

Određivanje olendrina u listu oleandra (Nerium Oleander L.)

Pleslić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department for Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:653007>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

ODREĐIVANJE OLEANDRINA U LISTU OLEANDERA
(*NERIUM OLEANDER L.*)

IVANA PLESLIĆ

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

ODREĐIVANJE OLEANDRINA U LISTU OLEANDERA
(NERIUM OLEANDER L.)

Mentor: DOC. DR. SC. IVICA LJUBENKOV

IVANA PLESLIĆ

Matični broj: 376/2016.

Split, rujan 2018.

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Splitu
pod nadzorom mentora Doc. dr. sc. Ivice Ljubenkova
u vremenskom razdoblju od 02.07.2018 do 27.07.2018.

Datum predaje diplomskog rada: 13. rujna 2018.

Datum prihvaćanja rada: 17. rujna 2018.

Datum usmenog polaganja: 24. rujna 2018.

Povjerenstvo: 1. Doc. dr. sc. Ivice Ljubenkov
2. Dr. sc. Barbara Soldo
3. Doc. dr. sc. Željana Fredotović

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. TOKSIKOLOGIJA | 1 |
| 1.2. FORENZIČNA TOKSIKOLOGIJA | 2 |
| 1.3. BILJKE U TOKSIKOLOGIJI | 5 |
| 1.4. SRČANI GLIKOZIDI | 6 |
| 1.4.1. Povijest liječenja srčanim (kardiotoničnim) glikozidima | 7 |
| 1.4.2. Kemijski sastav srčanih glikozida | 7 |
| 1.4.3. Mehanizam djelovanja..... | 9 |
| 1.5. BILJKE SA SRČANIM GLIKOZIDIMA..... | 11 |
| 1.5.1 Crveni naprstak ili crvena pustikara | 11 |
| 1.5.2. Đurđica | 12 |
| 1.5.3. Milica..... | 13 |
| 1.5.4. Kukurijek..... | 14 |
| 1.5.5. Morski luk | 15 |
| 1.5.6. Oleander | 16 |
| 1.6. OLEANDRIN..... | 18 |
| 1.7. NEKI OSNOVNI POJMOVI U TOKSIKOLOGIJI: | 20 |
| 2. CILJ RADA..... | 21 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 22 |
| 3.1. PRIPRAVA UZORAKA ZA EKSTRAKCIJU I | 22 |
| 3.2. PRIPRAVA STANDARDA..... | 26 |
| 3.3. HPLC UREĐAJ | 26 |
| 3.4. PRIPRAVA UZORAKA ZA EKSTRAKCIJU II | 28 |
| 4. REZULTATI..... | 29 |
| 5. RASPRAVA..... | 33 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 37 |
| 7. LITERATURA..... | 38 |
| 8. SAŽETAK..... | 40 |
| 9. SUMMARY | 41 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 42 |
| Izjava o akademskoj čestitosti | 44 |

1. UVOD

1.1. TOKSIKOLOGIJA

Toksikologija je znanost koja proučava otrove, njihova kemijsko – fizikalna svojstva te štetno djelovanje otrova na žive organizme (biološke sustave). Riječ toksikologija dolazi od grčke riječi *toxikos* „poisonous“ – otrov i *logos* – nauka. Još je Paracelsus, otac toksikologije, u 16. stoljeću rekao da „samo doza čini otrov“.

Otrov je kemijska tvar prirodnog ili sintetskog podrijetla koja kada uđe u organizam, u relativno maloj količini, dovodi do različitih promjena u funkcioniranju živog organizma. Štetna djelovanja otrova uvjetuju kemijsko fizikalna svojstva, količina i koncentracija otrova, interakcija s drugim tvarima u organizmu te zdravstveno stanje samog organizma.

Koncentracija toksičnih tvari u živim organizmima kao i u drugim medijima izražavaju se u jedinicama:

→ ppm (parts per million) mg / kg ili $\mu\text{L} / \text{L}$

→ ppb (parts per billion) $\mu\text{g} / \text{kg}$

→ ppt (parts per trillion) ng / kg

Štetne tvari svrstavamo u tri skupine:

→ Skupina I - vrlo toksične tvari, vrijednost LD_{50} je ≤ 25 mg tvari / kg tjelesne mase

→ Skupina II – toksične tvari, vrijednost LD_{50} je 25 – 200 mg tvari / kg tjelesne mase

→ Skupina III – štetne tvari, vrijednost LD_{50} je 200 – 2000 mg tvari / kg tjelesne mase

Toksikologija je vrlo kompleksna znanost koja se dijeli prema:

- pristupu

→ deskriptivna

→ analitička

→ molekularna

- području djelovanja

→ klinička

→ toksikologija hrane

→ forenzična toksikologija

→ ekotoksikologija

- profesiji

→ deskriptivna

→ mehanistička

→ regulatorna

- specifičnom organu

→ toksikologija jetre, bubrega, kože

→ neurotoksikologija

→ imunotoksikologija

→ reproduktivna toksikologija (1)

1.2. FORENZIČNA TOKSIKOLOGIJA

Forenzična (sudska) toksikologija je disciplina koja proučava sudskomedicinske aspekte otrovanja. Sudska toksikologija u svojoj primjeni ujedinjuje različite prirodne znanosti kao što su biologija, kemija i društvenu znanost – pravo. Pravni dio toksikologije je posebno važan kod sudskih vještačenja jer se od toksikologa očekuje da na temelju dobivenih rezultata interpretira iste i da svoje stručno mišljenje. Kako sud, najčešće, nema stručna znanja i vještine u ovom području to je uloga forenzičnog toksikologa veća jer svojim vještačenjem sudu daje nepobitan dokaz.

U sudskomedicinskoj praksi posebna pozornost se posvećuje otrovanjima sa smrtnim ishodom kao i otrovanja koja su vezana s počinjenjem kaznenog djela.

Prema podrijetlu i mjestu stvaranja otrova otrovanja se dijele na :

egzogeni kemijski otrovanja (djelovanje otrova na organizam koja su unesena izvana)

- bakterijska otrovanja (djelovanje bakterijskih otrova ili ih bakterije same izlučuju – salmonela, botulin)
- samootrovanja (djelovanje otrova koji je sam nastao u organizmu)

Podrijetlo egzogenih kemijskih otrova može biti:

- mineralno (arsen, olovo, živa)
- biljno (opijum, strihnin, otrovne gljive)
- životinjsko (zmijski otrov)
- organsko (sintetsko)

Prema vremenu nastanka otrovanja mogu biti:

- akutna (otrovanja tijekom nekoliko dana)
- kronična (otrovanja tijekom dužeg razdoblja, uglavnom u malim količinama)

Prema načinu nastanka otrovanja se dijele na:

- samoubilačka (suicidna)
- ubilačka (homicidna) slučajna (profesionalna otrovanja, otrovanja nastala zabunom, otrovanja zbog predoziranja u terapiji, uporaba otrova kao sredstva za uživanje)
- jatrogena (otrovanja koja su nastala kao posljedica krivog savjeta liječnika, prevelike doze propisanog lijeka, otrovanja nastala tijekom liječenja)

Prema ishodu otrovanja dijelimo na:

- smrtonosna
- nesmrtonosna (sa posljedicama ili bez posljedica)

Postoji nekoliko klasifikacija otrova, ali niti jedna nije sveobuhvatna. Otrovi se, u sudskoj toksikologiji, dijele prema:

- učinku na organizam
- podrijetlu
- kemijskoj i fizikalnoj prirodi otrova
- načinu izdvajanja (analitički postupak)

U sudskomedicinskoj praksi otrovi se dijele s obzirom na mjesto i način djelovanja:

- lokalno djelovanje (djeluju na mjestu ulaza u organizam; koža i /ili sluznica)
 - jetki (korozivni otrovi) – kiseline i baze koje izazivaju nekrozu tkiva
 - iritansi (nadražajni otrovi) – nadražaj na tkivima, najčešće pluća (amonijak)

- opće djelovanje (resorptivni otrovi) – djeluju toksično na stanice i kapilare tek nakon resorpcije
 - krvni otrovi (CO; vezuje se za hemoglobin te ometa vezivanje kisika)
 - nervni otrovi (alkohol, opijati; djeluju na SŽS pa poremećajem disanja dolazi do asfiksije)
 - parenhimni (tkivni) otrovi – djeluju na tkiva, olovo arsen
- istodobno djelovanje (opće i lokalno)
 - jetki s općim djelovanjem (fenoli, octena kiselina)
 - iritansi s s općim djelovanjem (živa) (2,3)

1.3. BILJKE U TOKSIKOLOGIJI

Toksikologija biljaka ima dugu povijest. U Bibliji se spominju dobre i loše biljke, a grčka mitologija opisuje 12 bogova gdje svaki ima svoje drvo, pa tako i ljudi imaju biljke koje koriste za bijeg u više duhovne sfere (blaga euforija, povećana svijest ili duboki trans). Aboriđini su među prvim narodima koristili toksine biljaka za omamljivanje riba nanošenjem na strijele za lov. Peruanski Indijanci konzumirali su sok od toksične biljke *Datura Sanguinea* koji im je pomagao da se „direktno obraćaju bogovima“. Germani su koristili sjemenke bunike za poboljšavanje „svojstva“ alkoholnih pića. Zabilježeno je otrovanje Rimske vojske, 67. godine prije Krista, medom alpske ruže (9). Primjera iz povijesti je mnogo. Sadašnje znanje počiva na temeljima drevnih spisa s Levanta (Istočni Mediteran) i razvijenih europskih kultura na tom području (Grčka, Egipat). U Kini se još uvijek koristi, od strane lokalnih travara, recept na bazi biljaka star 4000 godina (9). Do početka 20. stoljeća biljke značajnijeg korištenja sintetskih lijekova su se koristile i kao otrovi i kao lijekovi. U današnje vrijeme liječnici imaju na raspolaganju brojne sintetske preparate ali se i biljni lijekovi sve više koriste.

