MIKROBIOLOŠKA ZAŠČITA FARMACEVTSKIH IZDELKOV

ANTIMICROBIAL PRESERVATION OF PHARMACEUTICALS

AVTORICI / AUTHORS:
doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.
izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: alenka.zvonar-pobirk@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov je eden izmed ključnih aspektov zagotavljanja kakovostnih, varnih in učinkovitih zdravil. Zaradi strogih standardov zagotavljanja kakovosti v farmacevtski industriji jo lahko dojemamo kot samoumevno. Pa vendar, kot smo izkusili v letu pandemije, ni nič samoumevno. V prispevku predstavljamo različne pristope mikrobiološke zaščite farmacevtskih izdelkov z glavnim poudarkom na konzervansih, ki ščitijo izdelek pred sekundarno mikrobiološko kontaminacijo med shranjevanjem, distribucijo in uporabo izdelka. Na primeru konzervansov, katerih varnostno vprašanje je bilo izpostavljeno v zadnjih letih in je v primeru benzilalkohola, benzalkonijevega klorida in benzojske kisline oz. benzoatov tudi vodilo v nedavno revizijo označevanja zdravil s strani Evropske agencije za zdravila, želimo skozi prispevek izpostaviti tudi potrebo po nenehnem skrbnem spremljanju in oceni varnostnega tveganja, zlasti za najranljivejšo pediatrično skupino bolnikov.

KLJUČNE BESEDE:
benzalkonijev klorid, benzilalkohol, konzervansi, mikrobiološka kakovost, parabeni

ABSTRACT

The microbiological quality of pharmaceutical products is one of the key aspects of ensuring quality, safety and effectiveness of medicines. Due to strict quality assurance standards in the pharmaceutical industry, it can be considered as self-evident. Yet, as we experienced in the year of the pandemic, nothing really is. This review presents various approaches to microbiological protection of pharmaceutical products with the main emphasis on preservatives posing protection from secondary microbiological contamination of products during their storage, distribution and usage. Finally, case studies of preservatives which safety concerns have been raised up in recent years, are presented. In the case of benzyl alcohol, benzalkonium chloride and benzoic acid/benzoates, it resulted in a recent revision of medicine labelling by the European Medicines Agency, which highlights the need for continuous careful monitoring and safety risk

1 UVOD

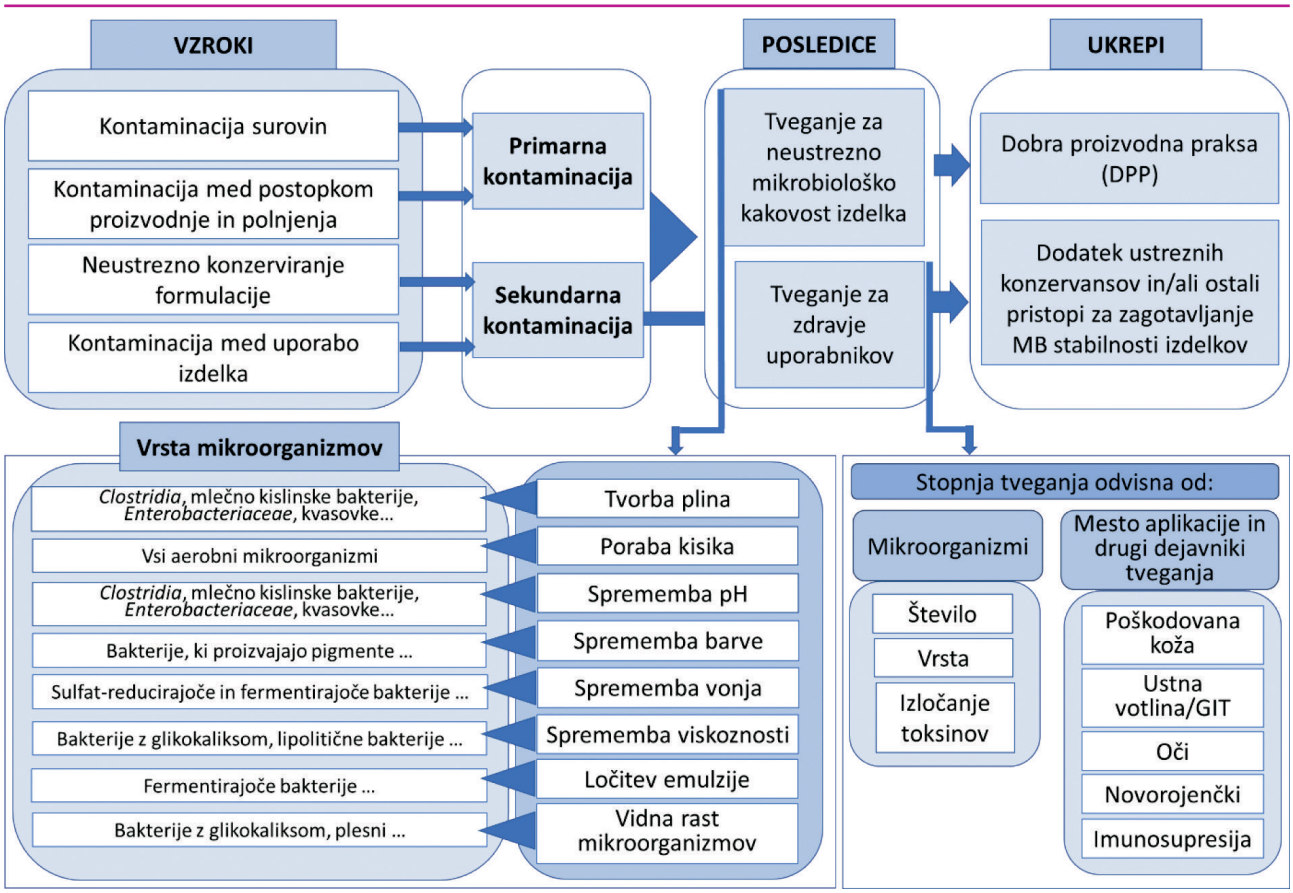
Mikrobiološka kakovost je bistveni del celokupne kakovosti vsakega farmacevtskega izdelka. Vanje jo »vgradimo« z upoštevanjem dobre proizvodne prakse (DPP) ter smernic, ki zagotavljajo ustrezno kakovost izdelkov tekom celotnega cikla zdravila, od izdelave do njegove uporabe. Predmet tega prispevka so nesterilne in sterilne farmacevtske oblike z vidika specifičnih zahtev glede mikrobiološke kakovosti in uporabe konzervansov. Kriteriji sprejemljivosti za **nesterilne farmacevtske oblike** se razlikujejo glede na način aplikacije zdravila in so podani v Evropski farmakopeji (Eur. Ph.) v poglavjih »Mikrobiološka kakovost nesterilnih farma-

assessment of preservatives and other excipients, especially for the most vulnerable paediatric group of patients.

KEY WORDS:
benzalkonium chloride, benzyl alcohol, microbiological quality, parabens, preservatives

cevtskih izdelkov in substanc za farmacevtsko uporabo« (5.1.4.) ter »Mikrobiološka kakovost zdravil rastlinskega izvora za peroralno uporabo in ekstraktov za njihovo izdelavo« (5.1.8.). Temeljijo na skupnem številu aerobnih mikroorganizmov in skupnem številu kvasovk in plesni ter odsotnosti specifičnih patogenov. **Sterilne farmacevtske oblike** (vključujoč parenteralne farmacevtske oblike, farmacevtske oblikeza oko in dermalne farmacevtske oblike za uporabo na hudo poškodovani koži) pa izdelujemo iz snovi in po postopkih, ki zagotavljajo sterilnost in preprečujejo vnos in rast kontaminantov v skladu z zahtevami v poglavju »Metode priprave sterilnih izdelkov« (5.1.1.) (1).

