

Simple detection of
some plant metabolites of
veterinary importance by
test examinations

J. Vetter*

K. Gerencsérné Seidl

ÁTE Növénytani Tanszék
H-1077 Budapest, Rottenbiller u. 50.

*e-mail: Vetter.Janos@univet.hu

Állatorvosi jelentőségű növényi hatóanyagok egyszerű kimutatása tesztvizsgálatokkal

Vetter János*, Gerencsérné Seidl Katalin

ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi hatóanyagok sokféle mérgezést okozhatnak gazdasági és társállatainkban is. Ilyen esetben alapvető kérdés, hogy milyen anyagok hatásáról van szó. Az állatorvosi szempontból fontos anyagok gyors, egyszerű kimutatása nagy segítség lehet a szakemberek számára. Jelen közlemény szerzői egyszerű módszereket kívánnak adni az állatorvos kezébe: hatféle hatóanyagcsoport és egy ion (nitrát) kimutatása vagy éppen jelenlétének kizárása érdekében. Munkájuk során egyszerű növényi kivonatokból indulnak ki, a ciánglikozidok, a kumarinok, a cseranyagok, a szívglikozidok, a szaponinok, az alkaloidok és a nitrátionok kimutatását írják le. Pozitív tesztek esetében szükség lehet a pontos mennyiségi meghatározások elvégzésére is.

SUMMARY

The plant phytochemicals (mainly the secondary metabolites) can cause different types of toxicosis in our livestock and companion animals. In such cases (or in case of a suspicion) the chemical composition is very important. The rapid, simple demonstration (or exclusion) of a group of bioactive molecules can basically help the veterinarian's work. The present publication would like to give a methodical guide for the veterinarians. Our publication summarises shortly the affected active compounds and gives methodical descriptions, documented with photos. The list of required chemicals and laboratory instruments is very simple; the number of specific reagents is low. Our work is based on the simple production of a plant extract (1 g plant/20 ml extractant) and demonstrates the following metabolites: cyanogenic glycosides, coumarins, tannins, cardiac glycosides, saponins, alkaloids and the nitrate ion. The HCN was liberated with H_2SO_4 from plants in a closed tube and a reddish colour was formed on a filter paper strip. Coumarins produce a yellow colour under strongly alkaline conditions; the tannins can react with $FeCl_3$ molecules forming a bluish-blackish precipitation. Demonstration of cardiac glycosides is possible by Keller-Kiliani test, whereas a brown-brownish ring is formed at the interface of acetic acid- $FeCl_3$ and of H_2SO_4 . A stable foam layer, produced by shaking, can indicate the saponins. For the detection of alkaloids different reactions were used (including the orange-yellow precipitation by Dragendorff reagent, the bluish-purple colour by PDAB reagent and the brownish ring at the interface by Keller reaction). Nitrate ions can produce a yellow colour with diphenylamine on filtrate paper, induced by UV radiation.

The methods were tested by samples of some frequent plant species, containing the affected metabolites. The presented methodical list can be developed according to possibilities and requirements of colleagues. We hope that the present publication can be useful for the veterinarians.

A növényi mérgezések (fitotoxikózisok) vagy más, a takarmányokban lévő hatóanyagokra visszavezethető állategészségügyi problémák egyértelmű kimutatása nem könnyű feladat. Ennek oka az is, hogy a takarmányok összetétele gyakran nem, vagy csak részben ismert. Ha a beltartalmi összetétel mégis ismert, akkor az az ún. klasszikus takarmányvizsgálat adatait (nyersfehérje, -zsír, -hamu, ill. energiatartalom, esetleg néhány ásványi elem mennyisége) tartalmazza.

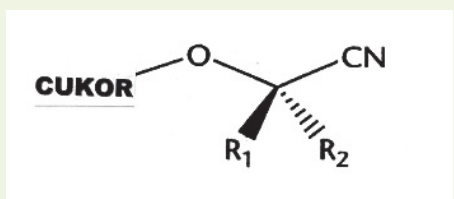
Jogos kérdés, nem lehetséges-e, hogy a szakemberek egy adott eset kapcsán a (növényi) takarmánymintákból, egyszerű, könnyen elvégezhető tesztvizsgálat-sorozattal erősítsék meg (vagy éppen zárják ki) a szóban forgó bioaktív molekula jelenlétét. Az adott vegyület jelenlétekor célszerű ezek mennyiségét szaklaboratóriumban meghatározni.

Jelen cikk célja néhány fontos növényi hatóanyag (beleértve a nitrátiont is) rövid áttekintése, egyben a kimutatásukra szolgáló tesztreakciók ismertetése, megvalósításuk pontos leírása, a munka kapcsán készült fotókkal illusztrálva.

A növényi mérgezések egyértelmű kimutatása nem könnyű feladat

CIÁNGLIKOZIDOK

Aminosavakból szintetizálódó α -hidroxinitrilek glikozidjai (1. ábra), amelyek enzimatis (vagy spontán) hidrolízise vezet a cianogenezishez, azaz HCN-molekulák felszabadulásához. Napjainkban több mint 60 ilyen vegyület ismert, amelyek a növényvilág 130 családjának, körülbelül 2600 fajában fordulnak elő (27). A harasztok (*Pteridium*, *Microgramma* fajok), a nyitva- (*Taxus*, *Cycas* nemzetségek) és (főként) a zárvatermők törzsében mutathatjuk ki jelenlétüket. A kétszikűek valamennyi alosztályában vannak cianogén fajok, míg az egyszikűek érintettsége kisebb: itt legfontosabb a *Poaceae* (pázsitfűfélék) családja, több kiemelkedő jelentőségű fajjal, nemzetséggel (pl. a cirokfajok).



1. ÁBRA. A ciániglikozidok általános szerkezete

FIGURE 1. The general chemical structure of cyanogenic glycosides

A cianidok gátolják a végoxidációt, heveny mérgezésük fulladásos halálhoz vezet

A kumarin legfontosabb biológiai hatása a véralvadási folyamat gátlása, azaz vérzések előidézése

A cianogén növények állati szervezetbe jutását követően két lehetőség van: heveny, gyors lefolyású mérgezés alakul ki, vagy a fogyasztó kisebb ciánkoncentrációk hosszabb idejű hatásának van kitéve. Az első: rövid időn (1–2 óra, de akár 15 percen) belül kialakuló mérgezés („a hirtelen halál” szindróma), amelynek tünetei: nehézlégzés, reszketés, izomgörcsök és koordinálatlanság. Az elpusztult állatokban cianotikus nyálkahártyák, sötétebb izomzat, tüdőödéma és vérzések láthatók.

A hatás sejttani lényege: a cianidion, a ferriionokhoz kapcsolódva gátolja a mitokondriális végoxidázt (citokróm a3), így az elektrontranszportot és az O_2 -átvitelt.

Az idült mérgezések során – a legtöbbször meglévő méregtelenítési kapacitás kimerülését követően – a viszonylag kevés cianid okozhat káros hatást pl. lovak és szarvasmarhák esetében (a perifériális idegrendszer mielinhévelyének károsodása egyes idegi funkciók kiesését jelenti). A kisebb cián (cianid) mennyiség emberre gyakorolt hatását egyébként többféle humán megbetegedés is mutatja (14).