Podjela biljaka prema skupini spojeva koje sadrže:

- Alkaloide
- Glikozide
- Proteine
- Oksalate
- Alkohole
- Mineralne toksine

Otrovne biljke pripadaju velikom broju različitih porodica. Većina ima sve dijelove toksične, najčešće plodove. Većina njih ima oštar ili gorak okus. Međutim neke ga nemaju i te se smatraju najopasnijim. Za ljude koji često borave u prirodi potrebno je da poznaju nejestive i otrovne plodove. Kod otrovanja kukutom, đurđicom ili velebiljem simptomi se javljaju nakon nekoliko sati (7-9 h). U tablici 1 su najčešće biljne vrste našeg područja.

Tablica 1. Najznačajnije toksične biljke s područja RH (10)

| Biljka | Kemijska skupina | Toksin | Posljedice djelovanja |
|---------------------------|-------------------------|---------------------|--|
| Velebilje, Bunika | Alkaloid | Atropin | Suhoća u ustima, crvenilo lica, derilij, motorički nemir |
| Mandragora | Alkaloid | Skopolamin | Proširene zjenice, plitko disanje |
| Rajčica (zeleni plod) | Alkaloid | Solanin | Glavobolja, malaksalost, hemoliza, edem mozga |
| Gorki badem, koštice voća | Cijanogeni glikozid | Amigdalinalin | Mučnina, osjećaj gušenja, tahikardija |
| Ricinus | Glikoprotein | Ricin, abrin | Probavno krvarenje, hemoliza, anafilaksija |
| Rabarbara (listovi) | Oksalati | Oksalna kis. i soli | Probavne smetnje, mučnina |
| Trubeljika | Nezasićeni alkohol | Cikutoksin | Bol u abdomenu, povraćanje, koma |
| Indijska konoplja | Smola | THC | Halucinacije |

1.4. SRČANI GLIKOZIDI

Srčani ili kardiotonični glikozidi su spojevi koji se nalaze u preko 400 različitih vrsta biljaka, kao sekundarni metaboliti, a predstavljaju veliku skupinu tvari koja se koristi u terapiji kongestivnog zatajenja srca i srčane aritmije. Kongestivno zatajenje srca nastaje kada srce ne može ispumpati dovoljnu količinu krvi, a samim time i kisik te hranljive tvari, u tkivo. To je učestala bolest koja se obično javlja kod starijih osoba a kolokvijalni nazivi su „slabost srca“ ili „staračko srce“. Količina krvi koja je ušla u srce ne može se izbaciti te dolazi do slabljenja srca i smanjivanja srčanog minutnog volumena. Problem kod srčanih glikozida je jako uska granica između doze koja pozitivno djeluje na rad srca i koncentracije kada srčani glikozid počinje djelovati kao otrov tj. lako može prijeći iz područja djelotvornosti u područje intoksikacije.

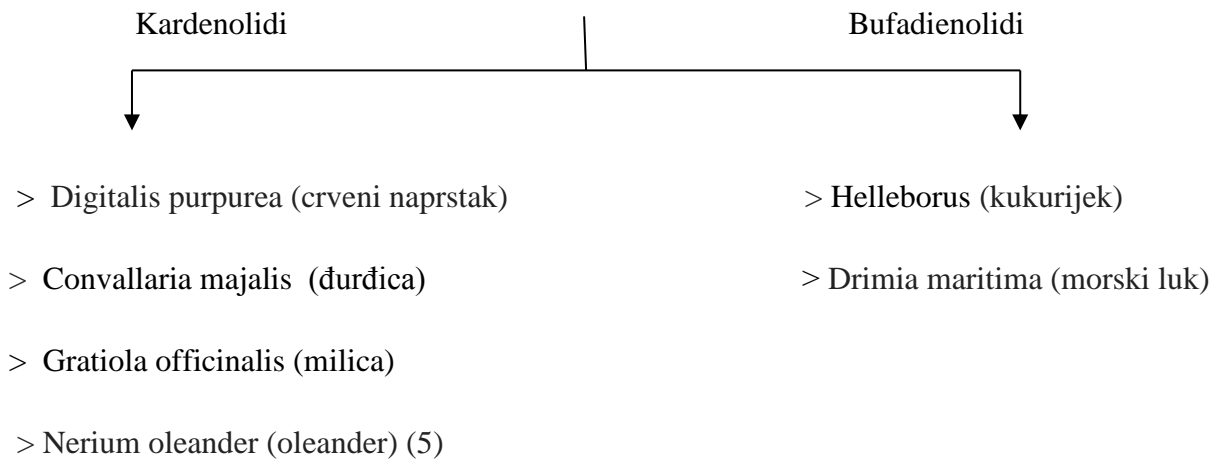
1.4.1. Povijest liječenja srčanim (kardiotoničnim) glikozidima

Nije moguće u potpunosti točno odrediti kada je čovjek prvi puta koristio biljke, koje sadrže srčane glikozide, kao lijek i/ili otrov. Engleski liječnik William Withering 1775. godine je na svom putovanju sasvim slučajno upoznao jedinstvenu moć djelovanja srčanih glikozida u biljci crveni naprstak. Pregledao je stariju ženu koja je imala pretjerano nakupljanje tekućine uslijed kongestivnog zatajenja srca. Prognoza bolesti nije bila povoljna međutim nakon nekog vremena je dobio informaciju da se žena potpuno oporavila zahvaljujući mješavini čaja kojeg je uzimala. Istražujući sastav dotičnog čaja zaključio je da je jedna od biljaka koja je bila u sastavu čaja i crveni naprstak. Počeo je istraživati biljku te proizvoditi ekstrakt koji je testirao na siromašnim bolesnicima. Dobiveni rezultati nisu bili obećavajući pa je odustao od svega. Nakon nekog vremena javljali su se bolesnici koji su se oporavili (poboljšalo im se izlučivanje mokraće – normalizacija diureze) pa su se istraživanja nastavila. Nakon mnogo godina ispitivanja William Withering je standardizirao lijek (ekstrakt) za hidropsiju te je u svojoj knjizi „Korist crvene pustikare i neke njezine medicinske uporabe s praktičnim primjedbama za hidropsiju i druge bolesti" (slobodan prijevod naslova knjige), opisao indikacije i tijek liječenja 156 svojih pacijenata. Jedan dio liječnika se nije pridržavalo doza liječenja Withering – ove knjige pa je veliki broj pacijenata imalo simptome otrovanja, a bilo je i smrtnih slučajeva (4)

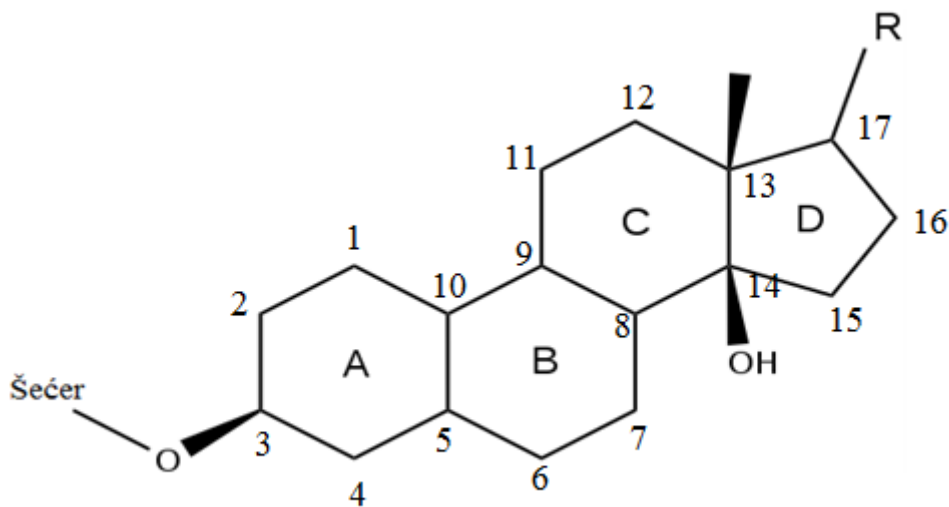
1.4.2. Kemijski sastav srčanih glikozida

Srčani glikozidi su građeni od dvije komponente: šećera (glikozida) i aglikona. Skupina na položaju 17 (slika 2.) definira vrstu srčanog glikozida. U prirodi su poznate dvije vrste: kardenolidi i bufadienolidi. Kardenolidi imaju nezasićeni butirolaktonski prsten α , bufadienolidi α -pironski prsten.

Srčani glikozidi u biljkama

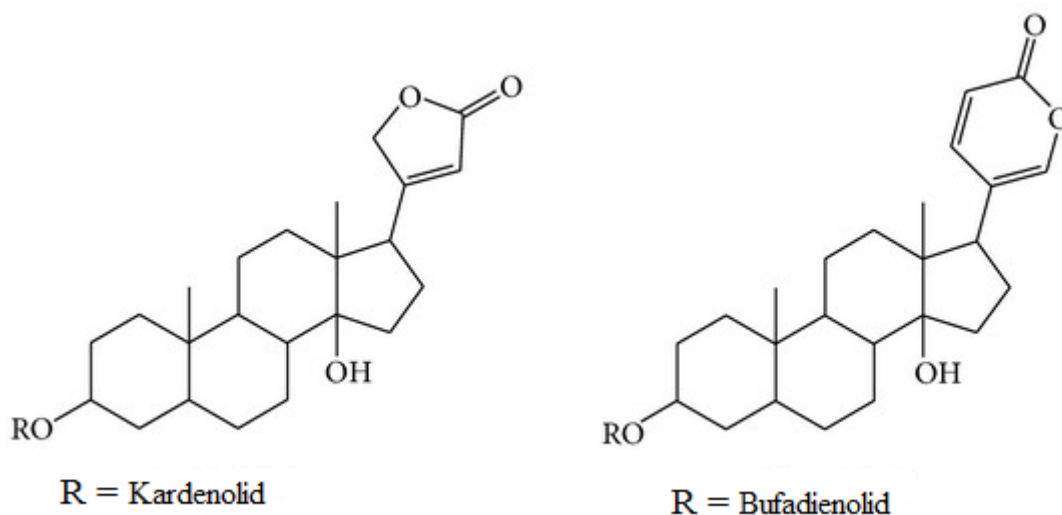


Slika 1. Biljke koje sadrže srčne glikozide



Slika 2. Opća struktura srčanog glikozida

https://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac_glycoside#/media/File:Cardiac_glycoside_general_structure.svg (preuzeto 17.08.2018.)

