

## بررسی آکالوئیدهای گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

سیده حمیرا سلیمانی<sup>۱\*</sup>، فرانسواز برنارد<sup>۲</sup>، محسن امینی<sup>۳</sup>، رمضانعلی خاوری نژاد<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

\*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی گیاهی

تلفن: ۴- ۴۴۸۱۷۱۷۰ (۰۲۱)، نمابر: ۴۴۸۱۷۱۷۵ (۰۲۱)

پست الکترونیک: moho\_plant@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۶/۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۸

### چکیده

مقدمه: گیاه نرگس متعلق به خانواده *Amaryllidaceae* گیاهی است تک لپه، پایا و دارای پیاز. این گیاه زینتی معطر، دارای آکالوئیدهای متنوعی است که خواص ضدتوموری، ضدویروسی و آنتی‌کولینرژیک دارند. هدف: این تحقیق به منظور شناسایی آکالوئیدهای موجود در پیازهای گیاه نرگس متعلق به استان گیلان در مرحله پس از گل‌دهی صورت گرفته است.

روش بررسی: از پیازهای گیاه نرگس ابتدا یک عصاره اتانولی تهیه شد. این عصاره با کمک حلال‌های متفاوت (دی‌اتیل اتر، کلروفرم و محلول آبی کربنات سدیم) استخراج شد تا در نهایت عصاره روغنی حاوی مخلوطی از آکالوئیدها به دست آمد. عصاره حاصل توسط TLC به اجزای تشکیل‌دهنده خود تفکیک شد. پس از جداسازی آکالوئیدهای موجود، شناسایی آن‌ها با بررسی طیف‌های IR، NMR و MASS صورت گرفت.

نتایج: پژوهش حاضر وجود سه آکالوئید همولیکورین، تازتین و ایسمین را در پیازهای گونه *N. tazetta* متعلق به کشور ایران نشان داد.

نتیجه‌گیری: آکالوئیدهای تازتین و مشتق دمتیله همولیکورین که دارای خواص مهم دارویی هستند در این گونه گیاهی قبلاً توسط سایر محققین گزارش شده است ولی آکالوئید ایسمین با خاصیت کاهندگی فشار خون، برای اولین بار در این تحقیق از گونه *N. tazetta* استخراج گردید.

کل‌واژگان: گیاه نرگس، آکالوئید، تازتین، همولیکورین، ایسمین



## مقدمه

فعاليت‌هاى ضدتومورى، ضدويروسى و آنتى‌كولنيرژيک نشان مى‌دهند [۴]، به عنوان مثال گالاتامين كه آلكالوئيد اصلى در *N. confusus* است در درمان ضعف عضلانى و بيمارى سيستم عصبى و هم‌چنين آلازيمر استفاده مى‌شود [۱۵]. سنتز شيميايى آلكالوئيد‌ها اغلب غيرممکن بوده و تنها منبع استخراج آن‌ها گياهان است. تاکنون تحقيقاتى بر روى آلكالوئيد‌هاى گياه نرگس در ايران صورت نگرفته است. بر اين اساس در اين تحقيق استخراج و شناسايى برخى آلكالوئيد‌هاى گياه *N. tazetta* بررسى شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه گياهى

گياه *Narcissus tazetta* از روستاى ضيابر از توابع بندرانزلى در تاريخ ۸۴/۲/۱۵ در مرحله پس از گل‌دهى جمع‌آورى گرديد. پس از جداکردن اندام‌هاى هوايى، ريشه‌ها و فلس‌هاى خشک سطحى پيازها در شرايط سايه و هوايى آزاد خشک شده و سپس براى استخراج و شناسايى آلكالوئيد‌ها استفاده شدند.

### استخراج آلكالوئيد‌ها

يك كيلوگرم از پيازهاى مذکور با اتانول ۹۶ درصد آسياب شد. پس از ۴۸ ساعت اين عصاره اتانولى صاف شده و در دستگاه تقطير دورانى در خلاء<sup>۱</sup> تحت دمايى ۴۰ درجه سانتى‌گراد به حجم يك پنجم رسانده شد. اين عصاره الكلى تغليظ شده به كمك اسيد استيك گلاسيال بر روى ۴ تنظيم شد. عصاره اسيدى پس از فيلتر شدن، چهار مرتبه با دى‌اتيل‌اتر شستشو داده شد تا مواد آلى و تركيب‌هاى رنگى موجود در آن خارج شود. در ادامه فاز آبي، چهار مرتبه توسط كلروفورم استخراج شد تا آلكالوئيد‌هاى محلول در كلروفورم جدا شوند. اين آلكالوئيد‌هاى محلول در كلروفورم پس از پراندن حلال، عصاره A ناميده شدند.