KUMARINOK

A fenoloid jellegű kumarin származékok (amelyek nevüket az elsőként megismert ilyen növény helyi nevéből: „coumarou” kapták /10/) a növényekben glikozidokként fordulnak elő. Harminc család több száz növényfajában találtak azóta anyagokat, legtöbbször a kétszikű *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae* családokhoz, ill. az egyszikű pázsitfűvekhez (*Poaceae*) tartoznak. Leggyakoribb kumarin hordozó növényeink a szagos müge (2. ábra, A), a fehér virágú somkóró (2. ábra, B), a sárga virágú somkóró (2. ábra, C) és a szagos borjúpázsit (2. ábra, D). Kémiai szempontból a kumarinszármazékok legfontosabbjai az egyszerű kumarinok (mint az esz-kuletin, az umbelliferon) és a furanokumarinok. A kumarin (ill. a belőle, bizonyos feltételek között létrejövő dikumarol) legfontosabb biológiai hatása a véralvadási folyamat gátlása, azaz vérzések előidézése. A dikumarol a K_1 -vitamin antago-

nistájaként működik, s okozza a véralvadás lassulását, vagy akár teljes hiányát. A penészes somkóró szénáját fogyasztó szarvasmarhák halálos vérzéssel járó mérgezést szenvedhetnek. A somkóró szárdarabjaiban tenyésző közönséges gombafajok (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium*, *Fusarium* vagy *Mucor* fajok) enzimreakciókban alakítják át a kumarint dikumarollá. A rosszul szárított széna tehát dikumarolt tartalmazhat (12).

2. ÁBRA. Kumarintartalmú gyakori növényeink

A. Szagos müge B. Fehér virágú somkóró; C. Sárga virágú somkóró; D. Szagos borjúpázsit

FIGURE 2. Coumarin-containing common plants

A. Sweet woodruff; B. Honey clover; C. Yellow sweet clover; D. Sweet vernal grass



A dikumarol kompetitív módon gátolja az aktív K-vitamint termelő enzimet

A dikumarol gyorsan szívódik fel és fejti ki hatását a K-vitamin aktív formáját termelő enzim kompetitív gátlójaként. A dikumaroltartalmú széna fogyasztása – koncentrációtól függően – néhány héten belül fejtheti ki hatását és a toxikus széna több éven át megőrzi e tulajdonságát. A kumarin mérgezés kapcsán nagy, bőr alatti véromlányok keletkeznek, s ez a vérvesztés halálos is lehet.

TANNINOK

A tannin szó a nagy, polifenolokat tartalmazó molekulákat jelöli, amelyek hidroxil- és karboxil-csoportjaik révén az állati eredetű makromolekulákkal komplexeket képeznek. Fő csoportjaik: a galluszsav-monomerekből álló, hidrolizálható tanninok, és a flavon-monomereket tartalmazó, nagyobb molekulatömegű, kondenzált tanninok

A tanninok főként emésztőszervi tüneteket okoznak

A szíviglikozidok a szívizom működését igen kis adagban serkentik, a mérgező dózisos azonban a szívizom működését leállásukat is okozhatják

A szaponinok a sejtek membránjába épülve azok károsodását okozzák

(8). Különösen sok tannintartalmú növény van a *Fabaceae*, a *Betulaceae*, a *Rosaceae*, még inkább a bükkfafélék (*Fagaceae*) családjában, ahol főként a levelek és a magok (termések) tartalmazzák a vegyületet. Biológiai szerepük a növényevőkkel szembeni védelem, de hatnak az állatfajok táplálékfelvételére is (csökkent az ízletesség, lassul az emésztés és felléphet táplálékkelutasítás). A szarvasmarhánál szorulás, barna színű vizelet lehetnek az első jelek, később vesebántalmak, levertség és bendőpangás mellett durvább szőrzet, véres hasmenés és hasi érzéketlenség léphet fel. Egygyomrú állatoknál gyomor-bélrendszeri tünetek sora jelentkezik: kólika, lassuló perisztaltikus aktivitás, székrekedés. Súlyosabb esetben véres hasmenés, sárgaság fordulhat elő (17).

SZÍVGLIKOZIDOK

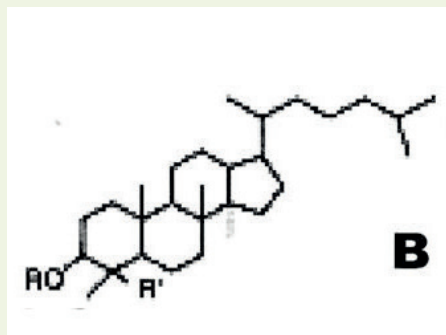
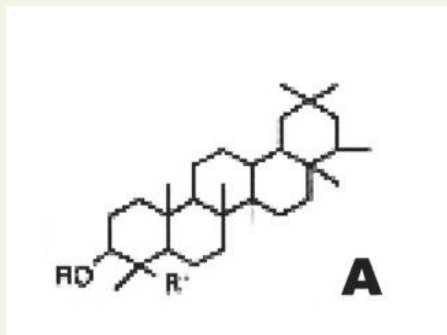
WILLIAM WITHERING skót orvos 1795-ben számolt be a gyűszűvirágok szívizom működésre gyakorolt hatásairól. A *Digitalis*-fajok szív- és érrendszerre kifejtett hatása erős, akár halálos is lehet. E glikozidok nem cukor részei (aglikonjuk) a diterpenoid származékok közé sorolhatóak: a C_{23} -as kardenolidokként vagy a C_{24} -es bufodienolidokként fordulnak elő. A szíviglikozid-tartalmú növények gyakori példái a gyűszűvirág mellett a hunyor- (*Helleborus*), a hérics- (*Adonis*) fajok, a májusi gyöngyvirág (*Convallaria majalis*), a farkasbogyó (*Paris quadrifolia*) vagy éppen a leander (*Nerium oleander*). E vegyületek a szívizom működését igen kis adagban serkentik, ill. stabilizálják, a mérgező dózisos azonban (amelyek viszonylag közel vannak a gyógyászatban alkalmazottakhoz) a szívizom működését leállásukat is okozhatják. A leander glikozidjának mérgezése pl. néhány órán belül hasi fájdalmakat, gyengeséget, bendőatóniát, hányást, nyálzást idéz elő (9). A kezdeti bradikardiát gyenge, szabálytalan pulzus követi, később tachikardia és kamrai ritmuszavar lép fel. Mindezek halállal végződhetnek.

SZAPONINOK

A vegyületek neve a latin *sapo* (szappan) szóból származik, ami egyben utal felületaktív, habképző jellegükre. A szaponinok olyan glikozidok (6), amelyek aglikonja (szapogenin) C_{30} -as triterpén vagy ritkábban C_{27} -es szteroid jellegű molekula (3. ábra). Előbbiek főként a kétszikű, utóbbiak inkább az egyszikű növényekben fordulnak elő. Triterpén karakterű szaponinokban gazdagok a pillangósvirágúak (*Fabaceae*), a szegfűfélék (*Caryophyllaceae*), míg az *Agave*-félék, vagy éppen a liliumfélék szteroid jellegű szaponinokat tartalmaznak. A szaponinok jórészt a gyökereikben halmozódnak fel (mint a szappanfűben), máskor azonban levelekben (lucerna és egyéb pillangósok), ill. termésben, magokban is jelen vannak. A molekulák szapogenin részükkel beépülnek a membránba, komplexeket ún. plakkokat képeznek a szterollokkal (2). A membránszerkezet károsodik, és ez vezet azután további biológiai következményekhez, mint pl. a vörösvérsejtek hemolíziséhez. A szaponinok hemolitikus hatásán alapuló mérési módszert korábbi, hazai vizsgálataink is számszerűsítik (24, 26).