Do mikrobiološke kontaminacije izdelka lahko pride bodisi v fazi izbora sestavin, izdelave in polnjenja izdelka v primarno ovojnino (**primarna kontaminacija**) ali v času shranjevanja, transporta in uporabe (**sekundarna kontaminacija**) (slika 1). Ker je primarna kontaminacija izdelka posledica uporabe surovin neustrezne mikrobiološke kakovosti ali neustrezne proizvodne prakse, je ključno dosledno upoštevanje kriterijev sprejemljivosti za mikrobiološko kakovost substanc za farmacevtsko uporabo ter proizvodnja v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse. Do sekundarne kontaminacije pa pride zaradi kontaminacije in/ali razraščanja mikroorganizmov med shranjevanjem in distribucijo izdelka (npr. zaradi neustreznega konzerviranja/ovojnine) ali v času uporabe. Poznamo različne strategije zaščite izdelkov pred sekundarno kontami-



Slika 1: Vzroki in posledice kontaminacije izdelkov z mikroorganizmi (MO) ter možni ukrepi za zagotavljanje ustrezne mikrobiološke (MB) kakovosti; prirejeno po (2).

Figure 1: Causes, consequences and ways of preventing microbial contamination; adapted from (2).

nacijo. Medtem ko pri **fizikalnem pristopu** omejimo mikrobiološko kontaminacijo v izdelku z izbiro ustrezne ovojnine (npr. zrakotesno zaprti vsebniki z aplikatorjem), pri **fizikalno-kemijskem pristopu** zagotovimo vzpostavitev pogojev, ki so neugodni za preživetje mikroorganizmov. **Kemijski pristop** pa vključuje uporabo konzervansov kot pomožnih snovi, ki preprečujejo rast mikroorganizmov pri normalnih pogojih shranjevanja in uporabe (2, 3).

2 FIZIKALNO-KEMIJSKI PRISTOP MIKROBIOLOŠKE ZAŠČITE

Poleg razpoložljivih hranil sta za rast mikroorganizmov nujni tudi ustrezna temperatura in vsebnost vlage. Fizikalno-kemijski pristop v veliki meri temelji na **znižanju aktivnosti vode** v izdelku. Z aktivnostjo vode (a_w) opišemo vsebnost t. i. proste (*bulk*) vode in se razlikuje od celokupne vsebnosti vode, ki poleg proste vključuje tudi vezano vodo. Ker je mikroorganizmom razpoložljiva le prosta voda, poznavanje a_w nesterilnih formulacij poda pomembno informacijo o dovzetnosti izdelka za sekundarno mikrobiološko kontaminacijo. a_w opisuje enačba:

$$a_w = P/P_0 = n_1/(n_1 + n_2),$$

pri čemer so P delni tlak vodne pare nad izbranim izdelkom in P_0 delni tlak vodne pare nad čisto vodo pri enaki temperaturi, n_1 moli topila (vode) in n_2 moli topljenca.
Znano je, da različni mikroorganizmi za svojo rast potrebujejo različne količine proste vode. Na osnovi poznavanja a_w izdelka in potrebne minimalne a_w za rast posameznih mikroorganizmov (preglednica 1) lahko bolje načrtujemo ustrezno mikrobiološko zaščito izdelka tako s pristopi za znižanje a_w kot tudi z izbiro konzervansa, ki je prilagojena najverjetnejšim kontaminantom izdelka. V formulaciji lahko znižamo a_w z vključitvijo pomožnih snovi, ki vežejo vodo (npr. hidrofilni polimeri, sotopila in soli) ali povečajo osmolarnost izdelka (npr. sladkorji). Tako pri sirupih visoka vsebnost sladkorjev bistveno zmanjša a_w in s tem tudi potrebno koncentracijo konzervansa, ki mora izdelek zaščititi predvsem pred osmotolerantnimi kvasovkami. Določene farmacevtske oblike, kot so praški, tablete, svečke in mazila, pa že v osnovi izkazujejo zelo nizko a_w (tj. < 0,6) (4, 5).
Na rast mikroorganizmov v formulaciji vpliva tudi **tip emulzije.** Zaradi prisotnosti vode v notranji fazi so emulzije tipa V/O manj dovzetne za kontaminacijo kot emulzije tipa O/V. K boljši mikrobiološki stabilnosti pripomore tudi velikost kapljic, zato so nanoemulzije v prednosti pred klasičnimi emulzijami. Na zaščito izdelka lahko ugodno vpliva tudi sestava oljne faze (npr. z večjo vsebnostjo fenolnih spojih). Tako tekoče emulzije kot tudi poltrdne emulzijske gele (tj. kreme) obeh tipov dodatno zaščitimo s konzervansi; izjema so sterilne formulacije, napolnjene v zrakotesnih vsebnikih (pogosto z zaporko z aplikatorjem) (2, 3).
Na mikrobiološko odpornost pomembno vpliva tudi pH formulacije. Ker je optimalna vrednost pH za proliferacijo glavnine mikroorganizmov med 5 in 8, predstavljajo izdelki z višjim ali nižjim pH manj ugodno okolje za njihovo rast in razmnoževanje. To še zlasti velja za formulacije s pH pod 3 ali nad 9; pri pH pod 3 lahko rastejo le nekatere odporne plesni. pH vrednost izdelka pa pomembno vpliva tudi na izbiro ustreznega konzervansa, tako z vidika njegove učinkovitosti kot tudi stabilnosti, kot predstavljamo v nadaljevanju (6, 7).

Preglednica 1: Aktivnosti vode (aw), pri kateri so določeni mikroorganizmi sposobni preživetja; povzeto po (3).
Table 1: Proliferation ability of microorganisms in correlation to water activity (aw); adapted from (3).

a_w	Mikroorganizmi, zmožni proliferacije
0,96–0,99	G^+ in G^- bakterije (npr. *Pseudomonas* species), kvasovke in plesni
0,90–0,95	Nekatere G^- in večina G^+ bakterij (npr. *Enterobacter aerogenes*, *Echericchia coli*, *Bacillus* species), kvasovke (npr. *Saccharomyces cerevisiae*) in plesni
0,80–0,89	G^+ bakterije (npr. *Staphylococcus aureus*), kvasovke in plesni
0,70–0,79	Halofilne bakterije (npr. *Halobacterium halobium*), kvasovke in plesni (npr. *Aspergillus niger*)
0,62–0,69	Osmotolerantne kvasovke (npr. *Zygosaccharomyces rouxii*)
pod 0,60	/

G^+ – po Gramu pozitivne bakterije, G^- – po Gramu negativne bakterije

3 KEMIJSKI PRISTOP MIKROBIOLOŠKE ZAŠČITE

Konzervansi so pomožne snovi, ki v izdelku preprečijo rast mikroorganizmov v času roka njihove uporabe, tudi po odprtju. Njihova uporaba je nujna v večodmernih tekočih in poltrdnih izdelkih. Čeprav mikroorganizmi za svoje razmnoževanje potrebujejo vodo, je potrebno ustrezno zaščiti tudi lipidne in trdne formulacije, saj se lahko v slednjih tvorijo področja s prosto vodo, ki omogočajo njihovo rast in razmnoževanje (npr. mikrobiološko kvarjenje mazil in različnih stikov). Vsi konzervansi in njihove koncentracije, dovoljene za uporabo v farmaciji, so navedeni v *Handbook of Pharmaceutical Excipients* in Eur. Ph. Dodatek konzervansov nikoli ne sme nadomestiti postopkov dobre proizvodne prakse, niti jih ne smemo dodajati z namenom, da bi preprečili razraščanje mikroorganizmov v že kontaminiranih surovinah ali izdelkih. Glede na **mehanizem delovanja** (preglednica 2) ločimo konzervanse, ki poškodujejo celično steno in/ali membrano, s čimer vplivajo na permeabilnost in aktivnost (trans)membranskih encimov in ovirajo transport vode in hranilnih snovi. Tretja tarča je citoplazma mikroorganizmov, kjer nekateri konzervansi povzročijo denaturacijo proteinov in encimov ali strukturne spremembe pomembnih komponent celic, zavirajo celični metabolizem ali poškodujejo DNK oz. RNK. Pogosto je težko predvideti točno mesto delovanja konzervansov, saj je slednje odvisno tudi od uporabljene koncentracije (6, 8).