گياه نرگس<sup>۱</sup> از تيره Amaryllidaceae گياهى پايا، داراي پياز به قطر ۵ - ۳ سانتى‌متر و برگ‌هاى قاعده‌اى، تخت يا ناودانى است. ساقه آن به ارتفاع ۵۲ سانتى‌متر و معمولاً استوانه‌اى شكل است. گل‌آدين به صورت چتر و داراي ۲ تا ۱۱ و به ندرت ۱۵ گل است. گل‌ها داراي گلبرگ‌هاى سفيدرنگ و تخم‌مرغى و تاج آن به رنگ زرد يا كم و بيش نارنجى است. ميوه آن به صورت كپسول و زمان گل‌دهى آن از بهمن تا فروردين است [۱].

اين گونه بومى فرانسه، پرتغال، اسپانيا و نواحى مدیترانه‌اى بوده [۲] و محل رويش آن در ايران مازندران، گيلان، گرگان، استان فارس، بهبهان و بوشهر است [۳].

اين گياه زيتى به جهت دارا بودن خواص دارويى بسيار مورد توجه است [۴]، به عنوان مثال گل‌ها و پيازهاى آن در درمان تب دوره‌اى و اسهال خونى و ريشه‌هاى آن در درمان آبسه، جوش‌ها و بيمارى‌هاى پوستى استفاده مى‌شود [۵]. لكتين‌هاى جدا شده از اين گياه نيز فعاليت ضد HIV-1 از خود نشان مى‌دهند [۶]. از گياه نرگس آلكالوئيد‌هاى متنوعى استخراج گرديده است كه داراي فعاليت‌هاى بيولوژيكي و فارماكوژيكي بسيارى است [۷].

آلكالوئيد‌ها يكي از بزرگ‌ترين و مهم‌ترين گروه‌هاى متابوليت‌هاى ثانويه گياهان، موادى هستند قليابى كه در مولكول خود داراي يك يا چند اتم ازت است كه معمولاً در حلقه هتروسايكل قرار دارند [۸]. آلكالوئيد‌ها اغلب براى انسان سمى بوده ولى فعاليت بيولوژيكي برخى از آن‌ها منجر به استفاده آن‌ها به عنوان داروها، محرک‌ها، سموم و مواد مخدر شده است [۹].

بررسى بر روى آلكالوئيد‌هاى آماريليداسه با جداسازى ليكورين از *N. pseudonarcissus* در سال ۱۸۷۷ آغاز شد [۱۰] و تاکنون بالغ بر ۱۰۰ آلكالوئيد مشتق از فنيل‌آلائين و تيروزين از اعضاى خانواده آماريليداسه جدا شده است [۱۱، ۱۲]. آلكالوئيد‌هاى مختلفى شامل بوفانيزين<sup>۲</sup>، هموليكورين<sup>۳</sup>، همانتامين<sup>۴</sup> و تورتوسين<sup>۵</sup> در گونه‌هاى مختلف *Narcissus* گزارش شده است [۱۳، ۱۴]. آلكالوئيد‌هاى آماريليداسه

<sup>۱</sup> *Narcissus tazetta* L.

<sup>۲</sup> Buphanisine

<sup>۳</sup> Homolycorine

<sup>۴</sup> Haemanthamine

<sup>۵</sup> Hortuosine

<sup>۱</sup> Rotary evaporator



با مقایسه طیف‌های حاصل با طیف‌های آلکالوئیدهایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، نام ترکیبات جدا شده از پیازهای *N. tazetta* تعیین شد.

