*, 44(1), 47–48.
56. Flavia Monteagudo Paz A, Francisco Silvestre Salvador J, Latorre Marti´nez N, et al. Allergic contact dermatitis caused by azithromycin in an eye drop. *Contact Dermatitis* 2011;64(5):300-301
57. Baeck M, De Potter P, Goossens A. Allergic contact dermatitis following ocular use of corticosteroids. *J Ocul Pharmacol Ther* 2011;27(1):83-92
58. Zheng Y, Chaudhari PR, Maibach HI. Allergic contact dermatitis from ophthalmics. *Cutan Ocul Toxicol*. 2017 Dec;36(4):317-320.
59. Uter, W., Lessmann, H., Geier, J., & Schnuch, A. (2008). Is the irritant benzalkonium chloride a contact allergen? A contribution to the ongoing debate from a clinical perspective. *Contact Dermatitis*, 58(6), 359–363
60. Wentworth AB, Yiannias JA, Davis MD, Killian JM. Benzalkonium Chloride: A Known Irritant and Novel Allergen. *Dermatitis*. 2016 Jan-Feb;27(1):14-20.
61. Anderson D, Faltay B, Haller NA. Anaphylaxis with use of eye-drops containing benzalkonium chloride preservative. *Clin Exp Optom*. 2009 Sep;92(5):444-6.
62. Radić, Njegomir; Kukoč Modun, Lea. Uvod u analitičku kemiju, Zagreb: Školska knjiga, 2016
63. Sutlović D i sur. Plinska kromatografija-spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Tisak;2011;335-48
64. Sutlović D. Potvrđne metode analize. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak;2011;109-11.
65. Pine SH. Organska kemija. Zagreb: Školska knjiga;1994,1130-2.

66. Sutlović D. et al. Osnove forenzične toksikologije: Analiza bioloških uzoraka. Split: Redak; 2011.
67. Wu, Shubin & Lyu, Gaojin & Lou, Rui. (2012). Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis.
68. SRA instruments: Mass Hunter GC-MS Agilent Technologies , dostupno na poveznici: <https://www.srainstruments.com/p/gc-ms-5977b-agilent/>. Datum pristupa: 12.9.2021. godine
69. Kovács-Hadady K, Fábíán I. The determination of benzalkonium chloride in eye-drops by difference spectrophotometry. J Pharm Biomed Anal. 1998 Jan;16(5):733-40
70. AlAani H, AlNukkary Y. Determination of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solutions by Stability-Indicating HPLC Method: Application to a Stability Study. J App Pharm Sci, 2016; 6 (05): 080-089

## **8. SAŽETAK**

### **CILJEVI ISTRAŽIVANJA:**

Kvalitativna analiza sastava kapi za oči, usporedba rezultata s deklaracijama na ambalaži te određivanje moguće povezanosti prisustva pronađenih sastojaka s alergijskim reakcijama.

### **USTROJ ISTRAŽIVANJA:**

Eksperimentalna studija

### **MJESTO ISTRAŽIVANJA:**

Medicinski fakultet split - katedra za toksikologiju i farmakologiju i Sveučilišni odjel zdravstvenih studija - laboratorij kliničkih vještina i medicinsko laboratorijske dijagnostike

### **MATERIJALI I METODE:**

Ispitano je 7 uzoraka kapi za oči, od toga 4 u receptnom, a 3 u bezreceptnom režimu izdavanja. Za pripremu uzoraka za analizu korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak volumena 100  $\mu$ L. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala: kloroforma, etil acetata i N-heksana u jednakom omjeru (v/v/v= 1:1:1). Uzorci su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Uzorci u Petrijevim zdjelicama nekoliko su puta ispirani kloroformom kako bi se cijeli nanoseni sadržaj otopio. Nakon što su otopljeni uzorci filtrirani, preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu.

### **REZULTATI:**

Od 7 analiziranih uzoraka u samo 2 uzorka (uzorci 1 i 3) detektirana je prisutnost tragova nekih tvari- organskih otapala. U četiri analizirana uzorka na deklaraciji je kao konzervans naveden benzalkonijev klorid, međutim, BAK nije detektiran korištenom metodom. Ostali konzervansi koji prema literaturi izazivaju alergijske reakcije: parabeni, tiomersal i klorheksidin nisu navedeni u sastavu analiziranih kapi za oči, niti su detektirani korištenom metodom. Neomicin koji je naveden kao česti senzitizer, djelatna je tvar u uzorku 6, međutim nije pronađen korištenom GC-MS metodom. Ostali ranije navedeni uzročnici alergijskih reakcija u kapima za oči nisu navedeni na deklaracijama analiziranih uzoraka, niti su detektirani instrumentalnom analizom.