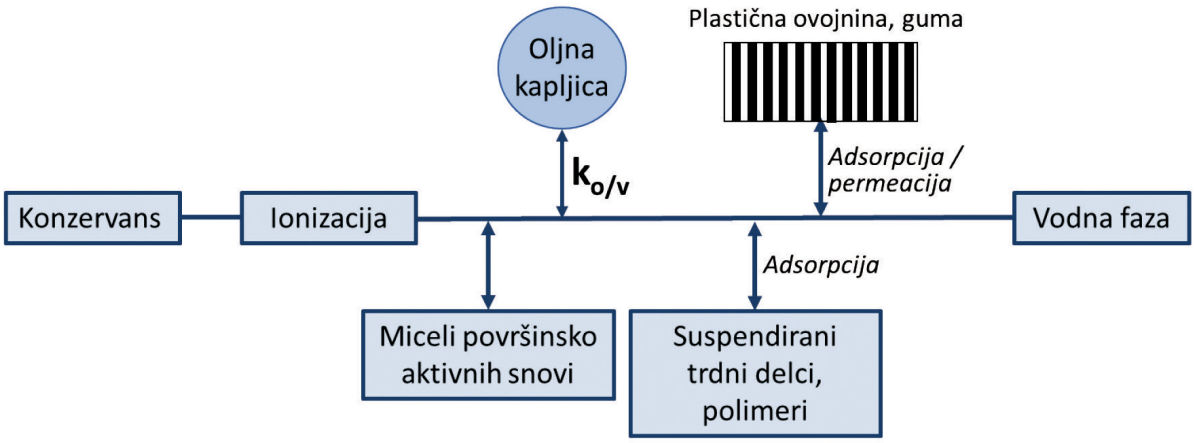
Pri izbiri primernega konzervansa moramo upoštevati tako vrsto farmacevtske oblike kot način aplikacije zdravila (preglednica 3) in starost bolnika. Ker idealen konzervans ne obstaja, v praksi izbiramo takšne, ki imajo čim več naslednjih lastnosti: 1) delovanje pri čim nižji koncentraciji (pri kateri mora biti tudi netoksičen in nealergen), 2) definirano kemijsko zgradbo, 3) širok spekter delovanja, 4) učinkovitost v širokem pH območju, 5) ustrezno stabilnost (tudi pri povišani temperaturi, na svetlobi, pri različnih vrednostih pH, ki jim je lahko izpostavljen med izdelavo, shranjevanjem in uporabo izdelka), 6) primerno vodotopnost in porazdelitveni koeficient, ki omogoča, da ostane prednostno porazdeljen v vodni fazi, 7) kompatibilnost z drugimi sestavinami izdelka in ovojnino, 8) v primeru (per)oralne in nazalne aplikacije pa so pomembne tudi ustrezne organoleptične lastnosti (okus, vonj) (7, 9).

Večina konzervansov le delno ustreza navedenim kriterijem, zato pogosto uporabljamo kombinacije konzervansov oz. konzervansov in drugih sestavin s sinergističnim delovanjem, kar nam omogoča uporabo nižje koncentracije posameznega konzervansa. Učinek slednjih podpirajo npr. kelatorji kovinskih ionov, nekatera topila, higroskopne spojine, zdravilne učinkovine in eterična olja. V praksi pogosto kombiniramo metil- in propilparaben, saj je protimikrobna aktivnost parabenov obratno sorazmerna z vodotopnostjo in narašča z daljšanjem alkilne verige (butil > propil > etil > metil). Veliko se uporablja tudi kombinacija parabenov in EDTA (7, 10, 11).

Pri izbiri konzervansa moramo upoštevati tudi morebitne inkompatibilnosti s sestavinami formulacije (npr. površinsko aktivnimi snovmi) in izbrano ovojnino (možnost adsorpcije konzervansa na nekatere umetne mase in gumijaste zaporke) (preglednica 3). Dodaten izziv predstavlja konzerviranje večfaznih sistemov zaradi **porazdeljevanja konzervansa** med oljno in vodno fazo v skladu z njegovim porazdelitvenim koeficientom (v primeru emulzijskih sistemov) oz. možnosti **adsorpcije konzervansa na trdne**

Preglednica 2: Mesto delovanja izbranih konzervansov v mikrobni celici; povzeto po (8).
Table 2: Site of selected preservatives' activity in microbial cell; adapted from (8).

Celična stena	Citoplazemska membrana	Citoplazma
Fenoli	2-fenoksietanol	2-fenoksietanol in drugi organski alkoholi
Alifatske in aromatske karboksilne kisline	parabeni	alifatske in aromatske karboksilne kisline
Organske živosrebrove spojine	organske živosrebrove spojine	halogenirani konzervansi
EDTA	EDTA	/
Klorheksidin, cetrimid	klorheksidin, heksaklorofen	klorheksidin (visoke koncentracije)
Glutaraldehid	spojine, ki sproščajo formaldehid (npr. bronopol, imidurea)	spojine, ki sproščajo formaldehid (npr. bronopol, imidurea)
Anionske površinsko aktivne snovi	benzalkonijev klorid	/



Slika 2: Koncentracija molekule konzervansa v vodni fazi formulacije je odvisna od stopnje ionizacije molekule, porazdeljevanja v oljno fazo ali micele površinsko aktivnih snovi, možna je tudi adsorpcija na suspendirane delce ter adsorpcija/permeacija v plastične zaporke. Prirejeno po (12).

Figure 2: The concentration of active form of preservative molecules in an aqueous phase of formulations depends on the state of ionisation of the molecule, partitioning into oil droplets or surfactant micelles, as well as adsorption onto suspended solids or adsorption/permeation of plastic closures. Adapted from (12).

delce (v primeru suspenzij) ali **polimere,** ki se uporabljajo kot zgoščevala. Na porazdeljevanje v oljno fazo moramo biti pozorni npr. pri bolj lipofilnih analogih parabenov (propil- in butilparaben), medtem ko je za klorheksidin značilno porazdeljevanje v micele in adsorpcija na polimerna suspendirajoča sredstva. Oboje vodi v znižanje koncentracije konzervansa v vodni fazi, zato je potrebno ustrezno povečati njegovo koncentracijo v formulaciji (slika 2) (7, 9).