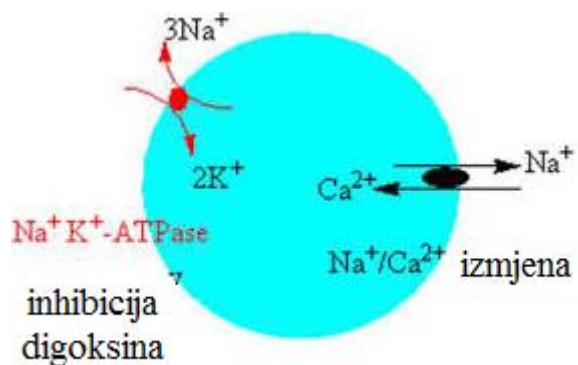


Slika 3. Osnovna struktura kardenolida i bufadienolida

https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-cardiac-glycosides-The-basic-skeletons-of-cardenolides-and_fig1_262844279 (preuzeto 17.08.2018.)

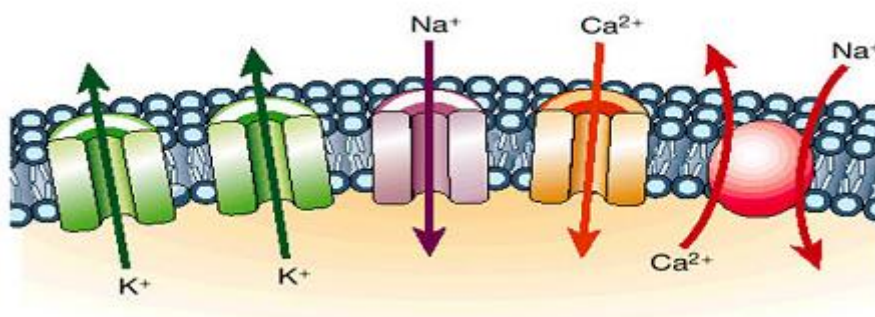
1.4.3. Mehanizam djelovanja

Poznato je dvojako djelovanje srčanih glikozida; kod terapije i kod otrovanja. Mehanizam djelovanja sastoji se u vezivanju glikozida na Na^+ / K^+ -ATP-azu koji je smješten na površini stanica srčanog mišića. Ovaj protein je odgovoran za održavanje električnog potencijala na površini stanica. Srčani glikozidi prvo inhibiraju Na^+ / K^+ -ATP pumpu na membrani srčane stanice pri čemu koncentracija unutarstaničnog natrija raste odnosno smanjuje se izbacivanje iona Na iz stanice. Dolazi do smanjivanja aktivnosti $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ povratne pumpe što rezultira povećavanjem koncentracije Ca iona u stanici. Visoki stanični kalcij povećava srčanu kontraktibilnost. S druge strane, digoksin povećava srčani tonus vagusa (kranijalni živac) i smanjuje aktivnost u srčanom tkivu što za posljedicu ima sinusnu bradikardiju i / ili sinusni zastoj (10)



http://www.farmacija.ucg.ac.me/adminoc/Kardiotonicni_glikozidi_2015.pdf

(preuzeto 16.08.2018.)



Slika 4. Mehanizam djelovanja srčanih glikozid

http://www.jelena-suran.com/predavanja/15.Farmakologija_kardiovaskularnog_sustava.pdf

(preuzeto 16.08.2018.)

1.5. BILJKE SA SRČANIM GLIKOZIDIMA

1.5.1 Crveni naprstak ili crvena pustikara



<https://www.plantea.com.hr/crveni-naprstak/crveni-naprstak-7/>

(preuzeto:16.08.2018.)

CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Plantaginaceae

ROD: Digitalis

VRSTA: Digitalis purpurea

Dvogodišnja zeljasta biljka jednostavnih i dugih listova koji su prekriveni žljezdastim dlačicama a glavni su izvori digotoksina. Raste na svježim i vlažnim prostorima (Europa, Sjeverna Amerika). Iako u medicini nalazi primjenu u liječenju srčanih slabosti ova biljka je jako otrovna. Dva do tri osušena lista mogu biti smrtonosna što znači da je doza pri liječenju vrlo uska. Otrovi se nakupljaju u organizmu dok ne dosegnu određenu koncentraciju. Simptomi otrovanja su povraćanje, mučnina, poremećaj srčanog ritma, a u nekim slučajevima i smrt (6).

1.5.2. Đurđica



<https://www.plantea.com.hr/?s=%C4%91ur%C4%91ica>

(preuzeto: 16.08.2018.)

CARSTVO: Plantae
RED: Asparagales
PORODICA: Asparagaceae
ROD: Convallaria
VRSTA: Convallaria majalis

Trajna zeljasta biljka bez listova, ugodnog mirisa. Stanište joj je u cijeloj Europi i nekim područjima Azije i Sjeverne Amerike. Jednom posadena vrlo lako se sama dalje razmnožava. Cvjetovi su različitih boja; žuti, ružičasti, bijeli. Đurđica je vrlo otrovna biljka posebno cvjetovi i plodovi. Sadrži konvalotoksin i konvaloizid, glikozide koji u pravoj dozi pomažu kod srčanih bolesti. Konzumiranje bobica uzrokuje povraćanje, mučninu, ubrzani puls pa i smrt. Jako je bitno nakon presađivanja dobro oprati ruke (6).

1.5.3. Milica



<https://www.plantea.com.hr/milica/milica-3/>

(preuzeto: 16.08.2018.)

RED: Lamiales

PORODICA: Scrophulariaceae

ROD: Gratiola

VRSTA: *Gratiola officinalis*

Trajna zeljasta biljka, pojedinačnih cvjetova bez mirisa. Rasprostranjena je u Europi, središnjoj Aziji i Sjevernoj Americi. Raste uz močvare, u vodi, i na područjima koja su bogata dušikom. Ova otrovna biljka sadrži srčane glikozide, graciolin i graciotoksin čija je terapijska doza vrlo uska. Simptomi otrovanja su smetnje vida, krvavi proljev, teško disanje, teška oštećenja bubrega. U narodnoj medicini se koristila kao laksativ. Jako je opasna za životinje na ispaši (6).

1.5.4. Kukurijek



<https://www.plantea.com.hr/kukurijek/>

(preuzeto: 16.08.2018.)

CARSTVO: Plantae

RED: Ranunculales

PORODICA: Ranunculaceae

ROD: Helleborus

Biljka iz roda trajnica koji je prvi vjesnik proljeća. Kako ima dekorativne cvjetove često se sadi u vrtovima. Sadrži helebrin, a zabilježena su otrovanja od mlijeka životinja koje su pasle ove biljke (6).

1.5.5. Morski luk



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Drimia_maritima_EnfoqueFlores_2010-10-03_SierraMadrona.jpg (preuzeto: 22.08.2018.)

CARSTVO: Plantae
RED: Angiosperms
PORODICA: Asparagaceae
ROD: Drimia
VRSTA: Drimia maritima

Biljka koja raste iz velike lukovice koja može biti široka do 20 cm. Ispod površine zemlje može se nalaziti i mnogo malih lukovica iz kojih u proljeće izniknu tamnozeleni, kožnati listovi visine do 1 metar. U jesen rastu gusto raspoređeni cvjetovi, a listovi se suše. Najčešće raste po Mediteranu gdje se i prilagodila suhoj i toploj klimi. Oprašuje se na dva načina, uz pomoć vjetrova i kukaca. Svi dijelovi biljke su otrovni. Uporaba ove biljke je poznata starim Egipćanima, a Hipokrat ju je koristio u liječenju konvulzija, žutice i astme. Morski luk se često koristio i kao laksativ. Većina životinja je izbjegava zbog gorkog okusa ali ne i štakori koji nakon konzumiranja podliježu toksičnosti njenih glikozida. Ta njihova navika se iskoristila u proizvodnji rodenticida. Zanimljivo je da je Pitagora proključali morski luk u proljeće vješao na kućni prag protiv zlih duhova (6).

1.5.6. Oleander



<https://www.plantea.com.hr/oleander/oleander-0013/> (preuzeto: 16.08.2018.)

CARSTVO: Plantae

RED: Gentianales

PORODICA: Apocynaceae

ROD: Nerium

VRSTA: Nerium oleander

Oleander je zimzeleni grm koji može doseći visinu do 6 metara. Ima glatke i duge grane te ravne i kožaste listove sa središnjom vidljivom žilom. Cvjetovi su ružičaste, žute i bijele boje a vjenčić je građen od pet latica. Dugački plodovi (10 – 20 cm) smješteni su na dugačkoj stapci koja ima dva tobolca prepuna sjemenki a prekrivena su dugim smeđim dlačicama. Najčešće raste na području Mediterana, Afrike i sjeveroistočne Azije. Za brzi rast odgovara mu topla klima iako se uzgaja i u kućama kontinentalnog područja. Ova biljka je jako otrovna odnosno svaki njezin dio (lišće, stabljika, cvjetovi i nektar) pogotovo za ljude, a poznati su i slučajevi trovanja medom (nektarom) kojeg su pčele skupljale na cvijeću oleandera. Preporučuje se izbjegavanje sadnje u blizini škola i dječjih igrališta. Štetno je i udisanje dima od gorućeg oleandera, jer nadražuje sluznicu. Zabilježena su brza uginuća domaćih životinja i stoke nakon otrovanja kao i otrovanja ljudi uslijed korištenja grančica za štapiće ražnjića (6).