## نتایج

مقدار ۳۴۲ میلی‌گرم (۰/۰۳۴ درصد) عصاره A و ۴۳۵ میلی‌گرم (۰/۰۴۴ درصد) عصاره C از پیازهای *N. tazetta* استخراج شد. ویژگی‌های ترکیب‌های جدا شده از عصاره C به شرح زیر است:

ترکیب ۱ آلکالوئیدی با فرمول مولکول C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> و جرم مولکولی ۳۱۵ است که بر اساس مقایسه داده‌های طیف‌های آن با طیف‌های آلکالوئیدهای موجود با نام همولیکورین شناخته شد. ساختمان مولکولی آن در شکل a - (۱) ملاحظه می‌شود. این ماده به مقدار ۵۰ mg از عصاره C جدا گردید.

مشخصات طیف‌های <sup>1</sup>HNMR، <sup>13</sup>CNMR، IR و MASS این ماده به صورت زیر هستند.

<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.50 (s, 1H, H7), 6.95 (s, 1H, H10), 5.40-5.50 (m, 1H, H3), 4.73-4.75 (m, 1H, H1), 3.89 and 3.88 (two s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.04-3.12 (m, 1H, H12- $\alpha$ ), 2.66-2.71 (m, 1H, H4- $\alpha$ ), 2.60-2.65 (m, 1H, H10- $\beta$ ), 2.60-2.65 (m, 2H, H11), 2.40-2.50 (m, 2H, H2), 2.24 (dd, J = 18, 9.2 Hz, 1H, H12- $\beta$ ), 1.95 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

IR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1715(CO), 1603(C=C).

MASS (m/z), (rel.int.): 315[M]<sup>+</sup> (5), 257 (10), 206 (15), 178 (62), 109 (100), 108 (29), 94 (7), 82 (8).

<sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 166 (CO), 153.4 (C9), 149.5 (C8), 141 (C4), 138 (C13), 117.1 (C14), 115.6 (C3), 112.1 (C7), 111.1 (C10), 66.9 (C-4 $\alpha$ ), 56.8 (C12), 56.7 (OCH<sub>3</sub>), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 44.2 (NCH<sub>3</sub>), 44.0 (C10b), 31.5 (C2), 28.29 (C11).

ترکیب ۲، با فرمول مولکولی C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub> و جرم مولکولی ۳۳۱ که براساس مقایسه طیف‌های آن با طیف‌های آلکالوئیدهای شناخته شده، تازتین<sup>۳</sup> نامیده می‌شود. ساختمان

محلول آبی با کربنات سدیم<sup>۱</sup> یک مولار قلیایی شده (pH ۸ - ۹) و سپس چهار مرتبه با کلروفرم استخراج شد. با افزودن سولفات سدیم انیدر، ابتدا عصاره بی آب و سپس تغلیظ شد. بعد از آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از صاف‌کردن این محلول کلروفرمی، حلال آن تقطیر گشت تا یک عصاره روغنی قهوه‌ای رنگ حاصل شد (عصاره C). این عصاره که مخلوطی از آلکالوئیدهای نسبتاً خالص است اصطلاحاً آلکالوئید خام<sup>۲</sup> نامیده می‌شود [۱۶].

## تفکیک و خالص‌سازی آلکالوئیدها

آلکالوئید خام حاصل توسط کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۳</sup> به اجزای تشکیل‌دهنده خود تفکیک گردید. به این ترتیب که عصاره C در مقداری کلروفرم حل شده و بر روی پلیت‌های سیلیکاژل لکه‌گذاری شد و در تانکی با حلال ۲:۱ (اتیل‌استات: متانول) قرار گرفت. در بررسی پلیت‌ها با UV (۲۵۴ nm) سه باند مشاهده شد که پس از رنگ‌آمیزی با معرف درازندورف مشخص شد هر سه دارای ساختار آلکالوئیدی هستند. این اجسام از روی پلیت جدا شده و پس از جداسازی سیلیکاژل از آن‌ها، شناسایی شدند.

## شناسایی آلکالوئیدها

جهت تشخیص ساختمان و جرم مولکولی هریک از آلکالوئیدهای جدا شده، طیف‌های <sup>1</sup>HNMR، <sup>13</sup>CNMR، IR و MASS آن‌ها سنجیده و ارزیابی شد. طیف NMR با استفاده از کلروفرم دوتره<sup>۴</sup> توسط دستگاه FT-NMR (Bruker) با قدرت ۷ تسلا و فرکانس ۳۰۰ MHz حاصل شد. طیف IR (مادون قرمز) اجسام توسط دستگاه طیف سنج Bomem - MB100 به دست آمد و طیف جرمی این اجسام نیز توسط دستگاه طیف سنج جرمی Finnigan MaT - TSQ حاصل گردید.