Od pH formulacije ni odvisna le rast mikroorganizmov, ampak tudi interakcije konzervansov s komponentami njihove celične stene in s tem minimalna inhibitorna koncentracija konzervansa. Učinkovitost slednjih je najboljša, ko je pH formulacije znotraj pH območja njihove optimalne aktivnosti (preglednica 3). Od pH odvisna aktivnost je povezana s kemijsko strukturo konzervansov. Kadar so slednji aktivni v neionizirani obliki (npr. kisline, alkoholi ali fenoli), je njihova učinkovitost najboljša, ko je $pH_{(formulacije)} \leq pKa_{(konzervansa)}$. Vpliv pH na aktivnost konzervansov je sicer kompleksen, saj je protibakterijsko delovanje benzojske pa tudi propionske in sorbinske kisline veliko bolj odvisno od pH kot njihova aktivnost proti glivam, ki je ohranjena tudi pri višjih vrednostih pH (2, 6, 7).

3.1 VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

Za vse konzervirane farmacevtske izdelke moramo dokazati upravičenost uporabe in učinkovitost izbranih konzervansov s farmakopejskim preskusom »Učinkovitost konzervansov« (5.1.3), s katerim vrednotimo celokupno protimikrobno zaščito izdelka (1). K slednji skupno prispevajo značilnosti formulacije, vgrajeni konzervansi in primarna ovojnina. Osnovni princip testa je **masovna** in **namerna** inokulacija izdelka (najbolje v originalnem vsebniku) s standardnimi mikroorganizmi ter spremljanje njihovega števila skozi predpisano časovno obdobje. Protimikrobna zaščita je ustrezna, v kolikor pride po inokulaciji do značilnega (in trajnega) zmanjšanja števila mikroorganizmov.

Eur. Ph. definira inokulacijo testiranih izdelkov s *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans* ter *Aspergillus brasiliensis* do končnega inokuluma 10^5 (v primeru gliv) oz. 10^6 (v primeru bakterij) kolonizirajočih enot (CFU) na ml oz. g izdelka. Dodatno lahko uporabimo tudi verjetne kontaminante kot *Escherichia coli* za peroralne formuacije ter *Zygosaccharomyces rouxii* za peroralne farmacevtske oblike z visoko koncentracijo sladkorja (sirupe). Količina dodane suspenzije mikroorganizmov pri tem ne sme presegati 1 % volumna izdelka, s čimer se izognemo redčenju izdelka oz. konzervansa. Inokulirano formulacijo shranjujemo zaščiteno pred svetlobo pri 20 do 25 °C in glede na vrsto izdelka spremljamo število mikroorganizmov v časovnem intervalu 0 do 28 dni. Kot rezultat podamo logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov (CFU/ml) glede na začetni inokulum, ki mora glede na zahtevano stopnjo mikrobiološke zaščite farmacevtskih izdelkov ustrezati kriteriju A ali B. Kriterij A izraža priporočljivo

Preglednica 3: Skupine pogosto uporabljanih konzervansov za različne načine aplikacije s pH-območji, pri katerih so optimalno aktivni, ter nekaterimi substrati oz. adsorbenti, ki jih lahko deaktivirajo. Povzeto po (6–8).
Table 3: Common preservatives for pharmaceutical products: pH of optimum activity plus some adsorbents/substrates playing a part in their inactivation. Adapted from (6–8).

Način aplikacije	Konzervans	Kemijska skupina	pH	Adsorbent / substrat
(Per)oralno	Metil-, etil-, propilparaben (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatere plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Na-benzoat in benzojska kislina	aromatska karboksilna kislina	≤ 4,5	kaolin
	Sorbinska kislina, K-sorbat propionska kislina	alifatske karboksilne kisline	4,5 3,9	polipropilen (PP), PVC, polietilen (PE)
	Metilparaben + Na-benzoat (kombinacija)		-	
Dermalno (vključno z nazalno)	Benzalkonijev klorid, cetrimonijev bromid, benzetonijev klorid, alkiltrimetilamonijev klorid (tudi v kombinaciji z EDTA)	kvarterne amonijeve spojine; kelator kovinskih ionov	4–10	HPMC
	Metil-, etil-, propil-, butilparabeni (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatere plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Benzilalkohol, cetil- in stearilalkohol	aromatski in alifatski alkoholi	≤ 5	PE, guma
	Benzojska kislina, sorbinska kislina	aromatske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Kloroacetamid, triklorokarban	alifatski in aromatski amidi	-	
	Tiomersal	organske živosrebrove spojine	Kisel pH	PE/druge plastike, guma
	Imidurea, bronopol	spojine, ki sproščajo formaldehid	3–9 5–8	
	Klorheksidin	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Klorkrezol, klorooksilenol, diklorofen, heksaklorofen 2-fenoksietanol	fenoli	4–9 3–10	PVC, celulozni derivati
Parenteralno (vključno s cepivi)	Benzilalkohol, 2-etoksietanol, klorobutanol	aromatski in alifatski alkoholi	≤ 5	PE, gumaPE
	Metil-, etil-, propil-, butilparaben (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatere plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Benzojska kislina, sorbinska kislina	aromatske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Klorheksidin	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Fenol, m-krezol, 2-fenoksietanol	fenoli	4–9 3–10	PVC, celulozni derivati
	Tiomersal, fenil živosrebrove soli	organske živosrebrove spojine	kisel pH 5–8	PE/druge plastike, gumarazlična suspendirajoča sredstva

Okularno	Kvarterne amonijeve spojine (benzalkonijev klorid in druge); tudi v kombinaciji z EDTA	kvarterne amonijeve spojine; kelator kovinskih ionov	4–10	HPMC
	2-fenoksietanol	fenoli	3–10	PVC, celulozni derivati
	Tiomersal, fenil živosrebrove soli	organske živosrebrove spojine	kisel pH 5–8	PE/druge plastike, gumarazlična suspendirajoča sredstva
	Benzojska kislina, Na-benzoat, sorbinska kislina, K-sorbat	aromatske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Klorheksidin, poliaminoproilbigvanid, poliheksametilbigvanid	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Imidurea	spojine, ki sproščajo formaldehid	3–9	

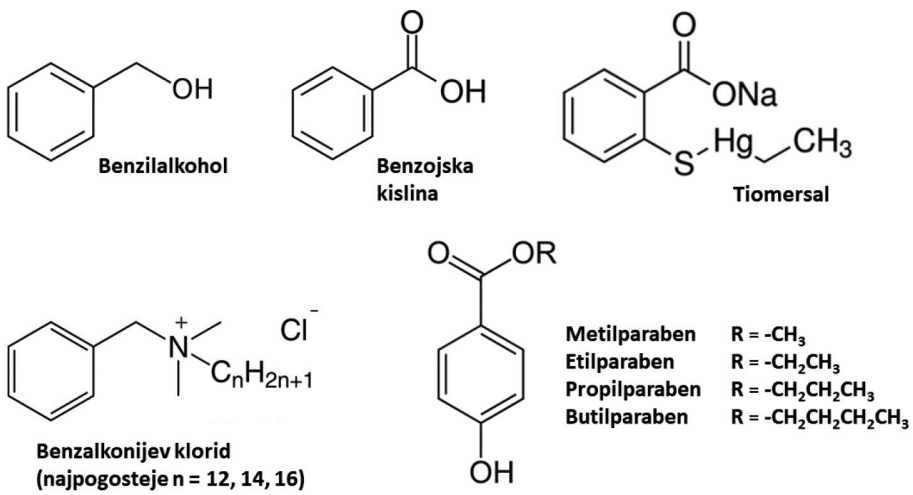
učinkovitost, ki jo je potrebno doseči. V utemeljenih primerih, kjer kriterija A ne moremo doseči (na primer zaradi večje možnost neželenih reakcij), pa mora biti izpolnjen kriterij B (1).