3. ÁBRA. A. A triterpenoid típusú szapogeninek; B. Szteroid típusú szapogeninek

FIGURE 3. A. Sapogenins of triterpenoid type; B. Sapogenins of steroid type



A szaponin tartalmú takarmány (tápanyag) fogyasztását hasmenés, esetleg hányás követi. Súlyosabb esetben étvágycsökkenés, nyálfolyás, felfúvódás, kólika és testhőmérséklet-csökkenés következik be.

A szteroid típusú szaponinok esetében oldhatatlan kalcium-vegyületeik képződnek, főként az epevezetékben. E kristályos jellegű anyagok felhalmozódása az ún. másodlagos fényérzékenység tüneteire hasonlít: az állatok levertek, csökkent étvágyúak, viszketések, esetleg sárgaság lép fel, a vizelet sötét, sárgás-barna lesz, a kevésbé pigmentált bőrfelületek kipirulnak, megduzzadnak, majd berepedeznek és elhalnak (4).

Az alkaloidok a másodlagos növényi anyagcseretermékek legnagyobb, legfontosabb csoportját képező molekulák

Biológiai hatásuk legtöbbször erőteljes

A nitrátmérgezés methaemoglobinaemia kialakulásához vezet

ALKALOIDOK

A másodlagos növényi anyagcseretermékek legnagyobb, egyben talán legfontosabb csoportját képező, legtöbbször erőteljes biológiai hatású molekulák. Nevük a sok képviselőjüket jellemző bázikus tulajdonságukból ered. Aminosav eredetű, egy vagy több N-atomot – legtöbbször heterociklusban – tartalmazó, sóképző anyagok.

Napjainkban körülbelül 14 000 növényi eredetű alkaloid ismert. Az állati eredetű alkaloidok száma elég kevés, ilyen pl. a batrachotoxin, amely a *Phyllobates* béka-nemzetség bőrében képződik (1). Az algák, mohák csoportjaiból alig ismerünk ilyen vegyületet. A harasztok törzsében a *Lycopodium*, az *Equisetum*-nemzetség és néhány páfrányfaj tartalmaz alkaloidokat. A nyitvatermők csoportjában a tiszafa (*Taxus*) alkaloidok jelentősek, míg a zárvatermők több családjában tartalmaz igen sokféle alkaloidot: a kétszikű burgonyafélék (*Solanaceae*), a mákfélék (*Papaveraceae*), a pillangósvirágúak (*Fabaceae*) vagy éppen az egyszikű kikericsfélék (*Colhicaceae*).

NITRÁT

A nitrát a növények egyik igen fontos szervesetlen nitrogénforrása. A növényekbe kerülve nitritté, majd ammóniává redukálódik. Egy adott pillanatban azonban egyes növények jelentős mennyiségben tartalmazhatnak (halmozhatnak fel) nitrátot, mint pl. az *Amaranthus*, a *Chenopodium*, a *Solanum* fajok, vagy éppen a cirkok (15).

A kérődző állatokban – a bendő mikrobái révén – a nitrátból nitrit képződik, s ez gyorsabb, mint a nitrit továbbalakulása ammóniává. A nitrit egy része felszívódik, s a vér hemoglobinjában a ferroionok ferriionokká oxidálódnak, azaz a hemoglobinnál methemoglobin keletkezik. Ha a vér methemoglobin-szintje eléri a 30–40%-ot, már klinikai tünetek lépnek fel, a 80%-os methemoglobin-koncentráció már halálos, az oxigénszállítás elégtelen volta miatt.

A kérődzők esetén a sok nitrát felvételét követő 1–4 órán belül tünetek léphetnek fel. Az oxigénhiányt a légszomj, gyengeség, mozgásképtelenség, szapora szívverés, levertség, cianotikus nyálkahártyák, ájulás, görcsök jellemzik. A halálos nitrátmérgezőkor a vér csokoládé színű, a szövetek barnás színárnyalatúak.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az egyes növényteszteket általában a Növénytani Tanszék korábban begyűjtött, szárított növényanyagán, máskor frissen gyűjtött vagy mélyhűtött növényeken végeztük (így pl. a nitrátion vizsgálatakor). Legtöbbször az egész növény porrá őrölt mintáját használtuk fel, máskor csak egy-egy növényi rész (gyökér, szár, levél, mag/termés/ esetleg virág) képezte a vizsgálatok anyagát. Az anyarozs-alkaloidok esetében az objektumok a gomba szkleróciumai voltak, amelyeket korábban a Gyógynövénykutató Intézetből (Budakalász) szereztünk be. A fent említett alapanyagokból vizes és/vagy 70%-os etanolos kivonatot készítettünk (1 g anyag/20 ml kivonó), rázógépen (2 óra 175 rpm). A kivonatot Büchner-tölcsérral szűrtük, néhányszor centrifugával is (10 000 rpm, 10–15 perc) tisztítottuk. A tesztek során felhasznált vegyszerek Reanal Labor gyártmányúak és alt. minőségűek voltak (az ettől eltérést jelezzük).

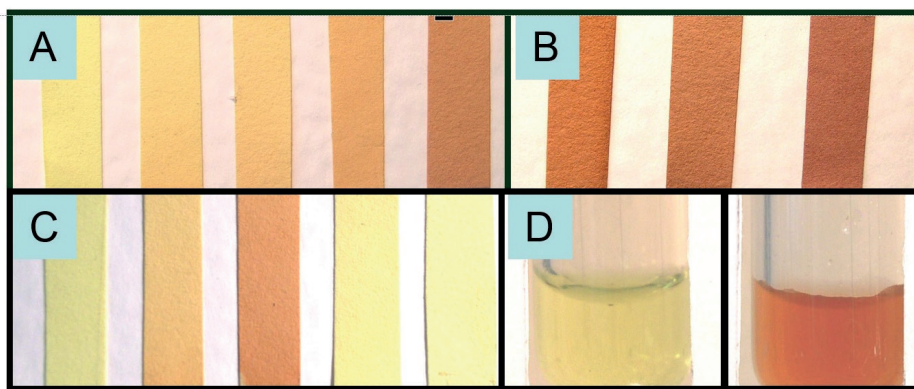
A kimutatási reakciókat a szakirodalom alapján (több esetben azokat módosítva) végeztük el, amelyek részleteit nem itt, hanem az egyes anyagok kimutatása kapcsán, az eredmények részfejezeteiben közöljük.

EREDMÉNYEK

CIÁNGLIKOZIDOK

A kimutatási módszer elve: a növényi cián-glikozidokból savas közegben felszabadított HCN-molekulák a Na-pikráttal vörös Na-izopurpurátot képeznek. A kimutatásra szűrőpapírtesztet dolgoztunk ki: Schleicher-Schüll 2043 b típusú kromatográfiás papírt merítettünk pikrinsavas reagensbe (25 nyomán), majd a megszáritott szűrőpapírból 40 mm × 8 mm-es tesztsíkokat vágunk ki. Tesztedényként 10 cm-es csöveket használtunk, amelyek gumidugójához rögzítettük a tesztsíkokat. A ciánglikozid-tartalmú növényi részek 0,5–1,0 grammját kis mozsárban vízzel, kevés kvarchomokkal eldörzsöltük, majd a tesztsíkra helyeztük, 0,5 ml 3 N HCl-at adtunk hozzá, azonnal zártuk a szűrőpapírt a légtérbe tartó dugóval és a csöveket 40 °C-os termosztátba helyeztük 15–20 perces inkubációs időre. A kalibráláshoz a KCN különböző mennyiségeit alkalmaztuk.