Najveći problem veterinarske dijagnostike je određivanje uzroka smrti kod životinja koje su otrovane biljnim toksinima koje izazivaju „iznenadnu smrt“. Najbolja dijagnoza se postavlja pronalaskom neprobavljenih dijelova biljke u gornjem dijelu probavnog sustava. Što više vremena prolazi to je teže identificirati biljnu vrstu bez specifičnih i selektivnih testova (pregled urina ili metabolita). Znanstvenici su ispitivali utjecaj oleandera i avokada (čiji listovi su jako toksični za ptice) na puranima starim 21 dan. Nakon tri dana većina ptica je uginula, a ostale su eutanazirane. Uzeti su uzorci srca, krvi, jetre i bubrega, a najveća oštećenja su primijećena upravo na srčanom mišiću (11). Slučaj otrovanja 96 – ogorodnice žene koja je primljena u bolnicu nakon konzumacije čaja od oleandera pokazao je da 5 – 15 listova oleandera sadrži 5,8 ng /mL toksina koji je pronađen u krvi pacijentice. Ubrzo nakon smrti obdukcijom nije potvrđena nikakva koronarna bolest. U bolničkom promatranju otrovanja djece, u Australiji od 1972 – 1978. godine, gutanjem listova oleandera jedan sedmogodišnji pacijent je imao djelomični zastoj desne strane srčanog mišića što je dovelo do težeg pumpanja krvi kroz srce; nakon nekog vremena simptomi su nestali. Ostalo troje djece koje je primljeno u bolnicu nakon gutanja sjemena, listova ili plijesni nisu imala nikakve simptome (12). Oleander ima veliku toksičnost s obzirom na dozu (1 list može ubiti odraslu osobu tijekom 1 sata) (6).

Ako dođe do gutanja biljke postoje neke mjere liječenja koje se provode kod lakših simptoma:

- ▶ gastrična dekontaminacija (aktivni ugljen)
- ▶ uporaba fiziološke otopine
- ▶ uporaba antiemetika
- ▶ obavezno reguliranje kalija u krvi (hipo ili hiperkalemija)

Kod težih simptoma (aritmija) provode se ove mjere:

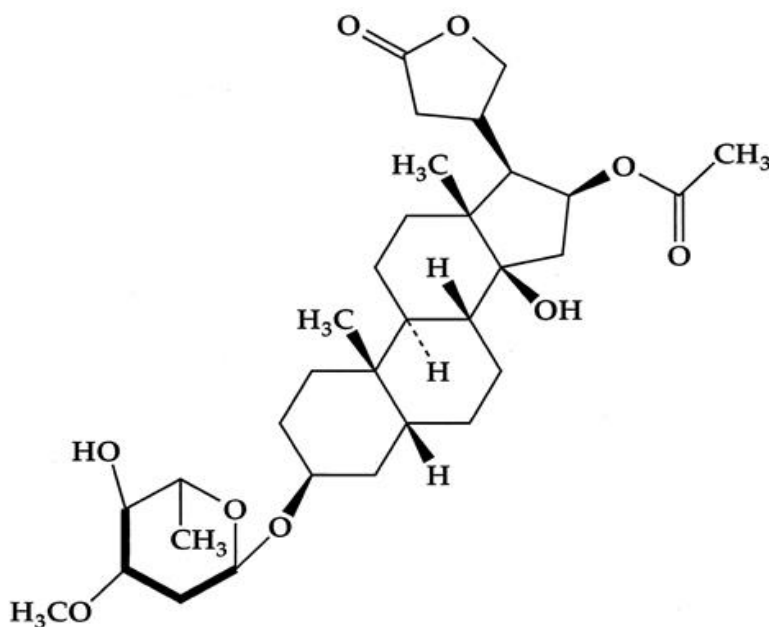
- ▶ bradiaritmija (Atropin)
- ▶ tahiaritmija (obično jako loša prognoza liječenja)

Ova biljka se koristila i u narodnoj medicini prije više od 3500 godina iako je bilo poznato da je gutanje toksično. Imala je jako veliku „vanjsku“ primjenu gdje nisu uočeni toksični simptomi. U 15. stoljeću prije Krista oleander se u kombinaciji sa slatkim korijenom koristio

protiv mamurluka. U Mezopotamiji se oleander koristio u različite svrhe: kod zmijskih ugriza, menstrualne boli, psorijaze, različitih kožnih ekcema. Jako često se koristio kao abortiv, sredstvo za ubojstvo i samoubojstvo. Simptomi otrovanja nakon oralnog uzimanja, inhalacije ili pušenja su povraćanje, usporen rad srca, plavljenje usana i kože, širenje zjenica, otežano disanje te u složenijim slučajevima smrt. Danas se na mnogim internetskim stranicama može naći recept za kuhanje „oleanderske juhe“ koja navodno pomaže bolesnicima s dijagnozom karcinoma. U New Yorku 1993. godine su četiri muškarca umrla jer su koristila oleander kao afrodizijak. Obdukcija je pokazala da se u njihovoj krvi nalazila jako velika količina oleandrina. Oleander je pokazao obećavajuće rezultate u sprječavanju ishemijskog moždanog udara kod laboratorijskih životinja, a pokazuje i antikonvulzivne učinke. Koristi se u industriji za proizvodnju baruta, kao organski insekticid i rodanid.

1.6. OLEANDRIN

Oleandrin je glavna aktivna komponenta u oleanderu.. On je vrlo jaki srčani glikozid iako je u biljci pronađeno još otprilike oko 30 potentnih glikozida (digitoksigenin, neriin).



Slika 5. Kemijska struktura oleandrina

<http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/14/3838> (preuzeto: 18.08.2018.)

Tablica 2. Neka svojstva oleandrina (7)

| | |
|----------------------------|---|
| Molekulska formula | $C_{32}H_{48}O_9$ |
| Molarna masa | 576,72 g / mol |
| Mjere opreza pri rukovanju | Obvezna zaštitna maske, naočale, odjeća |
| Uvjeti skladištenja | Zatvorene posude, suhi i prozračni prostori |
| Izgled kristala | Bezbojni, gorkog okusa |
| Gustoća | 1,261 g / mL |
| Talište | 250 ° C |
| Opasnost za zdravlje | Vrlo toksičan za ljude i životinje |
| Topljivost u vodi | 1,557 mg / L |
| Raspadanje | Pri zagrijavanju otpušta nadražujuće pare |

Oralno uzet oleandrin ima duže vrijeme poluraspadanja nego ako je uzet na drugačije načine. Oleandrin i njegovi metaboliti putuju po tijelu te se jako brzo akumuliraju u jetri, bubrezima i mozgu jer lako prelaze moždanu barijeru. Ako dođe do prirodnog izlučivanja, što ovisi o količini, većina se ukloni putem fecesa a manji dio urinom. Oleandrin pokazuje jako veliki potencijal u liječenju različitih vrsta karcinoma. Najviše se ispituje njegov učinak na tumore mozga jer je ta vrsta karcinoma vrlo progresivna, a često i neoperabilna. Laboratorijskim miševim je transplantiran humani karcinom ili je uzgojen kod samih životinja. Promatralo se kako oleandrin djeluje te su uočilo da je otežao rast karcinoma, smanjio veličinu tumora i proliferaciju stanica. Rezultati su pokazali da je jedan dio miševa preživio eksperiment oleandrinom i to oni koji su tretirani citostaticima (temozolomid). Nema dvojbe da oleandrin ima potencijal kojeg vrijedi istražiti, ali za sada samo kao pomoćno sredstvo u liječenju karcinoma (8).

1.7. NEKI OSNOVNI POJMOVI U TOKSIKOLOGIJI:

- ▶ NOEL –doza kod koje se još uvijek ne pojavljuje štetan učinak
- ▶ MDK – maksimalno dopuštena koncentracija
- ▶ MDD - maksimalno dopuštena dnevna doza
- ▶ MTD – minimalno toksična doza ili maksimalno tolerantna doza
- ▶ ADI –doza toksične tvari koja se smatra prihvatljivom dnevnom dozom (nije opasna)
- ▶ LD₅₀ – jednokratna doza pri kojoj ugiba 50% ispitivanih životinja
- ▶ LC₅₀ – koncentracija pri kojoj ugiba 50% ispitivanih životinja
- ▶ ED – učinkovita doza
- ▶ EC – učinkovita koncentracija
- ▶ LD₅₀ – doza s 50% učinka
- ▶ LC₅₀ – koncentracija s 50% učinka
- ▶ TOKSIN – otrov koji je stvoren u živom organizmu
- ▶ INTOKSIKACIJA – stanje organizma kada su u njemu prisutni toksini
- ▶ VENOM – toksin koji je nastao u žlijezdama venomne životinje (ose, pčele, pauzi, zmije)
- ▶ TOKSIČNOST – količina otrova koja pod određenim uvjetima izaziva otrovanje ili smrt
- ▶ TERATOGENOST – svojstvo neke kemijske tvari da tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja izaziva promjene kod ploda
- ▶ MUTAGENOST - svojstvo neke kemijske tvari koja ima utjecaj na kromosome (promjene na genetskoj informaciji)
- ▶ KARCINOGENOST - svojstvo neke tvari koja izaziva nekontrolirano bujanje tkiva te metastaziranje
- ▶ BIOAKUMULACIJA - svojstvo neke tvari da se nakuplja u organizmu iz okoliša
- ▶ BIOMAGNIFIKACIJA – porast koncentracije štetnih tvari kod organizama na višem stupnju hranidbenog lanca u usporedbi s nižim organizmima

2. CILJ RADA

Cilj rad je ispitati koncentraciju oleandrina u listu oleandera u 10 uzoraka koji su uzeti u tri županije na području RH tijekom ožujka 2018. godine.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu ispitano je 10 uzoraka listova oleandera s područja tri županije RH koji su prikupljeni tijekom mjeseca ožujka 2018. godine. (tablica 3).

Tablica 3. Geografsko područje prikupljenih uzoraka

| Broj uzorka | Mjesto | Županija |
|-------------|---------------------|------------------------|
| 1 | Imotski | Splitsko - dalmatinska |
| 2 | Otok Žut | Šibensko - kninska |
| 3 | Solin | Splitsko - dalmatinska |
| 4 | Supetar (Brač) | Splitsko - dalmatinska |
| 5 | Škriljevec (Ivanec) | Varaždinska |
| 6 | Brodarica | Šibensko - kninska |
| 7 | Splitska (Brač) | Splitsko - dalmatinska |
| 8 | Murter | Šibensko - kninska |
| 9 | Kaštel Sućurac | Splitsko - dalmatinska |
| 10 | Split | Splitsko - dalmatinska |

3.1. PRIPRAVA UZORAKA ZA EKSTRAKCIJU I

Prikupljeni uzorci se najprije suše u sušioniku oko 40 minuta pri 80° C te hlade u eksikatoru oko 20 minuta (slika 6.). Uz pomoć električnog mlina samelju se u fini prah. Tako pripremljeni uzorci su spremljeni u plastične tubice s dobrim čepom.