4 PRIMERI UPORABE IN OZNAČEVANJE DOLOČENIH KONZERVANSOV V ZDRAVILIH

V l. 2017 je EMA revidirala navodila za označevanje zdravil v povezavi z nekaterimi pogosto uporabljanimi pomožnimi snovmi, s posebnim poudarkom na njihovem varnostnem profilu, zlasti za pediatrično populacijo (13). Podrobneje je proučila tudi konzervanse, in sicer benzilalkohol, benzalkonijev klorid in benzojsko kislino oz. benzoate, ki so ob tiomersalu in parabenih (slika 3) tudi sicer pod drobnogledom zaradi potencialnih škodljivih učinkov na zdravje.

4.1 BENZILALKOHOL IN TIOMERSAL V VEČODMERNIH PARENTERALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

Poseben izziv za konzerviranje predstavljajo večodmerne vodne parenteralne farmacevtske oblike, ki morajo zaradi možnosti kontaminacije med večkratnim odvzemom nujno



Slika 3: Kemijske strukture izbranih konzervansov.
Figure 3: Chemical strukture of selected preservatives.

vsebovati konzervans (razen če sama farmacevtska oblika izkazuje ustrezne protimikrobne lastnosti). Parenteralne farmacevtske oblike s klasičnimi zdravilnimi učinkovinami, t. i. majhnimi molekulami, so najpogosteje konzervirane z benzilkoholom ali kombinacijo metil- in propilparabena (razmerje 9 : 1 do skupno 0,2 %), pogosto se uporabljajo tudi fenol, klorbutanol, m-krezol, fenoksietanol ter tiomersal, večinoma v zelo nizkih koncentracijah od 0,002 do 1 % (14–16). Konzerviranje parenteralnih farmacevtskih oblik s proteinskimi učinkovinami, vključujoč monoklonska protitelesa, pa je zlasti zahtevno zaradi možnih interakcij s konzervansom, ki lahko vodijo v fizikalno nestabilnost ali oksidacijo proteinske molekule. To je problematično tako z vidika učinkovitosti kot dolgoročne (ne)stabilnosti. Zaradi specifičnih lastnosti so ti pripravki v obliki liofilizatov, kjer je v primeru večodmernih farmacevtskih oblik konzervans (najpogosteje m-krezol, fenol, benzilalkohol ali benzalkonijev klorid) dodan v medij za rekonstitucijo (17).

Benzilalkohol v parenteralnih farmacevtskih oblikah klasično uporabljamo v koncentraciji 0,5 do 2 %, v parenteralnih proteinskih pripravkih pa od 0,9 do 1,1 % (14). Deluje tudi kot lokalni anestetik, zaradi česar je intramuskularna aplikacija manj boleča. Dodajamo ga tudi v peroralne farmacevtske oblike (do 2 %) in kozmetične izdelke (do 1 %). Učinkovit je proti večini po Gramu pozitivnih bakterij, kvasovk in plesni, manj pa proti po Gramu negativnim bakterijam. Izrazito problematičen je za nedonošenčke in novorojenčke po intravenski aplikaciji. Zaradi še nerazvitega encimskega sistema pride do akumulacije benzilalkohola in njegovega metabolita benzojske kisline, ki ob sočasni metabolni acidozi vodi v življenje ogrožajoče stanje z značilnim »sindromom lovljenja sape« (*gasping syndrome*), hudimi nevrološkimi in hematološkimi motnjami ter odpovedjo srca (18). Upoštevaje nove smernice EMA za označevanje morajo zato navodila za uporabo tako za zdravila za parenteralno pa tudi peroralno dostavo vsebovati opozorilo, da je/se benzilalkohol 1) povezan z nevarnostjo pojava resnih neželenih učinkov, vključujoč »sindrom lovljenja sape«, pri mlajših otrocih; 2) ne uporablja pri novorojenčkih do četrtega tedna starosti, razen po navodilu zdravnika; 3) ne uporablja več kot en teden pri otrocih do tretjega leta starosti, razen po navodilu zdravnika ali farmacevta ter 4) morajo nosečnice in doječe matere ter bolniki z boleznimi ledvic ali jeter posvetovati z zdravnikom ali farmacevtom o uporabi zaradi možnosti akumulacije v telesu in nastanka metabolne acidoze (19).

Tiomersal v cepivih je še vedno aktualna tema, tako kot varnost cepiv v celoti, ki še zlasti v luči trenutne epidemiološke situacije zaradi covid-19 le pridobiva na razsežnosti. Tiomersal je tako še vedno tema različnih polemik, čeprav njegove morebitne vpletenosti v povečano pojavnost avtizma in ostalih razvojnih motenj niso dokazali v nobeni izmed raziskav, izvedenih s tiomersalom v koncentracijah, ki se uporabljajo v cepivih (20, 21). Metil živo srebro (metil Hg), s katerim najpogosteje pridemo v stik z morsko hrano (npr. tunino), je dejansko nevrotoksična oblika organskega Hg, zlasti za nerojene in majhne otroke. Svetovna zdravstvena organizacija je zato določila zgornjo varno vrednost za dnevno izpostavitev metil Hg, ki je za majhne otroke, nosečnice, doječe matere in ženske v rodni dobi še bistveno nižja v primerjavi s povprečnim odraslim; v obeh primerih pa so upoštevani veliki varnostni faktorji. Navedene vrednosti se upoštevajo tudi za tiomersal, ki je skupaj s svojim metabolitom etil Hg sicer veliko manj toksičen kot metil Hg. Za razliko od slednjega, ki se nalaga v telesu, je za etil Hg značilna zelo hitra eliminacija. Kljub temu so iz previdnostnih razlogov na začetku 21. stoletja v ZDA umaknili tiomersal iz večine cepiv, čemur je sledila tudi Evropa. Po trenutno dostopnih podatkih v Sloveniji dostopna cepiva ne vsebujejo tiomersala (22).

4.2 BENZALKONIJEV KLORID V PRIPRAVKIH ZA OKO

Za konzerviranje pripravkov za oko priporočajo različne konzervanse (preglednica 3). Po razširjenosti močno izstopa **benzalkonijev klorid**, ki se uporablja že od l. 1950 in je zaradi visoke učinkovitosti, ustreznega varnostnega profila in nizke alergenosti prisoten v treh četrtinah izdelkov. V vlogi konzervansa ga pogosto najdemo tudi v vodnih pripravkih za inhaliranje ali aplikacijo v nos, redko pa v farmacevtskih oblikah za druge poti vnosa (23). Kot konzervans se uporablja v koncentracijah 0,004 do 0,025 %. Deluje fungicidno ter baktericidno predvsem na po Gramu pozitivne bakterije, medtem ko se aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam ojača v kombinaciji z EDTA (0,1 %). Zaradi dolge zgodovine uporabe so dobro raziskani tudi neželeni učinki po nanosu benzalkonijevega klorida, predvsem v povezavi s kapljicami za zdravljenje glavkoma in uporabo umetnih solz za blaženje sindroma suhega očesa, kjer kronična in progresivna narava obeh bolezni zahteva večletno uporabo pripravkov za oko. V obširnih kliničnih raziskavah so potrdili koncentracijsko in časovno odvisne neželene učinke benzalkonijevega klorida na površino očesa, ki se odražajo v paleti kliničnih znakov, od občutka povečanega nelagodja, suhega očesa, ostrega, bolečega ali srbečega občutka in zmanjšane tvorbe ter obstojnosti solznega filma do vnetnih sprememb. Ker lahko slednji

zelo poslabšajo sodelovanje bolnikov, so zaželene formulacije s podaljšanim delovanjem, ki močno zmanjšajo izpostavljenost očesa benzalkonijevemu kloridu in omilijo navedene sopojave. Nasprotno pa njegova uporaba ni problematična pri kratkotrajni uporabi, kot je v primeru zdravljenja vnetij ali infekcij (24–26).