A növényi cián-glikozidokból savas közegben felszabadított HCN-molekulák a Na-pikráttal vörös Na-izopurpurátot képeznek



4. ÁBRA. Ciánglikozidok kimutatása pikrinsavas papírteszttel

A: cianid-koncentrációsor (balról jobbra: 0, 5, 10, 20, 100 µg KCN); B: balról jobbra: a lencsíránóvények, a sárgabarack- és az őszibarackmagok tesztjei; C: a friss szarvaske-rep különböző szerveinek ciántartalmai, balról jobbra kontroll, a virág, a levelek, a szár és termések; D: a pikrinsav és a Na-izopurpurát (jobbra) színe a papírból történt vizes kioldás után

FIGURE 4. Detection of cyanogenic glycosides by paper tests (picric acid)

A: concentration series of cyanide (from left to right: 0, 5, 10, 20, 100 µg KCN); B: from left to right: tests of flax seedlings, seeds of apricot, seeds of peach; C: cyanide contents in different organs of fresh bird's-foot trefoil: from left to right control, flowers, leaves, stems and fruits. D: colours of picric acid and of Na-isopurpurat (right) after the release with water

A cianid pikrinsavas papírral történő kimutatása szerint már 5 µg KCN is észlelhető

A cianid pikrinsavas papírral történő kimutatása (4. ábra, A) szerint már 5 µg KCN is észlelhető a keletkező Na-izopurpurát vörös színeződése révén. A legnagyobb koncentráció (100 µg KCN) erős vörös színt ad (4. ábra, A utolsó papírcsík). A növényi minták közül a 7 napos len (*Linum usitatissimum*) csíránóvények (5 db) eldörzsölt anyaga, az őszibarack- és a sárgabarackmagok (0,25 g mag 1 ml desztillált vízben eldörzsölve) tesztjei igen erős reakciót adtak (4. ábra B részén balról jobbra) jelezve a vizsgált növények jelentős ciánglikozid tartalmát. A szarvaske-

rep (*Lotus corniculatus*) mintáit frakcionáltuk (virág, levelek, szár és termések) és mélyhűtőben tároltuk a vizsgálatig. Az egyes növényi szervekből 0.3 g-nyi friss tömeget dörzsöltünk el és teszteltünk. A levelek tartalmazzák a legtöbb ciánt (balról a harmadik), ezt követi a virágokban lévő cián szint (balról a második), míg a szárakban és a termésekben (balról negyedik, ötödik csík) nincs kimutatható mennyiség (4. ábra, C).

A papíron keletkezett szín alapján értékelt tesztek mellett lehetőség van a színanyagnak 1–1 ml desztillált vízzel való kioldására, majd az oldatok összehasonlítására (4. ábra, D), vagy akár az oldatok színének műszeres mérésére is.

KUMARINOK

A kumarinok kimutatása a szakirodalom azon megállapításán alapszik (20, 23), hogy a kumarin tartalmú oldat (kivonat) erősen lúgos közegben sárga színreakciót ad. A reakcióközeg összetétele:

Anyag	Mennyiség (ml)
Kivonat	X (0,1–1,0)
Deszt. víz	1–X
10%-os NaOH	2,0

„Standard” anyagként eszkulin-oldatokat alkalmaztunk 250 µg és 1000 µg bemérések között. Az eszkulin 500 µg-ja jól észlelhető, sárga színt adott. Teszt-növényeink a fehérvirágú (*Melilotus albus*) és a sárgavirágú somkóró (*Melilotus officinalis*) voltak, amelyekből a korábban jelzett módon készítettünk kivonatokot, ill. 5×-ös hígításokat. A közölt képeken (5. ábra B, C) a kivonatok erős sárga színét mutatjuk be, a kumarint nem tartalmazó reakcióelegy igen halvány színeződése a növénykivonat alapszíne (5. ábra A). A közismert kumarin tartalmú növények kivonatait (1 g/20 ml extraháló szer) 5× hígítva is egyértelműen kimutatható a kumarin jelenléte.

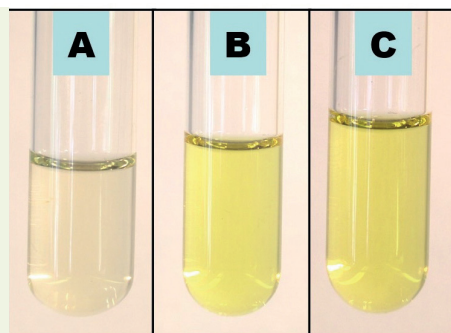
A kumarinok kimutatása azon alapszik, hogy oldataik erősen lúgos közegben sárga színreakciót adnak

5. ÁBRA. Kumarinok kimutatása

A: a teszt alapszíne; B: A fehérvirágú somkóró kivonatának (0.5 ml) színreakciója; C: A sárgavirágú somkóró 0.5 ml-es kivonatának reakciója

FIGURE 5. Detection of coumarins

A: Basic colour of the test; B: Extract (0.5 ml) of white sweet clover; C: Extract (0.5 ml) of yellow sweet clover



TANNINOK

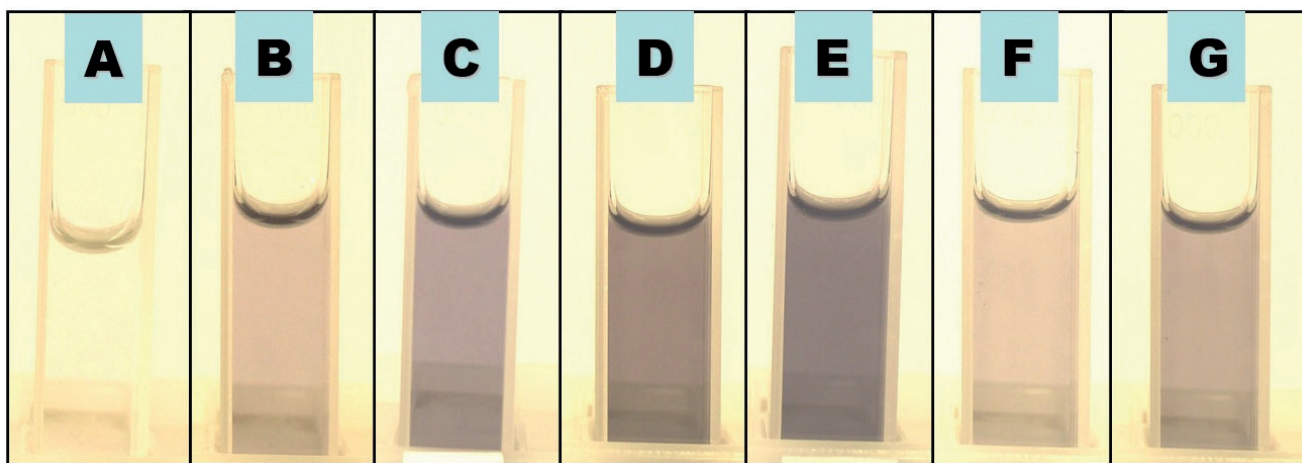
A tanninok kimutatására használt (leírt) reakciók vizes és/vagy etanolos, esetleg rövid ideig főzött vizes kivonatokból indulnak ki. A legtöbb módszerben 1–10%-os FeCl₃-oldattal reagáltatják a tanninokat, amelyek kékes-feketés színű, opálos kicsapódásokat okoznak (7, 16, 18). Más módszereknél a kimutatás alapját az 1%-os ólomacetáttal képzett, sárgás csapadék adja (16). Standard anyagként cseszavkésztmény (Reanal) vagy galluszsav-oldat használható. Módszerünkben forralásos kivonás (3 perc) történt, majd a szűrt kivonatból az alábbi reakció elegyet állítottuk össze:

A tanninok 1–10%-os FeCl₃-oldattal reagáltatva kékes-feketés színű, opálos kicsapódásokat okoznak

Anyag	Mennyiség (ml)
Kivonat	x (0,1–1,0)
Deszt. víz	3-x
FeCl ₃ (1%-OS)	1 csepp (kb. 0,03 ml)

Kimutatási határ: 100 µg csersav jelenlétét már egyértelműen észlelni lehet (6. ábra, B), a 200 µg csersav pedig már igen jellegzetes, kékes színű oldatot adott (6. ábra, C). Az ólom-acetátos reakció csak kb. 200 µg-nál okoz gyenge opalizációt.