## **ZAKLJUČCI:**

Spojevi detektirani ovim istraživanjem mogu biti posljedica kontaminacije korištenih uzoraka prilikom izvođenja analize. Benzalkonijev klorid najčešći je alergen prisutan u kapima za oči, korištenom GC-MS metodom nije detektiran, međutim, to ne isključuje mogućnost da je bio prisutan već upućuje na to da korištena metoda vjerojatno nije dovoljno osjetljiva ili je njegova koncentracija bila niska. Najprikladnija metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje benzalkonijevog klorida u kapima za oči prema ranije navedenim istraživanjima bila bi HPLC. Ostali alergeni prisutni u kapima za oči nisu dovoljno istraženi, stoga je potrebno provođenje daljnjih istraživanja s prikladnim metodama.

## **9. SUMMARY**



**DIPLOMA THESIS TITLE:**

Eye drops: chemical composition and association with allergic reactions

**OBJECTIVES:**

Qualitative analysis of the composition of eye drops, comparison of results with declarations on packaging and determination of possible connection between presence of found ingredients and allergic reactions.

**DESIGN:**

Experimental study

**SETTINGS:**

University of Split School of Medicine- Department of Toxicology and Pharmacology and University Department of Health Studies - Laboratory of Clinical Skills and Medical Laboratory Diagnostics

**MATERIALS AND METHODS:**

In this study, 7 samples of eye drops were analyzed, of which 4 in prescripition and 3 in over-the-counter dispensing mode. In analysis preparation glass Petri dishes with a 100  $\mu\text{L}$  sample were used. Samples were extracted with a mixture of organic solvents: chloroform, ethyl acetate and N-hexane (v / v / v = 1: 1: 1). The samples were then placed in a fume hood for drying in a stream of air. Samples in Petri dishes were washed several times with chloroform to dissolve the entire content. After dissolution samples were filtered and transferred to glass cuvettes for GC-MS analysis.

**RESULTS:**

Out of 7 analyzed samples, in only 2 samples (samples 1 and 3) were detected traces of some substances - organic solvents. Benzalkonium chloride was mentioned as a preservative on the declaration in four analyzed samples, however, BAK was not detected by the method used. Other preservatives that according to the literature cause allergic reactions: parabens, thiomersal and

chlorhexidine are not listed in the composition of the analyzed eye drops, nor were they detected by the method used. Neomycin, which is listed as a common sensitizer, is the active substance in sample 6, but was not found by the GC-MS method used. Other previously mentioned causes of allergic reactions in eye drops are not listed on the declarations of the analyzed samples, nor were they detected by instrumental analysis.

#### **CONCLUSION:**

Compounds detected by this study may be due to contamination of the samples during analysis. Benzalkonium chloride is the most common allergen present in eye drops, the GC-MS method used did not detect it, however, this does not rule out the possibility that it was present but suggests that the method used was probably not sensitive enough or its concentration was low. The most appropriate method for the qualitative and quantitative determination of benzalkonium chloride in eye drops according to earlier mentioned studies would be HPLC. Other allergens present in eye drops have not been sufficiently investigated, therefore further researches are needed with appropriate methods.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Marijana Buljan

**Datum rođenja:** 16.11.1997.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Dračevac 56, 21000 Split

**e-mail:** [marijanabuljan123@gmail.com](mailto:marijanabuljan123@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

**2004. – 2012.** Osnovna škola „Vjekoslava Paraća“, Solin

**2012. – 2016.** Zdravstvena škola Split, smjer: farmaceutski tehničar

**2016. – 2021.** Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

**RADNO ISKUSTVO:**

**veljača 2021. - kolovoz 2021.** Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Solin

**POSEBNE VJEŠTINE:**

**Strani jezici:** engleski jezik

**Rad na računalu:** Microsoft office, Eskulap 2000

**Vozačka dozvola:** B kategorija