<sup>1</sup> Tazettine

<sup>1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
<sup>3</sup> TLC

<sup>2</sup> Crude alkaloid  
<sup>4</sup> CDCl<sub>3</sub>



با طیف‌های آلکالوئیدهای شناسایی شده، ایسمین<sup>۱</sup> نام دارد. ساختمان آن در شکل (c - ۱) مشاهده می‌شود.

مشخصات طیف‌های ایسمین به صورت زیر است:

<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.30 (ddd, J = 8.1, 7.2, 1.6 Hz, 1H, H3), 7.04 (s, 1H, H10), 6.98 (dd, J = 7.3, 1.7 Hz, 1H, H1), 6.85 (ddd, J = 7.3, 7.3, 1.1 Hz, 1H, H2), 6.76 (dd, J = 8.1, 1.1, Hz, 1H, H4), 6.70 (s, 1H, H7), 6.02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.24 (d, J = 12Hz, 1H, H6), 2.76 (s, 3H, NMe).

IR (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>): 3430, 1605, 1580, 1250, 1050, 930.

MASS (m/z), (rel. int.): 257 [M] + (35), 238 (100), 196 (20), 109 (29).

<sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 148.01 (C<sub>9</sub>), 147.94 (C<sub>8</sub>), 147.03, (C- NMe), 134.33 (C<sub>11</sub>), 131.5 (C<sub>5</sub>), 130.32 (C<sub>2</sub>), 129.43 (C<sub>4</sub>), 127 (C<sub>12</sub>), 118.55 (C<sub>3</sub>), 111.28 (C<sub>1</sub>), 110.66 (C<sub>7</sub>), 110.33(C<sub>10</sub>), 101.67 (OCH<sub>2</sub>O), 64.20 (CH<sub>2</sub>OH), 30.10 (NMe).

این ماده به مقدار ۲۰ mg از یک کیلوگرم پیاز *N. tazetta*

جدا شد.

این آلکالوئید در شکل (b - ۱) منعکس شده است. مشخصات طیف‌های تازتین به صورت زیر است:

<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.86 (s, 1H, H12), 6.48 (s, 1H, H9), 6.14 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H2), 5.90 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5.63 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H1), 4.97 (d, J = 15 Hz, 1H, H8), 4.63 (d, J = 15 Hz, 1H, H8), 4.13- 4.18 (m, 1H, H3), 3.47 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.43 (d, J = 10 Hz, 1H, H6- $\alpha$ ), 2.92 (bs, 1H, H4- $\alpha$ ), 2.70 (d, J = 10 Hz, 1H, H6- $\beta$ ), 2.44 (s, 3H, NMe), 2.20-2.38 (m, 1H, H4- $\alpha$ ), 1.60-1.63 (m, 1H, H4- $\alpha$ ).

IR (KBr) ν cm<sup>-1</sup>: 3373 (OH), 2928, 2855, 1484, 1245, 1088, 1038.

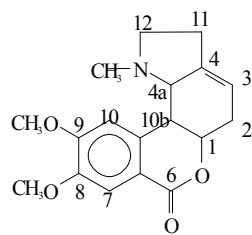
MASS (m/z), (rel. int.): 331 (25), 316 (15), 298 (20), 247 (100), 201 (20), 199 (18), 153 (16), 115 (19), 70 (25).

<sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 147.0 (C<sub>11</sub>), 146.8 (C<sub>10</sub>), 130.9 (C<sub>2</sub>), 129.0(C<sub>13</sub>), 128.1 (C<sub>14</sub>), 125.9 (C<sub>12</sub>), 109.7 (C<sub>9</sub>), 104.4 (OCH<sub>2</sub>O), 102.2(OCH<sub>2</sub>O), 101.3 (C<sub>6</sub>- $\alpha$ ), 73.1 (C<sub>3</sub>), 70.6 (C<sub>8</sub>), 65.5 (C<sub>4</sub>- $\alpha$ ), 62.4 (C<sub>6</sub>- $\beta$ ), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 (NMe), 42.7 (C<sub>6</sub>), 30.1 (C<sub>4</sub>).