Težave, ki lahko spremljajo dolgotrajno uporabo benzalkonijevega klorida v pripravkih za oko, so obšli z enoodmernimi farmacevtskimi oblikami za oko. Slednje imajo izboljšan varnostni profil, a so tudi neprimerljivo dražje (za faktor 5–10) in v primerjavi z večodmernimi konzerviranimi farmacevtskimi oblikami tudi bolj obremenjujejo okolje. Vsebnik vsebuje 0,1 do 1 ml tekočine in naj bi ga po aplikaciji ene do dveh kapljic v posamezno oko ali obe očesi zavrgli skupaj z zaostalo tekočino. V praksi jih ljudje zelo pogosto uporabljajo, dokler ne zmanjka vsebine, kar predstavlja visoko mikrobiološko tveganje. Omeniti velja tudi oteženo rokovanje z enoodernimi vsebniki pri starejših ali ljudeh z zmanjšano fino motoriko (npr. nerodno odpiranje pokrovčka ter težavno stiskanje vsebnika zaradi trše plastike). Alternativo slednjim predstavljajo inovativni večodmerni vsebniki, ki med uporabo zagotavljajo sterilnost vsebine s pomočjo tehnoloških rešitev, ki vključujejo bifunkcionalno membrano s protimikrobnimi lastnostmi, globinski filter ali posebni enosmerni ventil, ki preprečuje vstop mikroorganizmov v notranjost vsebnika po odprtju (26). Zanimivo inovacijo namenjeno konzerviranim kapljicam pa predstavljajo vsebniki s filtri, na katere se konzervans med aplikacijo adsorbira in tako ne pride v stik z očesno sluznico (24).

V večodmernih kapljicah za oko uporabljamo tudi alternativne konzervanse, vendar je nabor relativno majhen zaradi zahtevanih visoke protimikrobne učinkovitosti in netoksičnosti (26). Glede na mehanizem delovanja v osnovi ločimo dve skupini:

a) Oksidirajoči konzervansi, ki oksidirajo posamezne komponente mikroorganizmov in vplivajo na sintezo njihovih proteinov. Po aplikaciji se pod vplivom svetlobe ali v stiku s solzno tekočino razgradijo ne neškodljive produkte. V uporabi so natrijev perborat (GenAqua®, Dequest®), stabiliziran oksiklorokompleks (Purite®, OcuPure®) ter Sofzia®, ki je pufrna raztopina cinkovega klorida, borata, propilen glikola in sorbitola. Natrijev perborat je eden izmed prvih oksidirajočih konzervansov in v skladu z idejo »*disappearing*« konzervansov ob stiku z vodo tvori vodikov peroksid, ki ga v očesni sluznici prisotne katalaze razgradijo na kisik in vodo. Stabiliziran oksiklorokompleks v raztopini tvori radikale klorovega dioksida, po aplikaciji na oko pa se pod vplivom svetlobe razgradi v natrijev klorid, kisik in vodo. Sicer maloštevilne raziskave potrjujejo značilno manj izražene neželene učinke na očesno površino v primerjavi z benzalkonijevim kloridom (26).

b) Polikvarternij-I (polyquaternium-I, Polyquad®) kot konzervans v tekočinah za leče uporabljamo že več kot 30 let in številne raziskave potrjujejo njegovo učinkovitost ter biokompatibilnost. Čeprav je kvarterna amonijeva spojina, ima v primerjavi z benzalkonijevim kloridom značilno manj izražene neželene učinke na očesni površini. Polikation polikvarternij-I je namreč polimer in kot tak bistveno večja molekula z manjšo sposobnostjo penetracije v tkiva (26, 27).

Zadnje izdano mnenje EMA z leta 2009 glede uporabe konzervansov v pripravkih za oko sicer ne podaja splošnega priporočila o odsotnosti konzervansov, poudarja pa smotrnost uporabe pripravkov brez konzervansov v primeru dolgotrajne terapije ali za ljudi, ki so nanje občutljivi. Nekonzervirane farmacevtske oblike za oko EMA močno priporoča za uporabo pri otrocih, zlasti novorojenčkih. Konzervansi se morajo uporabljati v najnižji učinkoviti koncentraciji glede na rezultat preskusa »Učinkovitost konzervansov«, izogibati pa se je potrebno Hg spojinam (npr. tiomersalu), tudi z vidika zmanjševanja izpostavljenosti okolja Hg (28). Upoštevaje aktualne smernice EMA je potrebno v primeru zdravil za oči, ki vsebujejo benzalkonijev klorid, označiti, da 1) se le-ta lahko absorbira v mehke leče in jih obarva; 2) je potrebno pred aplikacijo zdravila leče odstraniti in jih ponovno vstaviti po 15 minutah; 3) benzalkonijev klorid lahko povzroči draženje oči, zlasti v primeru sindroma suhega očesa ali težav z roženico. V primeru izrazitega neugodja, zbadanja ali bolečine po uporabi zdravila se je potrebno posvetovati z zdravnikom (29).

4.3 BENZOJSKA KISLINA IN BENZOATI V PERORALNIH, PARENTERALNIH IN DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

Za konserviranje navedenih farmacevtskih oblik se benzojska kislina in predvsem njene K- ali Na-soli (benzoati) uporabljajo v koncentraciji 0,01 do 0,2 %. Glavno varnostno vprašanje se nanaša na njeno sposobnost sproščanja bilirubina z albumina, varnostno tveganje pa je veliko zlasti za novorojenčke, kar je tudi vodilo v revizijo navodil. Fiziološka zlatenica je pogost pojav pri novorojenčkih, prevelike koncentracije nevezanega oz. prostega bilirubina v serumu pa delujejo nevrotoksično in lahko povzročijo okvaro osrednjega živčevja (kernikterus). Tveganje je povezano tako s

peroralno, parenteralno kot tudi dermalno aplikacijo (obseg dermalne absorpcije benzojske kisline je pri novorojenčkih zelo velik) ter tudi s sočasno aplikacijo benzilalkohola, ki se metabolizira do benzojske kisline. Na navodilih za uporabo zdravil za opisane poti aplikacije je zato potrebno označiti, da lahko benzojska kislina povzroči zlatenico (prepoznavno po rumenem obarvanju kože in oči) pri dojenčkih do četrtega tedna starosti. V primeru dermatikov je zahtevana še navedba dodatnega opozorila o možnosti lokalnega draženja (30).