Az alkalmazott tesztnövények: a cserszömörce (*Cotinus coggygria*), a csertölgy (*Quercus cerris*) hajtásai, termései, valamint a nagy cseranyagtartalmú tea (*Camellina sinensis*) leveleinek forrázata. A cserszömörcehajtás kivonatának 0,02 ml-e már jelentős szint eredményezett (6. ábra, D). A csertölgy hajtásában (6. ábra, E) lényegesen kisebb a tannin mennyisége, hiszen a kivonat 0,2 ml-e csak kevésé múlja felül a cserszömörce kivonat 0,02 ml-ének színét! A csertölgy termésének kivonatánál a szín már észlelhető, de halvány (6. ábra, F). A tealevél kivonatának 0,1 ml-e jól észlelhető, kb. 150 µg-nyi tannint jelez (6. ábra, G). „Negatív” standardként hasonló tesztelést végeztünk a bürök (*Conium maculatum*) és a csattanó maszlag (*Datura stramonium*) növényekkel, ezeknél az oldat halvány alapszíne nem változott.



6. ÁBRA. A tanninok kimutatása

A: A teszt alapszíne; B: 100 µg csersav; C: 200 µg csersav; D: cserszömörcehajtás kivonata, 0,02 ml; E: csertölgyhajtás kivonata, 0,2 ml; F: csertölgytermés kivonata, 0,3 ml; G: zöldteakivonat, 0,1 ml

FIGURE 6. Detection of tannins

A: Colour of control B: 100 µg tannic acid; C: 200 µg tannic acid; D: shoot extract of *Cotinus coggygria* 0.02 ml; E: shoot extract of turkey oak, 0.2 ml; F: fruit extract of turkey oak, 0.3 ml; G: extract of green tea, 0.1 ml

A *Digitalis* és más növényi szívglikozidok kimutatására a Keller–Kiliani-teszt alkalmazható

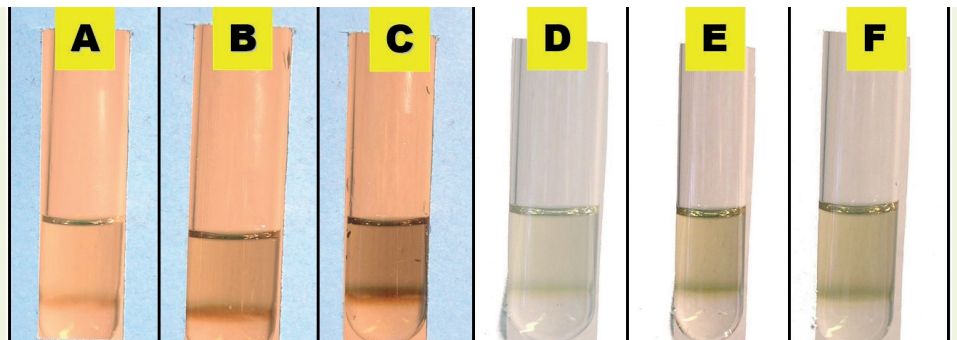
SZÍVGLIKOZIDOK

A *Digitalis* és más növényi szívglikozidok kimutatására a Keller–Kiliani-tesztet alkalmaztuk (16). A kivonatot olyan jégcettel reagáltatjuk, amely kevés 2%-os FeCl₃-ot tartalmaz (10 ml jégcetet + 0,1 ml 2%-os FeCl₃), ehhez óvatosan, ferdén tartott kémcsőben hideg, koncentrált kénsavat adunk. Pozitív reakció esetén az alul lévő kénsavréteg és a fölötte elhelyezkedő jégcetes kivonat határfelületén barna (barnás), esetleg feketés gyűrű alakul ki. A kialakuló gyűrű egy ideig megmarad.

A reakcióelegy összetétele:

Anyag	Mennyiség (ml)
kivonat	x (0.1–1.0)
deszt. víz	1–X
FeCl ₃ -os jégecet	1,0
cc. H ₂ SO ₄	1,0

A tesztelt növények: piros gyűszűvirág (*Digitalis purpurea*: levél), májusi gyöngyvirág (*Convallaria majalis*: levél) őrleményei. A piros gyűszűvirág kivonatának már 0,1 ml-e is jól észlelhető gyűrűt hozott létre (7. ábra, A). A kivonat 0,25 ml-e, ill. 0,5 ml-e lényegesen erősebb gyűrűket eredményezett (7. ábra, B és C), s itt a gyűrű feletti oldatrész színe is erősödik. A jól látható, élesebb, gyűrűk kialakulásához igen fontos, hogy a tömény kénsavat lassan, óvatosan, a ferdén tartott kémcsőbe adagoljuk, azaz rétegezzük a csőben lévő oldat alá. A gyöngyvirág (*Convallaria majalis*) levelének kivonatai gyengébb színű (ráadásul kicsit más árnyalatú) gyűrűt eredményeztek: a képen a 0,5 ml; a 0,75 ml és az 1 ml kivonattal észlelhető gyűrűt mutatjuk be (7. ábra D, E, F). A szívglikozidok kimutatására korábban inkább a 3,5-dinitrobenzoesav tartalmú reagenst használták a Kedde-féle reakcióban (13), amelyhez nincs szükség tömény kénsavra. Az újabb munkák (11, 16, 21, 28) a Keller–Kiliani-reakciót részesítik előnyben.



7. ÁBRA. Szívglikozidok kimutatása

A: Piros gyűszűvirág levélkivonata 0,1 ml; B: Piros gyűszűvirág levélkivonata 0,25 ml; C: Piros gyűszűvirág levélkivonata 0,50 ml; D: Gyöngyvirág levélkivonata 0,50 ml; E: Gyöngyvirág levélkivonata 0,75 ml; F: Gyöngyvirág levélkivonata 1,0 ml