Oko 1 g praha odvaže se u plastičnu tubicu s dobrim čepom i ekstrahira s 10 mL otopine metanola i vode koja je pripravljena u omjeru 9:1 (v/v). Plastična tubica stavi se u ultrazvučnu kupelj (slika 7.) pri temperaturi od 30°C i ekstrahira 15 minuta. Zatim se dobivena otopina pri sobnoj temperaturi centrifugira pri 4000 okretaja / min 3 minute (slika 8.).



Slika 6. Sušionik ULM 400



Slika 7. UZ kupelj – Bandelin RK 100 H



Slika 8. Centrifuga – Biofuge primo R Heraeus

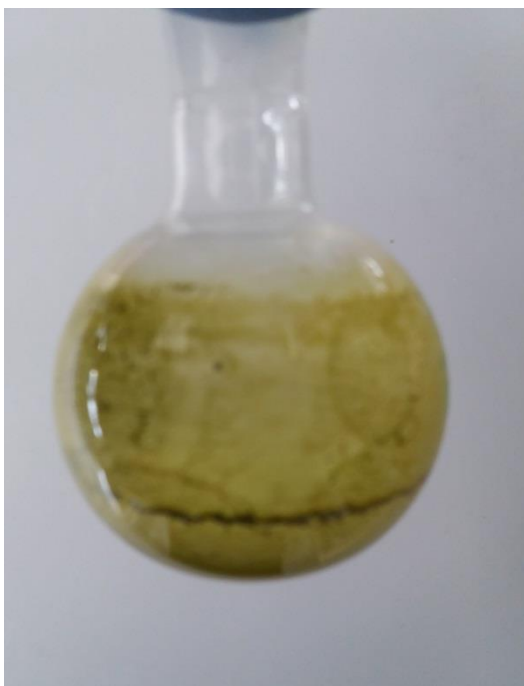
Nakon centrifugiranja, dekantiranjem se odvoji supernatant od taloga. Postupak ekstrakcije se ponovi još jednom.

Spojeni ekstrakti se prebace u prethodno odvagano tikvicu i upare do suha pri 45°C uz pomoć rotacijskog vakuum uparivača (slika 9).



Slika 9. Rotacijski vakuum uparivač – BÜCHI Heatint Bath B – 490

Dobiveni upareni uzorak (slika 10.) se otopi u 10 mL smjese vode i acetonitrila koja je pripravljena u omjeru 8:2 (v/v). Tako pripremljen uzorak je čuvan pri +4°C.



Slika 10. Upareni ekstrakt lista oleandera

Neposredno prije HPLC analize u bočicu za injektiranje otpipetira se 200 μL bistrog dijela prethodno pripremljenog ekstrakta i razrijedi s 800 μL smjese metanola i acetonitrila u omjeru 1:1. Injektira se 20 μL tako pripremljenog uzorka.

3.2. PRIPRAVA STANDARDA

5,0 mg oleandrina (PhytoLab GmbH & Co. KG, Germany) se otopi, u otopini metanol / acetonitril u omjeru 1:1, u odmjerne tikvici od 10 mL. Razrjeđivanjem osnovne otopine koncentracije 500 mg / L dobivene su koncentracije u rasponu od 250 mg / L do 1,38 mg / L.

3.3. HPLC UREĐAJ

Uzorci su analizirani uz pomoć HPLC uređaja (slika 11), a sustav je upravljan uz pomoć Total Chrom Navigator programa. Uvjeti analize uzoraka su prikazani u tablicama 4 i 5. Vrijeme analize uzorka je 30 minuta.

Tablica 4. Uvjeti HPLC uređaja za analizu, kolona Eclipse XDB – C18

| Parametri | Uvjeti |
|-------------------------|--|
| Sastav mobilne faze | Acetonitril / voda : 37 / 63 (izokratno) |
| Protok | 1,0 mL min ⁻¹ |
| Način injektiranja | Automatski |
| Injektirani volumen | 20 μL |
| Kolona | Eclipse XDB – C18 (Agilent) 250 x 4,6 mm, 5 μm |
| Temperatura kolone | 30° C |
| Detektor | UV |
| Valna dužina absorpcije | 217 nm |

Tablica 5. Uvjeti HPLC uređaja za analizu, kolona Restek Pinnacle II – C8

| Parametri | Uvjeti |
|-------------------------|---|
| Sastav mobilne faze | Acetonitril / voda : 40 / 60 (izokratno) |
| Protok | 1,0 mL min ⁻¹ |
| Način injektiranja | Automatski |
| Injektirani volumen | 20 µL |
| Kolona | Restek Pinnacle II – C8 150 x 4,6 mm, 5 µm |
| Temperatura kolone | 30° C |
| Detektor | UV |
| Valna dužina absorpcije | 217 nm |



Slika 11. HPLC uređaj korišten za analizu uzoraka

3.4. PRIPRAVA UZORAKA ZA EKSTRAKCIJU II

Kako su signali za oleandrin u kromatogramima iz prve ekstrakcije bili maleni i razvučeni napravljena je druga ekstrakcija na potpuno jednak način osim što se na kraju upareni ekstrakt otapa u 5 mL otopine metanola i acetonitrila u omjeru 1:1 (v/v) umjesto 10 mL kako je bilo napravljeno u prvoj ekstrakciji.

4. REZULTATI

U sljedećim tablicama prikazani su rezultati koncentracije oleandrina ispitivanih uzoraka. U tablici 6. su rezultati analize uzoraka HPLC – om (uvjeti u tablici 4), a u tablici 7 su prikazani rezultati analize uzoraka pod drugim uvjetima (prikazani u tablici 5).

Tablica 6. Rezultati analize sadržaja oleandrina u ekstraktu (kolona Eclipse XDB – C18)

| Broj uzorka | Ekstrakcija 1 | | | Ekstrakcija 2 | | |
|------------------------|---------------|------------|-------------------------------------|------------------------|-------------|-------------------------------------|
| | I (mg/L) | II (mg /L) | Srednja vrijednost i odstupanje u % | I (mg /L) | II (mg /L) | Srednja vrijednost i odstupanje u % |
| 1 | 14,99 | 15,08 | 15,03±0,05 (0,33%) | 88,17 | 91,21 | 89,69±1,52 (1,70%) |
| 2 | 5,92 | 4,68 | 5,30±0,62 (11,70%) | 4,57 | 4,63 | 4,60±0,030 (6,52%) |
| 3 | 23,01 | 24,07 | 23,54±0,53 (2,25%) | 27,88 | 31,11 | 29,50±1,61 (5,45%) |
| 4 | 11,10 | 12,10 | 11,60±0,50 (4,10%) | 26,48 | 26,08 | 26,28±0,20(0,76%) |
| 5 | 19,88 | 25,04 | 22,46±2,58 (11,48%) | 68,18 | 85,58 | 76,88±8,70 (11,31%) |
| 6 | 10,66 | 8,53 | 9,60±1,06 (11,04%) | 19,10 | 20,45 | 19,77±0,68 (3,44%) |
| 7 | 8,24 | 7,21 | 7,72±0,52 (6,73%) | 10,61 | 11,87 | 11,24±0,63(5,60%) |
| 8 | 5,94 | 4,48 | 5,21±0,73 (14,01%) | 4,47 | 4,40 | 4,43±0,04 (0,90%) |
| 9 | 1,19 | 1,15 | 1,17±0,02 (1,71%) | 7,89 | 8,52 | 8,20±0,32 (3,90%) |
| 10 | 34,16 | 34,67 | 34,41±0,26 (0,75%) | 27,83 | 34,91 | 31,37±3,54(11,28%) |
| Srednje odstupanje u % | | | 6,41 % | Srednje odstupanje u % | | 5,08 % |

Tablica 7. Rezultati analize sadržaja oleandrina u ekstraktu (kolona Restek Pinnacle II – C8)

| Broj uzorka | Ekstrakcija 1 | | | Ekstrakcija 2 | | |
|------------------------|---------------|------------|-------------------------------------|------------------------|-------------|-------------------------------------|
| | I (mg/L) | II (mg /L) | Srednja vrijednost i odstupanje u % | I (mg /L) | II (mg /L) | Srednja vrijednost i odstupanje u % |
| 1 | 11,42 | 11,51 | 11,46±0,05 (0,43%) | 84,73 | 78,11 | 81,42±3,31 (4,06%) |
| 2 | 13,45 | 15,09 | 14,27±0,82 (5,74%) | 15,36 | 15,59 | 15,47±0,12 (0,77%) |
| 3 | 7,58 | 7,75 | 7,66±0,09 (1,17%) | 38,80 | 38,86 | 38,83±0,03 (0,07%) |
| 4 | 20,75 | 19,63 | 20,19±0,56 (2,77%) | 24,91 | 27,68 | 26,30±1,38 (5,26%) |
| 5 | 33,52 | 33,66 | 33,59±0,07 (0,21%) | 90,26 | 89,09 | 89,67±0,58 (0,65%) |
| 6 | 9,44 | 9,38 | 9,41±0,03 (0,32%) | 16,66 | 16,76 | 16,71±0,05 (0,30%) |
| 7 | 13,83 | 13,99 | 13,91±0,08 (0,57%) | 23,53 | 23,98 | 23,75±0,22 (0,95) |
| 8 | 9,65 | 9,67 | 9,66±0,01 (0,10%) | 17,54 | 17,38 | 17,46±0,08 (0,46%) |
| 9 | 10,83 | 10,92 | 10,87±0,04 (0,41%) | 12,86 | 12,96 | 12,91±0,05 (0,38%) |
| 10 | 30,63 | 30,59 | 30,61±0,02 (0,06%) | 45,51 | 46,58 | 46,04±0,53 (1,16%) |
| Srednje odstupanje u % | | | 1,17 % | Srednje odstupanje u % | | 1,40 % |

U tablicama 8 i 9 su prikazane koncentracije oleandrina u suhom listu iz dvije ekstrakcije nakon analize kolonom Eclipse XDB – C18, a tablice 10 i 11 prikazuju koncentracije oleandrina u suhom listu iz istih ekstrakata nakon analize kolonom Restek Pinnacle II – C8.