4.4 PARABENI V PERORALNIH IN DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

Parabeni so estri parahidroksibenzojske kisline in njihove natrijeve soli in so zadnjih 80 let eni najpogosteje uporabljanih konzervansov v hrani, kozmetičnih in farmacevtskih izdelkih, ki jih učinkovito zaščitijo proti kvasovkam in plesnim, manj pa proti po Gramu negativnim bakterijam. Medtem ko se po peroralni aplikaciji zelo hitro absorbirajo in metabolizirajo v jetrih ter izločijo z urinom, se po dermalnem nanosu absorbirajo le v manjšem obsegu (za izračun meje varnosti se upošteva 3,7-odstotna dermalna absorpcija). Ker hidroliza do parahidroksibenzojske kisline v koži ni popolna, jih zaradi možnega estrogenega delovanja ne moremo obravnavati kot popolnoma varne spojine. V EU tako sistematično zbiramo in proučujemo podatke o njihovi varnosti, s čimer je povezano tudi redno posodabljanje predpisov, ki urejajo njihovo uporabo v različnih izdelkih, ki smo jim pogosto sočasno izpostavljeni. Z namenom doseganja sinergističnega učinka in s tem čim nižje vsebnosti konzervansov v izdelkih pogosto uporabljamo kombinacijo metil- in propilparabena. V farmaciji je najbolj razširjena v peroralnih farmacevtskih oblikah, kjer je njuna vsebnost največkrat 0,015 do 0,2 % (metilparaben) oz. 0,02 do 0,06 % (propilparaben) (31). EMA sicer maksimalno dovoljeno koncentracijo propilparabena omejuje na 100 mg/kg/dan. Etilparben in butilparaben se manj uporabljata, slednji predvsem v dermalnih pripravkih.

Parabeni imajo dolgo zgodovino uporabe tudi v kozmetični industriji, kjer so jih povezovali zgolj z možnostjo pojava alergijskih reakcij. Odkar je bila l. 2004 v reviji *Journal of Applied Toxicology* objavljena raziskava, v kateri so poročali o povečani vsebnosti parabenov v tumorjih dojk onkoloških bolnic, v strokovni in širši javnosti poteka intenzivna diskusija o varnosti njihove uporabe v kozmetičnih izdelkih (za pod pazduho) in tveganjem za razvoj raka dojk. Čeprav sta tudi avtorja raziskave dodatno pojasnila, da parabenov nista označila kot vzrok za pojav raka in da nenazadnje niti ni znano, po kateri poti so parabeni prišli v tumorje oz. kaj je bil njihov izvor, je dvom o varnosti parabenov ostal. Znanstveni odbor za potrošniške izdelke (*Scientific Committee on Consumer products*, SCCP) tako že 15 let intenzivno spremlja varnost parabenov v kozmetičnih izdelkih in je od leta 2005 izdal več mnenj (zadnje v l. 2021). V vseh so prišli do zaključka, da ni znanstvenih dokazov, ki bi kazali na povečano tveganje za razvoj raka dojk ob uporabi konzerviranih kozmetičnih izdelkov za pod pazduho. So pa na podlagi teh raziskav uvrstili parabene med morebitne endokrine motilce, čemur so prilagodili njihove maksimalne dovoljene koncentracije in prepovedali uporabo dolgoverižnih derivatov (izopropil- in izbobutil- ter pentil-, fenil- in benzilparabeni niso dovoljeni v kozmetičnih izdelkih, ki so prišli na tržišče po l. 2014). Metil- in etilparaben še naprej veljata kot varna, njuna vsebnost v kozmetičnih izdelkih pa je lahko do 0,4 % (kot posamezen ester) oz. do 0,8 % (za zmesi parabenov). Od leta 2016 je maksimalna dovoljena koncentracija za propil- in butilparaben znižana na 0,14% (posamezno ali v kombinaciji). SCCS je pred kratkim izdal novo mnenje o varnosti propilparabena, ki je potrdilo izsledke iz leta 2016, za butilparaben pa je ponovna presoja varnosti še v teku. Na predlog SCCS je Evropska komisija leta 2016 tudi prepovedala uporabo propil- in butilparabena v kozmetičnih izdelkih, ki se ne spirajo in so namenjeni negi pleničnega področja pri otrocih, mlajših od treh let (32–34).

Pri proučevanju varnosti parabenov sodeluje tudi Evropska agencija za varnost hrane (EFSA), saj parabene v vlogi konzervansov uporabljamo tudi v živilih (maksimalna dovoljena vsebnost v končnem živilu je do 0,2 % oz. 0,1 % v pijačah) (35). EFSA maksimalni skupni dnevni vnos metil- in etilparabena (navajana kot E218 in E214) omejuje na do 10 mg/kg telesne mase, medtem ko je uporaba propilparabena v živilih v EU od l. 2006 prepovedana zaradi potencialnega vpliva na razvoj moških reproduktivnih organov. Pri metilparabenu tovrstnih učinkov niso zaznali in še naprej velja za varnega tudi za celotno pediatrično populacijo. Na podlagi prepovedi uporabe propilparabena v hrani lahko utemeljimo tudi prepoved njegove uporabe v zdravilih za novorojenčke, dojenčke in majhne otroke, tudi v primeru kratkotrajne uporabe (36).

4.5 KONZERVANSI V ZDRAVILIH ZA OTROKE

Primeri zgoraj opisanih konzervansov osvetljujejo zahtevnost in večplastnost oblikovanja zdravil za otroke, kjer sle-

dimo splošnemu vodilu po čim bolj enostavni končni formulaciji z minimalnim številom in vsebnostjo pomožnih snovi, brez nepotrebnih dodatkov. Če je mogoče, se namesto konzervansov raje poslužujemo inovativnih tehnoloških rešitev. Kadar to ni možno, mora biti uporaba konzervansov tehtna in upravičena ter vedno v najnižjih koncentracijah, ki še zagotavljajo ustrezno zaščito. Pomanjkanje relevantnih kliničnih raziskav postavlja ključno vprašanje, ali so varnostni podatki, pridobljeni na odraslih prostovoljcih, relevantni za pediatrično populacijo. Ali naj bo uporaba konzervansov prepovedana v vseh starostnih skupinah ali le za novorojenčke in dojenčke, morda le v primeru dolgotrajne uporabe? Morebiti so lahko dovoljeni za starejše otroke, vendar koliko stare? Ali je vprašljiva tudi kratkotrajna uporaba (36)? Nešteto vprašanj, odgovor pa ni en sam in še zdaleč ne enoznačen. V pomoč glede dolgotrajne izpostavljenosti lahko služijo podatki EFSA ter na novo vzpostavljena podatkovna baza STEP (*Safety and Toxicity of Excipients for Pediatrics* (37)), vsekakor pa je prva izbira vedno uporaba pripravkov brez konzervansov. Izpostavljenost konzervansom lahko zmanjšamo tudi s tem, da tradicionalne večodmerne tekoče pripravke nadomestimo z alternativnimi otrokom prijaznimi farmacevtskimi oblikami, kot so npr. orodisperzibilne tablete, minitablete, oralni filmi in slamice, ki jih praviloma ni potrebno konzervirati (38, 39).

5 SKLEP

Mikrobiološka kakovost je integralni del vsakega farmacevtskega izdelka. Ustrezno načrtovanje pomožnih snovi, vključno s konzervansi, je ključnega pomena za razvoj optimalnega zdravila. Poleg osnovnih informacij o konzervansih, katerih poznavanje je pomembno s tehnološkega vidika, moramo redno spremljati tudi informacije o njihovi varnosti, ki jih z namenom zagotavljanja kakovostnih in varnih zdravil kontinuirano nadgrajujejo. Regulatorni organi namreč nenehno spremljajo varnostni profil pomožnih snovi, vključujoč konzervanse, kar se odraža tudi v prilagajanju zgornjih varnih mej uporabe in reviziji označevanja zdravil na osnovi najnovejših znanstvenih dognanj. Ključno je, da bodo takšnemu trendu sledili tudi v prihodnje, zato so relevantne znanstvene raziskave, predvsem z vidika ocene varnostnega tveganja za različne načine aplikacije in specifične skupine bolnikov, še kako upravičene.