FIGURE 7. Detection of cardiac glycosides

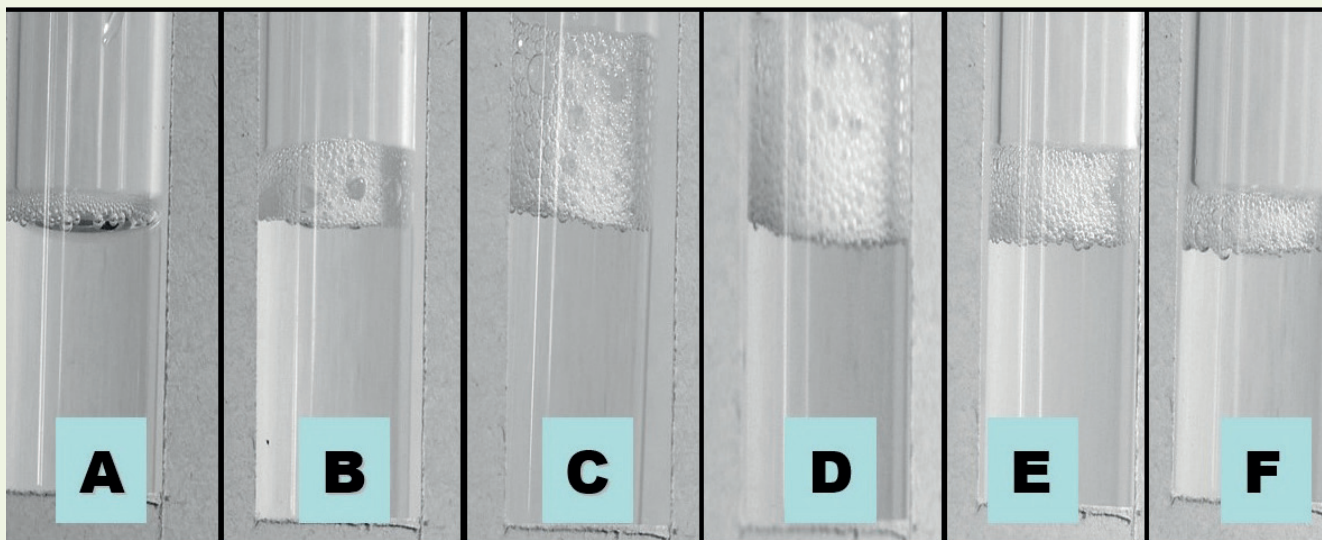
A: Leaf extract of purple foxglove 0.1 ml; B: Leaf extract of purple foxglove 0.25 ml; C: Leaf extract of purple foxglove 0.50 ml; D: Leaf extract of lily of the valley 0.50 ml; E: Leaf extract of lily of the valley 0.75 ml; F: Leaf extract of lily of the valley 1.0 ml

A szaponinok kimutatására legtöbbször felhasznált tulajdonságuk feltűnő habzási képességük

SZAPONINOK

A szaponinok kimutatására legtöbbször felhasznált tulajdonságuk feltűnő habzási képességük, ezért a szaponin tartalmú növényi kivonatot azonos körülmények között rázzuk (rázatjuk), majd megállapítjuk, kialakult-e tartósan megmaradó habréteg. A standard szaponin-oldatot a *Quillaja saponaria* faj kérgéből izolált szaponinból (Sigma) készítettük, 0,00035 és 0,5%-ok közötti hígításokkal). Minden esetben 4–4 ml oldatot ráztunk kémcsőben kézzel, 60 másodpercig. A rázás végezhető más-képp is, pl. laboratóriumi vortexen. Azonosan ráztuk az alábbi növények kivonatait: konkoly (*Agrostemma githago*) magok; lucerna (*Medicago sativa*) magok és széna.

Megállapíthattuk, hogy már a legkisebb szaponinkoncentráció is (0,00035%) egyértelmű habképződést eredményezett (8. ábra, A), a 0,007%-os koncentráció habképző sajátsága már igen jellegzetes (8. ábra, B). A lucernaszéna kivonatának 2 ml-e látványos habképződést mutat (8. ábra, D). A lucernamagok szaponin tartalma (8. ábra, E) jócskán elmarad a hajtás szaponin szintjétől. A konkoly (*Agrostemma githago*) magjának kivonata lényegesen gazdagabb szaponinban, hiszen az azonos módon készült kivonat 0,1 ml-ének habzóképesége (8. ábra, F) majdnem eléri a lucerna mag 2,0 ml-ének hatását (8. ábra, E).



8. ÁBRA. Szaponinok kimutatása habzási teszttel

A: 0,00035 % standard szaponin; B: 0,007% standard szaponin; C: 0,035% standard szaponin; D: Lucernaszéna kivonata 2,0 ml; E: Lucernamag kivonata 2,0 ml; F: Konkoly magkivonat 0,1 ml

FIGURE 8. Detection of saponins by foaming tests

A: 0.00035 % of saponin standard; B: 0.007% saponin standard; C: 0.035% saponin standard; D: Extract of alfalfa hay, 2.0 ml; E: Extract of alfalfa seeds, 2.0 ml; F: Extract of corn-cockle seeds, 0.1 ml

Az alkaloidok kimutatására az általánosan használt Dragendorff-reagens, a PDAB-és a Keller-reakció alkalmazható

ALKALOIDOK

Az alkaloidok kimutatására az általánosan használt Dragendorff-reagenst, ill. az anyarozs-alkaloidoknál a p-dimetilaminobenzaldehid-es (PDAB) reakciókat, ill. a Keller-reakciót is alkalmaztuk (3, 18, 19, 22). Megjegyzendő, hogy az alkaloidok nagy száma és sokrétűsége miatt minden alkaloidtípusra egyformán érzékeny reakció nem létezik.

A Dragendorff-reagens készítése:

„A” oldat: 0.5 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ oldandó 20 ml 20%-os ecetsavban.

„B” oldat: 40%-os KI.

Dragendorff-reagens: 20 ml „A” oldat + 5 ml „B” oldat + 70 ml deszt. víz.
A reakcióelegy összetétele:

Anyag	Mennyiség (ml)
kivonat	0,5
1%-os sósav	1,0
Dragendorff-reagens	5 csepp

A PDAB-reagens készítése:

125 mg PDAB oldandó 100 ml 65 %-os kénsavban + 0.05 ml 5%-os FeCl_3 .

A reakcióelegy összetétele:

Anyag	Mennyiség (ml)
kivonat	0,5
PDAB-reagens	1,5

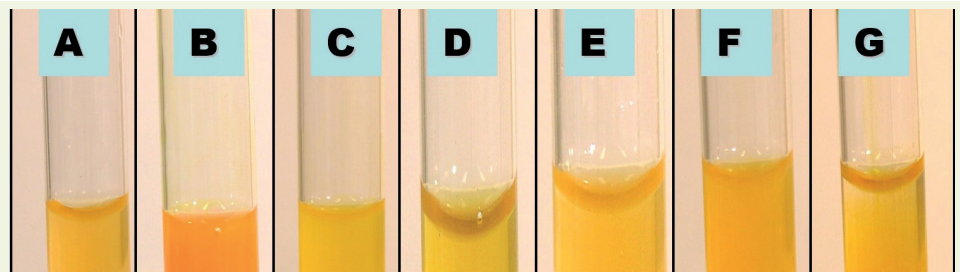
A Keller-reakció reagense:

50 ml jégecet+ 0.05 ml 5%-os FeCl_3 . A reakcióelegy összetétele:

Anyag	Mennyiség (ml)
jégecetes reagens	1,0
kivonat	X (0,1–1,0)
1%-os HCl	1–X
cc. H_2SO_4	1,0

Alkaloid tartalmú növényekként a csattanó maszlag (*Datura stramonium*), az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) magjait, a bürök (*Conium maculatum*) terméseit, valamint az anyarozs (*Claviceps purpurea*) szkleróciumait teszteltük. Standardokként a spartein szulfát (Sigma), a boldin (Sigma), valamint az ergokrisztin oldatai szolgáltak. A kivonószerként kipróbált 1%-os HCl hatékonyabb volt, mint a desztillált víz.

a. Dragendorff-reakció. A spartein szulfát 75 μg -ja már egyértelmű, sárga-narancssárga reakciót adott a Dragendorff-reagens 5 cseppjével (9. ábra, A), míg a 150 μg alkaloid esetén a szín már erősebb, s a csapadékképződés is egyértelmű (9. ábra, B). A boldin alkaloid 300 μg -ja már egyértelműen kimutatható, sárga-narancssárga kicsapódást okoz (9. ábra, C). A tesztnövények reakcióit illetően: a csattanó maszlag (*Datura stramonium*) hajtásának és a bürök (*Conium maculatum*) magjának, valamint az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) mag kivonatainak 1–1 ml-jei már érzékelhetően reagálnak a reagenssel (9. ábra, D, E, F). Az anyarozs kivonata 1 ml-e pozitív reakciót adott (9. ábra, G).