Tablica 8. Koncentracija oleandrina u suhoj tvari (ekstrakcija I), kolona Eclipse XDB – C18

| Uzorak (ekstrakcija I) | Koncentracija oleandrina u ekstraktu (mg/L) | Masa suhog lista (g) | Koncentracija oleandrina u suhom listu ($\mu\text{g/g}$) |
|------------------------|---|----------------------|--|
| 1 | 15,03 | 1,00 | 751,50 |
| 2 | 5,30 | 1,02 | 259,80 |
| 3 | 23,54 | 1,00 | 1177,00 |
| 4 | 11,60 | 1,01 | 574,25 |
| 5 | 22,46 | 1,01 | 1111,85 |
| 6 | 9,60 | 1,01 | 475,20 |
| 7 | 7,72 | 1,00 | 386,00 |
| 8 | 5,21 | 1,01 | 257,90 |
| 9 | 1,17 | 1,00 | 58,50 |
| 10 | 34,41 | 1,01 | 1703,46 |

Tablica 9. Koncentracija oleandrina u suhoj tvari (ekstrakcija II), kolona Eclipse XDB – C18

| Uzorak (ekstrakcija II) | Koncentracija oleandrina u ekstraktu (mg/L) | Masa suhog lista (g) | Koncentracija oleandrina u suhom listu ($\mu\text{g/g}$) |
|-------------------------|---|----------------------|--|
| 1 | 89,69 | 0,98 | 2288,00 |
| 2 | 4,60 | 1,00 | 115,00 |
| 3 | 29,50 | 1,00 | 737,50 |
| 4 | 26,26 | 1,00 | 656,50 |
| 5 | 76,88 | 1,02 | 1884,30 |
| 6 | 19,77 | 1,01 | 489,35 |
| 7 | 11,24 | 1,02 | 275,45 |
| 8 | 4,43 | 1,00 | 110,75 |
| 9 | 8,20 | 1,00 | 205,00 |
| 10 | 31,37 | 1,02 | 768,85 |

Tablica 10. Koncentracija oleandrina u suhoj tvari (ekstrakcija I), kolona Restek Pinnacle II – C8

| Uzorak (ekstrakcija I) | Koncentracija oleandrina u ekstraktu (mg/L) | Masa suhog lista (g) | Koncentracija oleandrina u suhom listu ($\mu\text{g/g}$) |
|------------------------|---|----------------------|--|
| 1 | 11,46 | 1,00 | 573,00 |
| 2 | 14,27 | 1,02 | 699,50 |
| 3 | 7,66 | 1,00 | 383,00 |
| 4 | 20,19 | 1,01 | 999,50 |
| 5 | 33,59 | 1,01 | 1662,85 |
| 6 | 9,41 | 1,01 | 465,80 |
| 7 | 13,91 | 1,00 | 695,50 |
| 8 | 9,66 | 1,01 | 478,20 |
| 9 | 10,87 | 1,00 | 543,50 |
| 10 | 30,61 | 1,01 | 1515,35 |

Tablica 11. Koncentracija oleandrina u suhoj tvari (ekstrakcija II), kolona Restek Pinnacle II – C8

| Uzorak (ekstrakcija II) | Koncentracija oleandrina u ekstraktu (mg/L) | Masa suhog lista (g) | Koncentracija oleandrina u suhom listu ($\mu\text{g/g}$) |
|-------------------------|---|----------------------|--|
| 1 | 81,42 | 0,98 | 2077,05 |
| 2 | 15,47 | 1,00 | 386,75 |
| 3 | 38,83 | 1,00 | 970,75 |
| 4 | 26,30 | 1,00 | 657,50 |
| 5 | 89,67 | 1,02 | 2197,75 |
| 6 | 16,71 | 1,01 | 413,60 |
| 7 | 23,75 | 1,02 | 582,10 |
| 8 | 17,46 | 1,00 | 436,50 |
| 9 | 12,91 | 1,00 | 322,75 |
| 10 | 46,04 | 1,02 | 1128,40 |

5. RASPRAVA

Količine oleandrina u suhom listu kreću se od 58,50 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 9 (Kaštel Sućurac) do 1703,46 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 10 (Split). Dobivene vrijednosti su rezultat prve ekstrakcije (tablica 8). Iako su ova dva područja relativno geografski blizu iz mase oleandrina možemo zaključiti da uvjeti staništa (mikrolokacija) utječu na količinu oleandrina.

Kod druge ekstrakcije (tablica 9), s nešto promijenjenim uvjetima analize, vrijednosti se kreću od 110,75 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 8 (Murter) do 2288,00 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 1 (Imotski). Potrebno je napomenuti da je uzorak broj 1 uzet van grada.

Dobiveni rezultati analize (tablica 10) s drugom vrstom kolone (Restek Pinnacle II – C8) se kreću od 383,00 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 3 (Solin) do 1662,85 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 5 (Škriljevec).

Iz tablice 11 je vidljivo da je količina oleandrina najmanja u uzorku broj 9 (Kaštel Sućurac) 322,75 $\mu\text{g/g}$, a najveća vrijednost je 2197,75 $\mu\text{g/g}$ u uzorku broj 5 (Škriljevec). Uzorak 5 je uzet u Varaždinskoj županiji pa ponovno možemo zaključiti da uvjeti staništa (mikrolokacija) utječu na količinu oleandrina. Suprotno očekivanjima da bi najviše oleandrina moglo biti u uzorcima prikupljenim na hrvatskoj obali, najviše oleandrina ima u uzorku iz kontinentalne Hrvatske (Varaždinska županija).

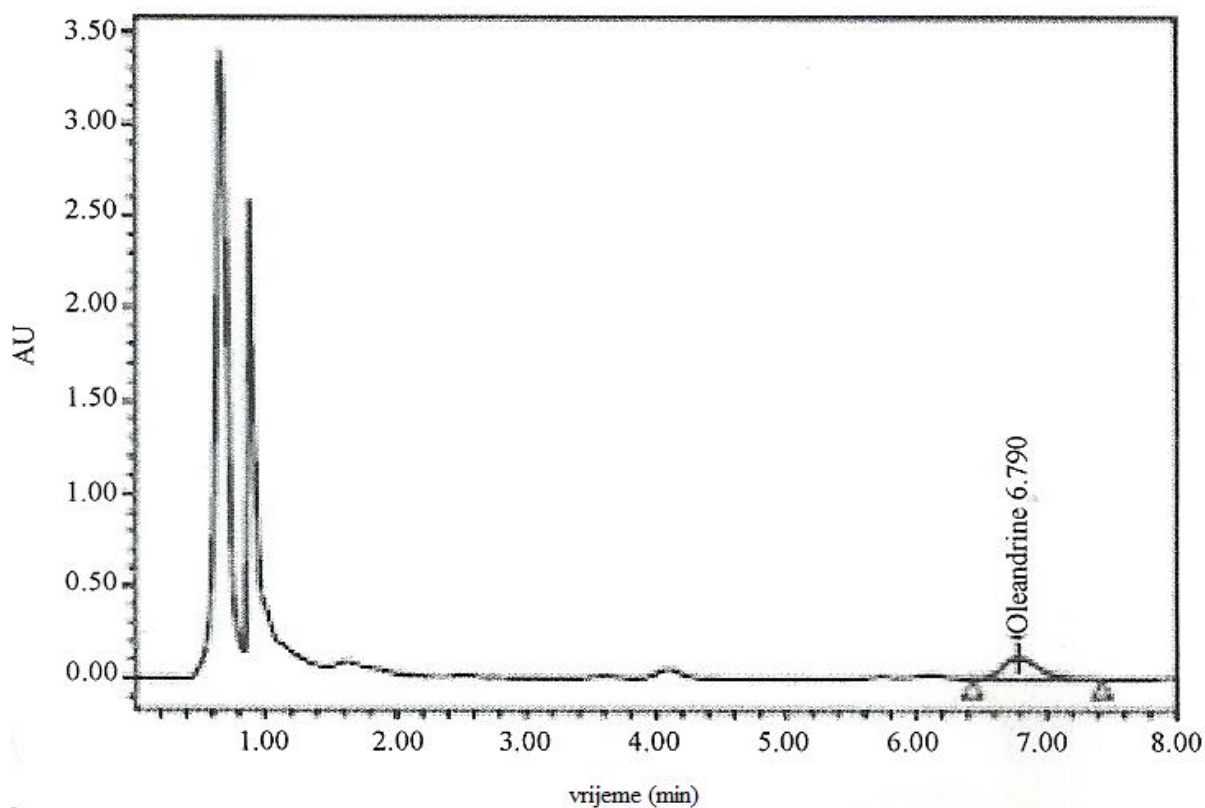
Dobivene rezultate moguće je usporediti s radom gdje su se ispitivale koncentracije oleandrina u listu, cvijetu i stabljici na 25 lokacija u Alžiru (13). U tom ispitivanju najniža koncentracija oleandrina je bila 235,00 $\mu\text{g/g}$, a najviša 3913,00 $\mu\text{g/g}$. Važno je napomenuti da su se rasponi koncentracija oleandrina unutar jednog uzorka kretali u omjerima od skoro 1:5, 377:1665 $\mu\text{g/g}$. U radu nije navedeno koliko je ekstrakcija napravljeno na jednom uzorku.

Slika 12 prikazuje retencijsko vrijeme oleandrina u ispitivanju iz Alžira čija vrijednost je 6,74 minute. Interesantno je primijetiti da je signal oleandrina poprilično širok, razvučen što otežava integraciju signala.