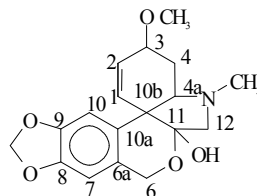
این ماده به مقدار ۲۵ میلی‌گرم از عصاره C جدا شد.

ترکیب ۳ آلکالوئیدی با فرمول C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> و جرم

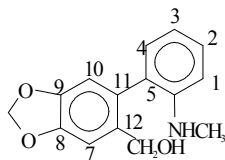
مولکولی ۲۵۷ است که براساس مقایسه داده‌های طیف‌های آن



a



b



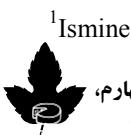
c

شکل شماره ۱- ساختمان مولکولی آلکالوئیدهای استخراج شده از پیازهای *Narcissus tazetta*

a - همولیکورین

b - تازتین

c - ایسمین



## بحث

حالی که در تحقیق حاضر علاوه بر تازتین آلکالوئیدهای همولیکورین و ایسمین نیز از پیازهای *N. tazetta* جدا گردید. تازتین که در گونه‌های *N. confusus* [۱۷]، *N. contabricus* [۲۱] و *N. tazetta* [۱۳] وجود دارد، آلکالوئیدی است که با جلوگیری از رشد پلاسمودیوم فالیسپاروم<sup>۳</sup>، خاصیت ضدمالاریایی نشان داده است. این ترکیب مسکن نیز محسوب می‌شود.

همولیکورین اثر سمیت سلولی علیه سلول‌های LMTK فیبروبلاستیک دارد و تاکنون از گیاه کامل *N. bujei* [۲۲] و *N. confusus* [۶] جدا گردیده است. در گونه *N. tazetta* شکل دمتیله این آلکالوئید (9-O-demethylhomolycorine) گزارش شده است [۱۳]. در حالی که در پژوهش حاضر از این گونه گیاهی ترکیب همولیکورین در مرحله پس از گل‌دهی استخراج گردیده و آلکالوئید 9-O-demethylhomolycorine در مرحله قبل از گل‌دهی در پیازها حضور دارد (نتایج منتشر نشده است).

ایسمین کاهنده فشار خون است [۲۳]. این آلکالوئید که تاکنون فقط در دو گونه *N. asturiensis* [۲۴] و *N. bulbocodium* [۲۵] شناسایی شده است، در تحقیق حاضر، برای اولین بار از پیازهای گونه *N. tazetta* استخراج گردید.

لیابرس<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۶) [۱۶] با همین روش استخراج موفق به جداسازی ۲۲۲ mg عصاره A و ۱۷۷ mg عصاره C از یک کیلوگرم اندام‌های هوایی گونه *N. requienii* رویش یافته در استرالیا در مرحله گل‌دهی شدند. در حالی که در بررسی صورت گرفته ۳۴۲ mg عصاره A و ۴۳۵ mg عصاره C از یک کیلوگرم پیازهای گونه *N. tazetta* در مرحله پس از گل‌دهی حاصل شد، و این مطابق با یافته‌های برگونون<sup>۲</sup> و همکاران است که مقدار آلکالوئیدها در مرحله پس از گل‌دهی بیشتر از زمان گل‌دهی است [۱۷]. اگرچه بیوسنتز آلکالوئیدها به طور ژنتیکی و طی مراحل نموی سلول و بافت کنترل می‌شود [۱۸، ۱۹]، اما توسط عوامل محیطی مختلف مانند نور، دمای بالا و مواد معدنی نیز تاثیر می‌پذیرد [۲۰]. از این رو کمیت و کیفیت آلکالوئیدها بسته به گونه گیاه، فصل برداشت، مکان برداشت و نوع اندامی که جهت استخراج استفاده می‌شود، متفاوت گزارش شده است.