6 LITERATURA

1. *European Pharmacopoeia online 10.0 [Internet]. Council of Europe Edqm 01/2020 [cited 2021 March 15]. 625-27 p. Available from: https://pheur.edqm.eu/home*
2. *Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. Molecules. 2018 Jun 28;23(7):1571.*
3. *Dao H, Lakhani P, Police A, Kallakunta V, Ajjarapu SS, Wu KW, et al. Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. AAPS PharmSciTech. 2018 Jan;19(1):60-78.*
4. *Tapia MS, Alzamora SM, Chirife J. Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation. In: Barbosa-Cánovas GV, Fontana Jr. AJ, Schmidt SJ, Labuza TP, editors. Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications, Second Edition [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2020 [cited 2021 April 15]. Chapter 14. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118765982.ch14*
5. *Cundell T. The role of water activity in the microbial stability of non-sterile drug products. Eur Pharm Rev. 2015 March,20(1):58-63.*
6. *Anurova MN, Bakhrushina EO, Demina NB, Panteleeva ES. Modern Preservatives of Microbiological Stability (Review). Pharma Chem J. 2019 Sept 53, 564–71.*
7. *American Pharmaceutical Review™ [Internet]. Antimicrobial Preservatives Part Two: Choosing a Preservative [update 2017 October; cited 2021 April 16]. Available from: https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/343543-Antimicrobial-Preservatives-Part-Two-Choosing-a-Preservative/*
8. *American Pharmaceutical Review™ [Internet]. Antimicrobial Preservatives Part One: Choosing a Preservative System [update 2012 January; cited 2021 April 16]. Available from: https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38886-Antimicrobial-Preservatives-Part-One-Choosing-a-Preservative-System/*
9. *Baumgartner S., Bajramović N. Varnost in učinkovitost konzervansov v kozmetičnih izdelkih. V: Kočevar Glavač N, Zvonar A (Ur.). Kozmetologija I: trendi na področju kozmetičnih izdelkov: učinkovitost in varnost sestavin: Fakulteta za farmacijo, Ljubljana; 2011. str. 39-52.*
10. *Fransway AF, Fransway PJ, Belsito DV, Warshaw EM, Sasseville D, Fowler Jr JF, DeKoven JG, et al. Parabens. Dermatitis. Jan/Feb 2019;30(1):3-31.*
11. *American Pharmaceutical Review™ [Internet]. Antimicrobial Preservatives Part Three: Challenges Facing Preservative Systems [update 2012 January; cited 2021 April 17]. Available from: https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38874-Antimicrobial-Preservatives-Part-Three-Challenges-Facing-Preservative-Systems/*
12. *The solubility of drugs. In: Florence T, Attwood D, editors. Physicochemical Principles of Pharmacy. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2006. p. 139-176.*
13. *EMA [Internet]. Excipients labelling [cited 2021 May 5]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/product-information/reference-guidelines/excipients-labelling*

14. *Meyer BK, Ni A, Hu B, Shi L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. J Pharm Sci. 2007 Dec;96(12):3155-67.*
15. *Moser CL, Meyer BK. Comparison of compendial antimicrobial effectiveness tests: a review. AAPS PharmSciTech. 2011 Mar;12(1):222-6.*
16. *Nagarsenkar MS, Dhawan VV. Parenteral preparations. In: Adejare A, editor-in-chief. Remington (Twenty-third Edition) The Science and Practice of Pharmacy [Internet]. Academic Press; 2020 [cited 2021 May 10]. Chapter 29. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128200070000295?via%3Dihub*
17. *Gervasi V, Dall Agnol R, Cullen S, McCoy T, Vucen S, Crean A. Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Oct;131:8-24.*
18. *EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzyl alcohol and benzoic acid group used as excipients [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available form: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/benzyl-alcohol-benzoic-acid-group-used-excipients-report-published-support-questions-answers-benzyl/chmp/508188/2013-t_en.pdf*
19. *EMA. Excipients labelling [Internet]. Questions and answers on benzyl alcohol used as an excipient in medicinal products for human use. Adopted [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available form: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzyl-alcohol-used-excipient-medicinal-products-human-use_en.pdf*
20. *DeStefano F, Monk Bodenstab H, Offit PA. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. Clin Infect Dis. 2019 Aug 1;69(4):726-31.*
21. *Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. Nat Rev Immunol. 2021 Feb;21(2):83-100.*
22. *NIJZ [Internet]. Tiomersal in cepiva [datum dostopa 2021 May 6]. Dostopno na: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/tiomersal_in_cepiva.pdf*
23. *EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzalkonium chloride used as an excipient [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available form: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/benzalkonium-chloride-used-excipient-report-published-support-questions-answers-benzalkonium_en.pdf*
24. *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.*
25. *Steven DW, Alaghband P, Lim KS. Preservatives in glaucoma medication. Br J Ophthalmol. 2018 Nov;102(11):1497-1503.*
26. *Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. Clin Ophthalmol. 2019 Aug 1;13:1409-25.*
27. *Rolando M, Crider JY, Kahook MY. Ophthalmic preservatives: focus on polyquaternium-1. Expert Opin Drug Deliv. 2011 Nov;8(11):1425-38.*
28. *EMEA/622721/2009 [Internet]. EMEA public statement on antimicrobial preservatives in ophthalmic preparations for human use [cited 2021 April 28]. Available from: http://www.techtran.co.jp/reportd/emea091208.pdf*
29. *EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzalkonium Chloride. Adopted questions and answers [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available form: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzalkonium-chloride-used-excipient-medicinal-products-human-use_en.pdf*
30. *EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzoic acid and benzoates. Adopted questions and answers (Q&A). [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available form: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzoic-acid-benzoates-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf*
31. *EMA [Internet]. Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use [updated 2015 October 22; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use_en.pdf*
32. *European Commission [Internet]. Call for data on ingredients with potential endocrine-disrupting properties used in cosmetic products [updated 2021 February 15; cited 2021 May 10]. Available from: https://ec.europa.eu/growth/content/call-data-ingredients-potential-endocrine-disrupting-properties-used-cosmetic-products-0_en*
33. *European Comission. SCCS [Internet]. OPINION ON Propylparaben (PP) [updated 2021 March 30-31; cited 2021 May 5]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_243.pdf*
34. *European Comission. SCCS [Internet]. The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safetyevaluation11th revision [updated 2021 March 30-31; cited 2021 May 5]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_250.pdf*
35. *EUR-Lex [Internet]. UREDBA KOMISIJE (EU) št. 1130/2011 z dne 11. novembra 2011 o spremembah Priloge III k Uredbi (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in Sveta o aditivih za živila z vzpostavitvijo seznama Unije aditivov za živila, odobrenih za uporabo v aditivih za živila, encimih za živila, aromah za živila in hranilih [cited 2021 May 3]. Available from: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1130*
36. *EMA [Internet]. Preservatives. Are they safe? [update 2010 May; cited 2021 April 28]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-preservatives-are-they-safe_en.pdf*
37. *EuPfu [Internet]. STEP Database [update 2017 September 19; cited 2021 May 4]. available from: https://step-db.ucl.ac.uk/eupfi/appDirectLink.do?appFlag=login*
38. *van Riet-Nales DA, Schobben AFAM, Vromans H, Egberts TCG, Rademaker CMA. Safe and effective pharmacotherapy in infants and preschool children: importance of formulation aspects. Arch Dis Child. 2016 Jul;101(7):662-9.*
39. *Thabet Y, Klingmann V, Breitkreutz J. Drug Formulations: Standards and Novel Strategies for Drug Administration in Pediatrics. J Clin Pharmacol. 2018 Oct;58 Suppl 10:26-35.*