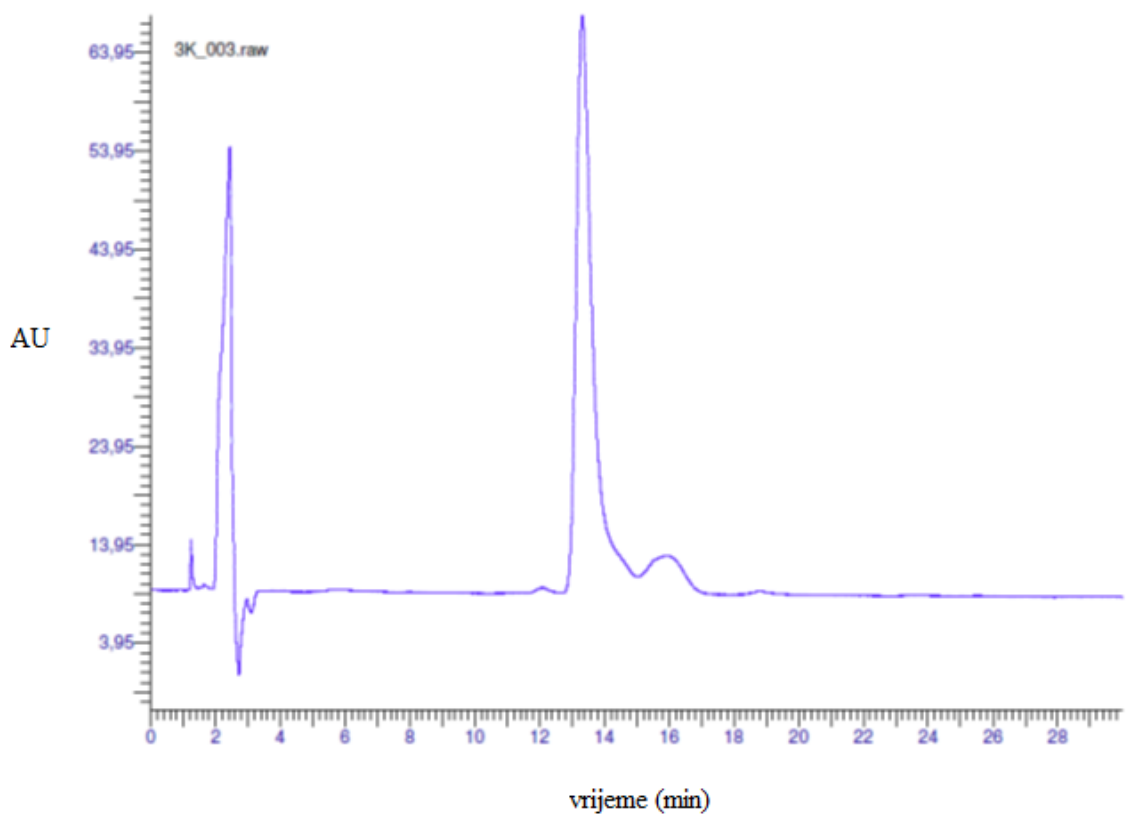
Na koloni C-18 koja je korištena u radu iz Alžira usprkos promjeni polarnosti otapala, temperature kolone i protoka mobilne faze nismo uspjeli dobiti oštrije signale za oleandrin. Zbog toga smo promijenili kolonu na kojoj smo provodili kromatografsko određivanje; do tada smo radili na koloni C-18 kakva je bila preporučena u prethodno spomenutom radu (13).

Uzevši polarniju kolonu (Restek Pinnacle II – C8) smanjili smo retencijsko vrijeme oleandrina, u odnosu na C18 kolonu, i značajno suzili širinu signala za oleandrin i time značajno popravili standardno odstupanje rezultata.

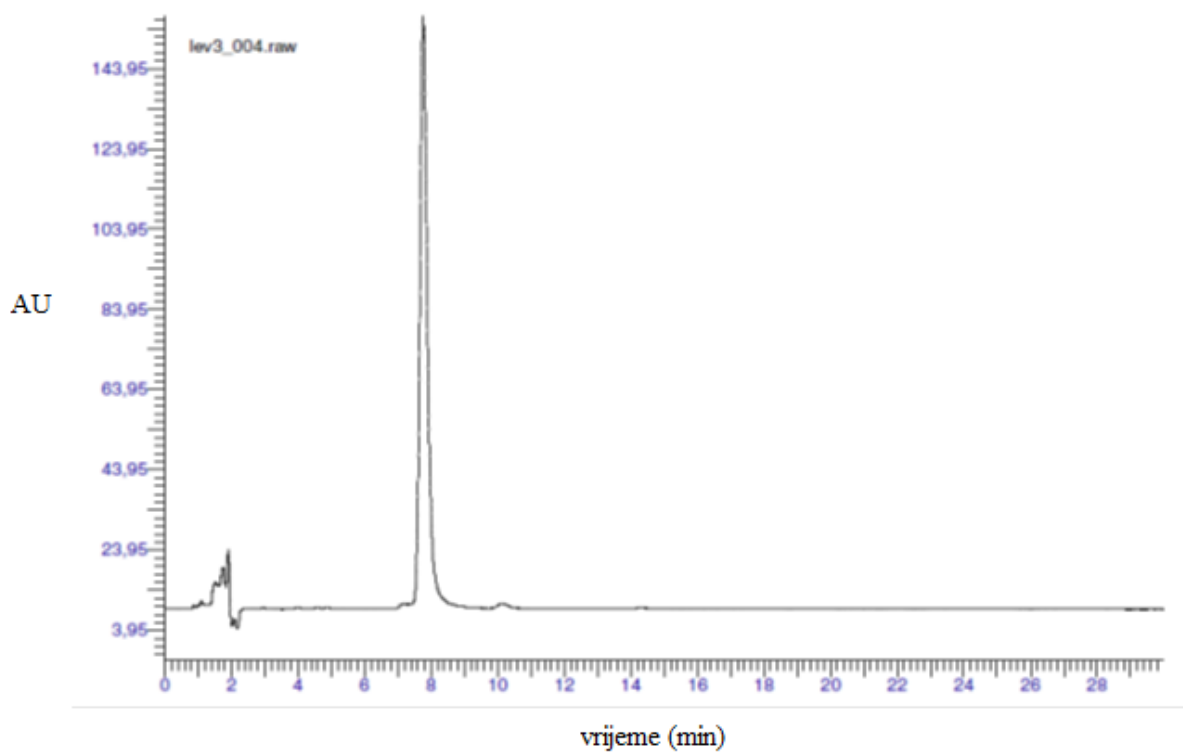
Širinu signala smo s oko dvije minute smanjili na oko jednu minutu (slike 13 i 14), a standardno odstupanje rezultata, zbog toga jer su signali za oleandrin oštiri (slike 15 i 16), s 6,41 % na 1,17 % za prvu ekstrakciju odnosno s 5,08 % na 1,40 % za drugu ekstrakciju (tablice 6 i 7).



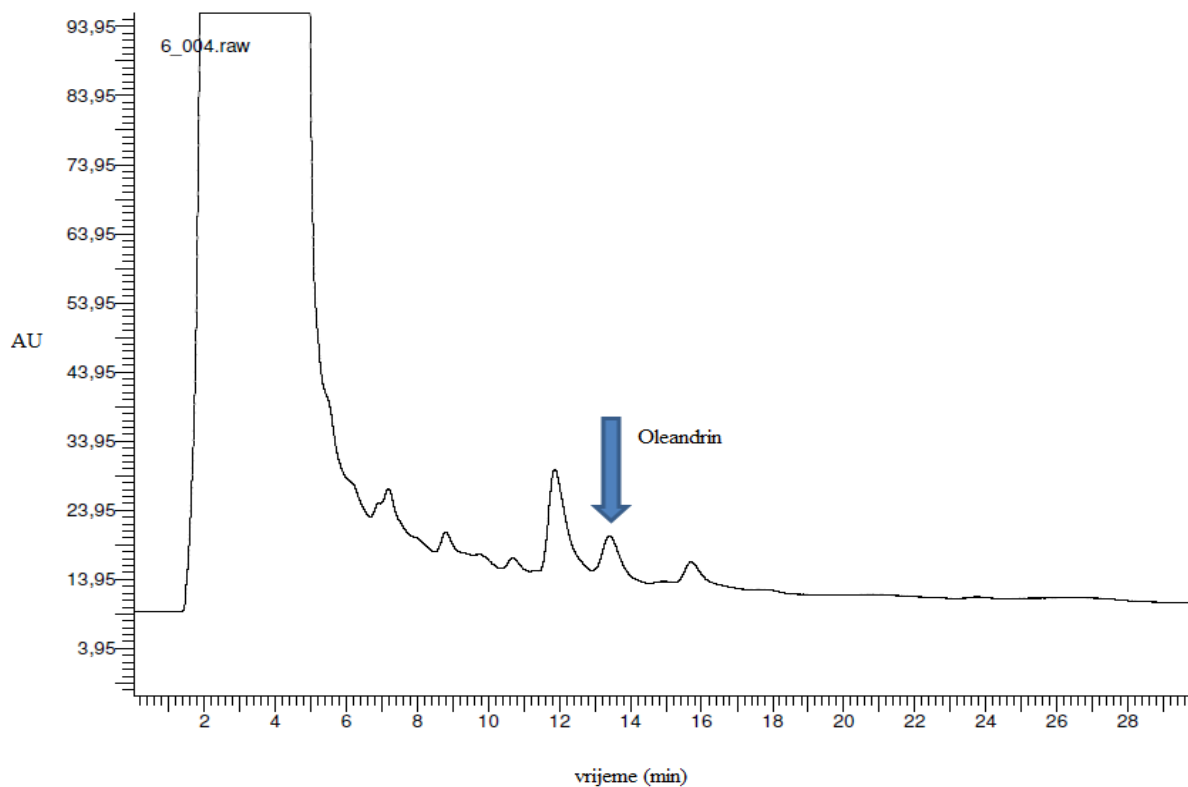
Slika 12. Kromatogram ispitivanja u Alžiru preuzeto iz (13)