تاکنون از گونه *N. tazetta* آلکالوئیدهای بوفانیسین، همانتامین، گالاتامین، تازتین، 9-O-demethylhomolycorine و 3-epihydroxybulbispermine استخراج شده است [۱۳]. در

<sup>1</sup> Liabres      <sup>2</sup> Bergonon  
<sup>3</sup> *Plasmodium falciparum*

## منابع

1. Rechinger KH. Flora Iranica. *Academische Druck-u. Verlagsanstalt*. 1984; 67: 7.
2. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. Plant systematics: A phylogenetic Approach, Sinauer Associates, Inc. USA. 1999, pp: 180 - 191.
3. Ghahreman A. Flore de l'Iran en couleur naturelle. 1<sup>nd</sup> ed. Institut des recherches des forets et des paturages departement botanique, Iran. 1978, 1, pp: 115.
4. Martin F. The Amaryllidaceae alkaloids. In: The Alkaloids, Academic press. Newyork. 1987, pp: 251 - 376.
5. Duke JA. Ayensu ES. Medicinal Plants of China. Reference Publications Inc. Michigan. 1985; pp: 283.
6. Lopez S, Armand - Ugon M, Bastida J, Viladomat F. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV - 1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta Med.* 2003; 69: 109 - 112.
7. Arrigoni O, De Gara L, Pacilla C. Lycorine: A powerful inhibitor of L - galactono-γ-lactone



- dehydrogenase activity. *J. Plant Physiol.* 1997; 150: 362 - 364.
8. Pelletier SW. The nature and definition of an alkaloid. In: Pelletier SW. John Wiley & Sons, New York. 1983, pp: 1 - 31.
9. Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in Plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001; 52: 29 - 66.
10. Cook JW, Loudon JD. The Alkaloids. Academic press. New York. 1952, pp: 439 - 457.
11. Ghosal SH, Saini KS, Razdan S. Crinum alkaloids: Their chemistry and biology. *Phytochem.* 1985; 24: 2141 - 2156.
12. Suau R, Gomez AI, Rico R, Vazquez Tato MP, Castedo L, Riguera R. Alkaloid N - Oxides of amaryllidaceae. *Phytochem.* 1988; 27: 3258 - 3287.
13. Sener B, Koyuncu M, Bingol F, Muhtar F. production of bioactive alkaloids from Turkish geophytes. <http://www.lupac.Org/symposia/proceedings>.
14. Bastida J, Viladomat F, Liabres JM, Codina C, Feliz M, Rubiralta M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochem.* 1987; 26: 1519 - 1524.
15. Ghous T, Townshend A. Flow injection determination of neostigmine and galanthamine by immobilised acetylcholinesterase inhibition. *Analytica chimica Acta.* 1998; 372: 379 - 389.
16. Liabres JM, Viladomat F, Bastida J, Codina C, Serrano M, Rubiralta M. Two alkaloids from *Narcissus requienii*. *Phytochem.* 1986; 25: 1453 - 1459.
17. Bergonon S, Codina C, Bastida J, Mele E. Galanthamine production in shoot - clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid - shake medium. *Plant Cell, Tissue. Org. Cult.* 1996; 45: 191 - 199.
18. Deluca, V, Culter A. J. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 1987; 85: 1099 - 1102.
19. Deluca V, St- Pierre B, Vazquez - Flota F. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: The establishment of a model system. In: Lo Schiavo F, Last L, Morelli G. *Cellular Integration of Signaling Pathway In Plant Development*. Springer - Verlag. Berlin. 1998, pp: 17 - 87.
20. Chatterjee SK, Nandi RP, Bharati P, Yonjan B, Yonzon MK. Improvement studies on some alkaloid yielding medicinal plants. *Med. Arom. Spice plants.* 1988, 188: 39 - 46.
21. Bastida J, Contreras JL, Codina C, Wright CW, Philipson JD. Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochem.* 1995; 40: 1549 - 1551.
22. Labrana J, Choy G, Solans X, Font-Bardia M, De la Fuente G, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochem.* 1999; 50: 183 - 188.
23. Schmeda - Hirschmann G, Rodriguez JA, Loyola JI, Astudillo L, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Activity of amaryllidaceae alkaloids on the blood Pressure of normotensive rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000; 6: 309 - 312.
24. Viladomat F, Selles M, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. *Planta Med.* 1997; 63: 583.
25. Seijas JA, Vazquez- Tato MP, Seijo- Muras J, Ramil - Rego P. Alkaloids from *Narcissus bulbocodium* L. 8th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. 2004, 1 - 30 November.