9. ÁBRA. Alkaloidok kimutatása Dragendorff-reagenssel

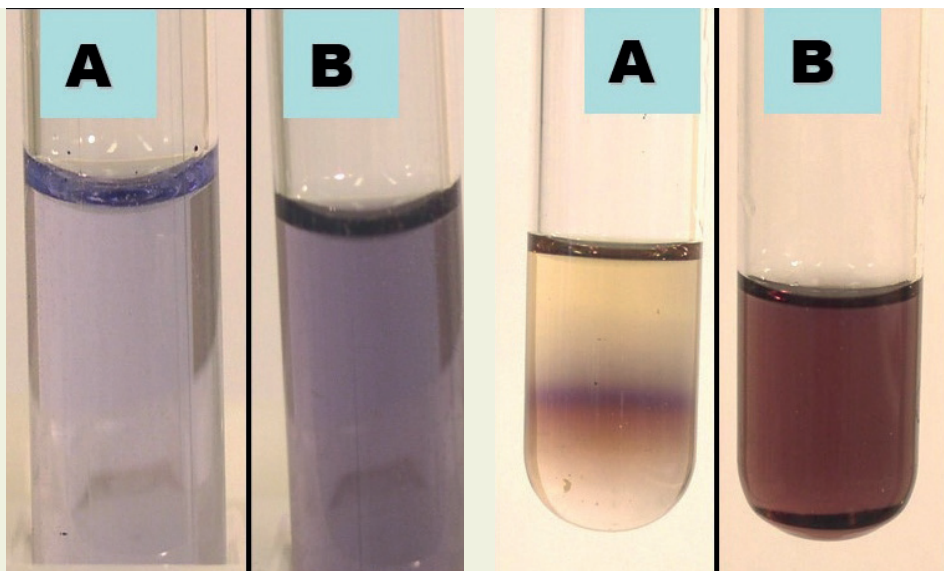
A: 75 μg spartein; B: 150 μg spartein; C: 300 μg boldin; D: Csattanómaszlag-magok kivonata 1,0 ml; E: Büröktermések kivonata 1,0 ml; F: Őszikikerics-magok kivonata 1,0 ml; G: Az anyarozs-szkleróciumok kivonata, 1,0 ml

FIGURE 9. Detection of alkaloids by Dragendorff reagent

A: 75 μg spartein; B: 150 μg spartein; C: 300 μg boldin; D: Extract of Jimson weed seeds 1.0 ml; E: Extract of hemlock fruits 1.0 ml; F: Extract of autumn crocus seeds, 1.0 ml; G: Extract of ergot bodies, 1.0 ml

b. Az anyarozs esetében – fontosságára tekintettel – alkalmaztuk a p-dimetilaminobenzaldehid reagensét is (10. ábra, B), amelynél 0.5 ml-nyi szkleróci-umkivonat nyomán sötétkék-sötétlila szín észlelhető, hasonlítva az ergokrisztin színéhez (10. ábra, A).

c. Bemutatjuk a Keller-reakciót anyarozs kivonat esetében alkalmazva (11. ábra). Az ábra bal oldalán a kénsav óvatos rétegzésével kialakuló gyűrű látható (11. ábra, A), de eljárhatunk úgy is, hogy a reakciócsövet összerázzuk, ami egy sötét kékes-lilás színt eredményez (11. ábra, B).



10. ÁBRA. Alkaloidok kimutatása PDAB-reagenssel

A: Ergokrisztin; B: Anyarozskivonat, 1,0 ml

FIGURE 10. Detection of alkaloids by PDAB reagent

A: Ergocristin; B: Extract of ergot bodies, 1.0 ml

11. ÁBRA. Alkaloidok kimutatása Keller-reagenssel

A. „Gyűrűs” reakció jelzi az anyarozs-alkaloidokat. B. Ugyanez összerázást követően

FIGURE 11. Detection of alkaloids by Keller's reaction

A. Detection of ergot alkaloids by „ring” reaction. B. Same tube after shaking

NITRÁT

A növények NO_3 -tartalmának kimutatását COLDWELL és MCLEAN (5) receptúrája alapján végeztük. A módszer lényege: 95%-os etanolban 1%-nyi difenilamint oldottunk, majd Schleicher-Schüll 2043b jelű kromatográfias papírt merítettünk az oldatba. A megszáritott papíron 1 cm^2 -es köröket jelöltünk ki, ahová a növénykivonatok, ill. a standard KNO_3 -oldat adott mennyiségeit (0,02–0,04 ml) cseppentettük fel, mindig beszárítva az egyes részleteket. Az elkészült száraz papírcsíkot UV-cső alatt sugároztuk be 10 percig az egyik, 10 percig pedig a másik oldalról. A nitrát a papírban lévő difenilaminnal sárga színű származékot képez. A sárga foltok UV-fény alatt, de normál fény mellett is jól látszanak, azaz alkalmasak a nitrátionok kvalitatív (vagy akár szemikvantitatív) kimutatására. Az „UV-kezelés” bármely fertőtlenítésre használt UV-csővel is megoldható, ami egy állatorvosi rendelőben valószínűleg rendelkezésre áll. Tapasztalatunk szerint már $6 \mu\text{g}$ KNO_3 is kimutatható, a $60 \mu\text{g}$ mennyiség pedig erős reakciót ad. A nitrát felhalmozó, ill. nitrogénkedvelő növények közül a szőrös disznóparéj (*Amaranthus retroflexus*), a pokolvar libatop (*Chenopodium hybridum*) és a csat-

A nitrát difenilaminnal UV-fény hatására sárga színű származékot képez

tanó maszlag (*Datura stramonium*) kivonatait vizsgáltuk. Valamennyi kivonat jól érzékelhető nitrát tartalmat mutatott, legtöbb nitrátot a szőrös disznóparéj tartalmazta.

MEGVITATÁS

Az egyes növényi mérgezések biztos megállapításához igen fontos az adott hatóanyag kimutatása a takarmányban

Az állatorvosi gyakorlatban lehetséges növényi mérgezések biztos meghatározásában igen fontos az adott tüneteket kiváltó takarmányban (növényben) jelen lévő növényi hatóanyag (ok) kimutatása. A szóban forgó növényi anyagcseretermékek (beleértve a nitrátiont is) egyszerű teszt módszerekkel történő kimutatása (vagy éppen bizonyos feltételezett anyagok jelenlétének a kizárása) komoly és gyors segítséget adhat. A dolgozatban hatféle növényi anyagcseretermék-csoport és a nitrátion tesztmódszerekkel való kimutatási lehetőségeit mutatjuk be, amelyeket korábbi tapasztalatok és a szakirodalom alapján próbáltunk ki.

A ciánglikozidok gyors kimutatását a pikrinsavas szűrőpapír teszt alapján javasoljuk, mert a növényekből egyszerűen felszabadított HCN révén keletkező Na-isopurpurát színe jól érzékelhető, s a reakció már 5–10 µg KCN esetén is egyértelmű. A teszt eredményeiből – pontos kalibrálást követően – kvantitatív következtetést is levonható (4. ábra).

A kumarin (és kumarinszármazékok) kimutatására alkalmazott lúgos reakció során sárga szín keletkezik. A vizsgált kumarin hordozó növények (szagos müge, somkóró fajok) kivonatai 5× hígításban is adták a reakciót (5. ábra).

A tanninok kimutatására a FeCl₃-os reakció sokkal érzékenyebb és egyértelműbb (kimutatási határ 100 µg csersav), mint az ólom acetát kicsapódása. A cserszömörce kivonatának már 0,02 ml-e erősen reagált, a csertölgy hajtásánál és termésénél nagyobb bemérés igazolta a cseranyagok jelenlétét (6. ábra).