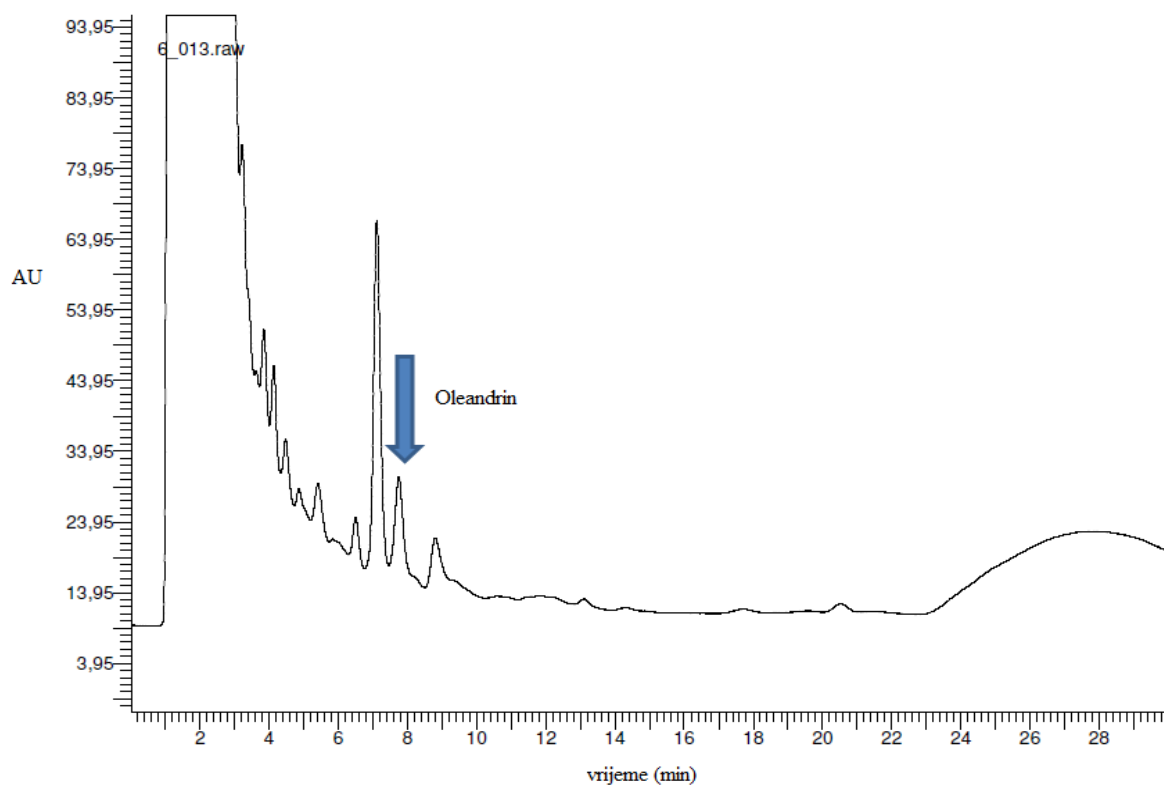
Slika 13. Kromatogram standarda (kolona Eclipse XDB – C18)



Slika 14. Kromatogram standarda (kolona Restek Pinnacle II – C8)



Slika 15. Kromatogram uzorka broj 6 (kolona Eclipse XDB – C18)



Slika 16. Kromatogram uzorka broj 6 (kolona Restek Pinnacle II – C8)

6. ZAKLJUČAK

1. U ispitivanim uzorcima lista oleandera sadržaj oleandrina je bio od 58,50 µg/g do 1703,46 µg/g kod prve ekstrakcije, te 110,75 µg/g do 2288,00 µg/g kod druge ekstrakcije (kolona Eclipse XDB – C18). Kod analize s drugom kolonom (Restek Pinnacle II – C8), kod prve ekstrakcije sadržaj oleandrina u uzorcima je bio 383,00 µg/g do 1662,85 µg/g, a kod druge ekstrakcije 322,75 µg/g do 2197,75 µg/g, što je usporedivo s rezultatima koji su provedeni u Alžiru gdje je sadržaj oleandrina bio od 235,00 µg/g do 3913,00 µg/g.

2. Najveća varijacija u ispitivanjima je kvaliteta ekstrakcije jer unutar paralelnih ekstrakcija istog uzorka rezultati značajno variraju, kako u našem tako i u ispitivanju provedenom u Alžiru te u budućim ispitivanjima treba posebnu pažnju posvetiti ekstrakciji lista.

3. Korištenjem polarnije C-8 kolone u odnosu na manje polarnu C-18 značajno smo popravili izgled signala za oleandrin te time popravili standardno odstupanje, a u konačnici popravili preciznost metode.

7. LITERATURA

1. Sutlović D, et al. Osnove forenzične toksikologije. Split:Redak; 2011. p.5 – 8
2. www.ius.bg.ac.rs/prof/materijali/savslo/TROVANJA.doc (14.08.2018.)
3. Zečević D, et al. Sudska medicina i deontologija. 4th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 132 – 134
4. https://hr.wikipedia.org/wiki/Sr%C4%8Dani_glikozidi
5. Kumar A, De T, Mishra A, Mishra K. A Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity. Pharmacognosy Reviews [serial on the Internet] 2013 May ;vol 7: p. 131 – 138. Available from: www.phcogrev.com
6. <https://www.plantea.com.hr/>
7. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oleandrin#section=Top>
8. Garofalo S, Grimaldi A, Chece G, Porzia A, et al. The Glycoside Oleandrin Reduces Glioma Growth Direct and Indirect Effects on Tumor Cell. The Jurnal of Neuroscience [serial on the Internet] 2017 April; p. 3297. Available from: <http://www.jneurosci.org/>
9. Garland T, Barr A. C, Toxic Plants and Other Natural Toxicants: Genesis to Genesis: A Historic Perspective of Plant Toxicology. Oxon, New York: CABI Publishing; 1998 .p.9
10. Sutlović D, et al. Osnove forenzične toksikologije. Split:Redak; 2011. p.171-186
11. Garland T, Barr A. C, Toxic Plants and Other Natural Toxicants: Monitoring of Physiological and Pathological Changes in Turkey Poults Fed Levels of Potentially Cardiomyotoxic Nerium oleander and Persea americana. Oxon, New York: CABI Publishing; 1998 .p.131-133
12. Barceloux G. D. MEDICAL TOXICOLOGY OF NATURAL SUBSTANCES, Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals: DOGBANE FAMILY and CARDENOLIDES: COMMON OLEANDER. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken; 2008.p.849

13. Nadji S, Abdaoui A, Ouerdane H, Azzouz M, Abtroun R, Reggab M, Bachra A. Determination of Oleandrin Levels by HPLC – DAD in Vegetal Material Collected Throughout Algeria and the Study of Some Influencing Factors. *Research Journal of Phytochemistry*. 2017 March 15; 11: p. 74-84. Available from: www.academicjournals.com

8. SAŽETAK

Naslov ovog diplomskog rada je „Određivanje oleandrina u listu oleandera (*Nerium Oleander L.*)“.

Cilj: Odrediti masu oleandrina u suhoj tvari lista oleandera u 10 uzoraka prikupljenih u tri županije RH

Metode: Uzorci su ispitivani HPLC tehnikom nakon ekstrakcije oleandrina smjesom otapala iz sušenog lista oleandera. Napravljene su dvije ekstrakcije uz mijenjanje načina ekstrakcija i uvjeta kromatografije.

Rezultati: Dobivene vrijednosti kod obje ekstrakcije pokazuju velike razlike u dobivenim masama oleandrina u suhoj tvari koji su prikazani u tablicama 8 i 9, a usporedive su sa rezultatima slične studije provedene u Alžiru

Zaključak: Pri određivanju oleandrina posebnu pažnju treba posvetiti ekstrakciji i za HPLC analizu koristiti polarnije C-8 kolone.

Ključne riječi: toksikologija, toksini, srčani glikozidi, oleander, oleandrin

9. SUMMARY

Title of this master's thesis is "Determination of oleandrine in a leaf of oleanders (*Nerium Oleander L.*)".

Objective: To determine mass of oleandrin in dry leaves of Oleander in 10 samples collected in three regions in Croatia.

Methods: Samples are examined with HPLC technique after extraction of oleandrin with mixture of solvents from dry leaves of Oleander. We made two different extractions and changed conditions in chromatography.

Results: Results for both extractions shows great differences in obtained mass of oleandrin in dry matter which are presented in tables 8 and 9, and comparable to results obtained in similar studies in Algeria.

Conclusion: At determining oleandrin special care must be used in extraction and in HPLC need to be used more polar C-8 column.

Keywords: toxicology, toxins, cardiac glycosides, Oleander, oleandrin

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Pleslić

Datum i mjesto rođenja: 08. 03.1975., Split

Obrazovanje:

1990 – 1993.: Prirodoslovno tehnička škola, Split

2001 – 2007.: Kemijsko – tehnološki fakultet, Preddiplomski studij,

Sveučilište u Splitu

2014 – 2016.: Kemijsko – tehnološki fakultet, Preddiplomski studij,

Sveučilište u Splitu, (razlikovna godina)

2016 – 2018.: Odjel za forenzične znanosti, Diplomski studij,

Sveučilište u Splitu

Znanstveni radovi:

- Bralić M, Prkić A, Radić J, Pleslić I. Preparation of Phosphate Ion – selective Membrane Based on Silver Salts Mixed with PTFE or Carbon Nanotubes.

International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE. 2018; vol 13:1390-1399

- Diplomski rad na temu „Određivanje oleandrina u listu oleandera (Nerium Oleander L)“

Konferencije:

- „The tenth ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine“, Dubrovnik, 2017.

- 2. međunarodna konferencija „Sigurnost povijesnih gradova – izazovi turizma“, Split, 2018.

Seminari:

- „Theory and Practice: Application of Criminological Theories on Contemporary Criminal Justice Issues“, Split, 2017.

Projekti:

- „Prepoznaj i spasi me“, Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Ivana Pleslić, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom „Određivanje oleandrina u listu oleandera (Nerium Oleander L.)“ rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uredenoga rada.

Split, _____

Potpis studenta/studentice: _____