A szívglükozidok teszt növényei közül a piros gyűszűvirág és a májusi gyöngyvirág leveleit teszteltük. Az alkalmazott Keller–Kiliani-reakcióval (bár kivitelezése fokozott figyelmet és óvatosságot igényel) a szívglükozidok jelenléte mindkét növényben jól kimutatható (7. ábra).

A szaponinok tesztelési lehetőségei közül a legegyszerűbb habzási próbákat használtuk fel és mutatjuk be. A kivonatok szigorúan azonos körülmények között elvégzett rázása nyomán kialakuló, elég stabil habréteg jellege, vastagsága koncentráció-függő. A standard szaponin-oldat már 0,00035%-nál habot képzett. A lucerna hajtás vagy éppen a lucernamagok kivonata egyértelműen jelezte a szaponinok jelenlétét (8. ábra).

Az alkaloidok szerkezete (váza) igen sokféle lehet, minden alkaloid jelzésére egyaránt alkalmas reagens nem létezik. A munkánk során kipróbált klasszikus Dragendorff-reagens használatakor színes precipitátum jelzi az alkaloidokat (9. ábra). A vizsgált növények alkaloid spektruma különböző, hiszen a csattanó maszlag tropán vázú, a bürök piperidin alkaloidokat, a kikerics pedig a kolchicint tartalmazza. Vizsgáltuk az anyarozs (*Claviceps purpurea*) kivonatát is, s úgy látszik, hogy a klavin alkaloidok és az ergopeptinek is kimutathatóak a Dragendorff-reagenssel. Az anyarozs jelentőségére tekintettel más teszteket is bevontunk az értékelésbe, így a p-dimetilaminobenzaldehyd vagy a Keller-reakció egy változata (10–11. ábrák) is jól alkalmazható.

A nitrátionok kimutatása, figyelemmel a nitrát (nitrit) mérgezés állatorvosi, toxikológiai jelentőségére, fontos kérdés lehet. A teszt alapját a nitrátionok difenilaminnal, UV-sugárzásra adott színreakciója jelenti. Ezt a reakciót szűrőpapíron alkalmaztuk, megállapítva, hogy az UV-fényre már néhány µg nitrátion is reagál. A vizsgált növények közül a disznóparéj (*Amaranthus retroflexus*) kivonata adta a legerősebb reakciót.

IRODALOM

1. ALTMANN, H.: Mérgező növények és állatok. Magyar Könyvklub. Budapest, 2004.
2. AUGUSTIN, J. M. – KUZINA, V. et al.: Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponines. *Phytochemistry*, 2011. 72. 435–457.
3. BHATT, S. – DHYANI, S.: Preliminary phytochemical screening of *Ailanthus excelsa* Roxb. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2012. 4. 87–89.
4. BURROWS, G. – TYRL, R. J.: Triterpenoid saponines. In: PLUMLEE, K. H.: *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby. St. Louis, 2004. 419–420.
5. COLDWELL, B. B. – MCLEAN, S. R.: The reaction between diphenylamine and nitrate in ultraviolet light. *Can. J. Chem.*, 1959. 37. 1637–1643.
6. FAIZAL, A. – GEELEN, D.: Saponines and their role in biological processes in plants. *Phytochem. Rev.*, 2013. 12. 877–893.
7. FARHAN, H. – RAMMAL, H. et al.: Preliminary Phytochemical Screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of Lebanese plant *Malva parviflora* L. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2012. 4. 1. 55–59.
8. FRUTOS, P. – HERVÁS, G. et al.: Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.*, 2004. 2. 191–202.
9. GALEY, F. D.: Cardiac glycosides. In: PLUMLEE, K. H.: *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby. St. Louis, 2004. 386–388.
10. JAIN, P. K. – JOSHI, H.: Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *J. App. Pharm. Sci.*, 2012. 2. 236–240.
11. KADHIM, E. J.: Phytochemical investigation and hepato-protective studies of Iraqi *Bryonia dioica* (Family Cucurbitaceae). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014. 6. 187–190.
12. KNIGHT, A.: Coumarin glycosides. In: PLUMLEE, K. H.: *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby. St. Louis, 2004. 388–391.
13. KOVAR, K. – FRANCAS, G. – SEIDEL, R.: Zum Mechanismus der Reaktionen nach Raymond, Kedde und Baljet. *Arch. Pharm.*, 1977. 310. 40–47.
14. NHASSICO, D. – MUQUINGUE, H. et al.: Review. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *J. Sci. Food Agr.*, 2008. 88. 2043–2049.
15. O'BRIEN, J. A. – VEGA, A. et al.: Nitrate transport, Sensing and Responses in Plants. *Mol. Plant*. 2016. 9. 837–856.
16. ONEUKWUSI, E. C. – AKANYA, H. O. – EVANS, E. C.: Phytochemical Constituents of Seeds of Ripe and Unripe *Blighia sapida* (K. Koenig) and Physicochemical Properties of the Seed Oil. *Int. J. Pharm. Sci. Invent.*, 2014. 3. 31–40.
17. PLUMLEE, K. H.: Tannic acid. In: PLUMLEE, K. H.: *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby. St. Louis, 2004. 346–348.
18. RAJESH, P. – LATHA, S. et al.: Phytochemical Screening and Toxicity Studies on the Leaves of *Capparis sepiaria* Linn. (Capparidaceae). *J. Basic Clin. Pharm.*, 2009–2010. 1. 41–46.
19. REHACEK, Z. – SAJDL, P.: Ergot alkaloids. Chemistry, Biological effects, Biotechnology. Elsevier. Amsterdam, 1990. 62.
20. SAVITHRAMMA, N. – LINGA RAO, M. – SUHRULATHA, D.: Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *Middle-East J. Sci. Res.*, 2011. 8. 3. 579–584.
21. SHAD, M. A. – NAWAZ, H. et al.: Determination of some biochemicals, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Cichorium intybus* L.: A comparative study. *J. Anim. Plant Sci.*, 2013. 23.1060–1066.
22. SINGH, S.: Phytochemical analysis of different parts of *Prosopis juliflora*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2012. 4. 59–61.
23. SUBHASHINI, D. P. – SATYNARAYANA, B. – TARAKESWARA, N. M.: Phytochemical Screening for Secondary Metabolites in *Boswellia serrata* Roxb. and *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br. *Not. Sci. Biol.*, 2014. 6. 4. 474–477.
24. VETTER, J. – HARASZTI, E.: Hemolytic saponin content of herbage. *Acta Bot. Hung.*, 1987. 33. 431–436.
25. VETTER J. – HARASZTI E.: Növényi ciánglikozidok meghatározása módosított pikrinsavas módszerrel. I. Néhány pillangós és pázsitfűfaj ciánglikozida-tartalmának változása a csírázás folyamán. *Agrokémia és Talajtan*, 1975. 24. 3–4. 413–422.
26. VETTER J. – SEREGÉLYESNÉ Cs. Á.: Adatok egyes gyep- és takarmánynövények szaponintartalmáról. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1988. 43. 479–482.
27. VETTER J.: Plant Cyanogenic glycosides. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. – CARLINI, C. R. – LIGABUE-BRAUN, R. (eds.): *Plant Toxins*. Springer. Netherlands. 2017. 287–317.
28. YADAV, R. N. S. – AGARWALA, M.: Phytochemical analysis of some medicinal plants. *J. Phytology*, 2011. 3. 10–14.

Közlésre érk.: 2017. ápr. 24.