

Bioactividad de la umbelliprenina, principal componente de las semillas de *Angelica sylvestris*

Bioactivity of umbelliprenin, the major component found in the seeds of Angelica sylvestris

SARKER SD^{1*}, NAHAR L², RAHMAN MM³, SIKALIMA M⁴, MIDDLETON M⁴, BYRES M⁴, KUMARASAMY Y⁴, MURPHY E⁴

¹School of Biomedical Sciences, University of Ulster at Coleraine, Cromore Road, Coleraine BT52 1SA, Co. Londonderry, N. Ireland, UK

²School of Life Sciences, The Robert Gordon University, St. Andrew Street, Aberdeen AB25 1HG, Scotland, UK

³Department of Pharmacy, University of Rajshahi, Rajshahi, Bangladesh

⁴School of Pharmacy, The Robert Gordon University, Schoolhill, Aberdeen AB10 1FR, Scotland, UK Corresponding author: s.sarker@ulster.ac.uk

RESUMEN

Se ha evaluado la actividad antibacteriana y antioxidante de la umbelliprenina (1), una cumarina de sesquiterpenil, aislada como el componente principal presente en extractos de n-hexano y diclorometano de semillas de *Angelica sylvestris* (Apiaceae). También se ha evaluado la toxicidad general de 1 mediante el bioensayo de letalidad de gambas en salmuera (BSL).

PALABRAS CLAVE: *Angelica sylvestris*. Apiaceae. Actividad antioxidante. Actividad antibacteriana. Bioensayo de letalidad de gambas en salmuera.

ABSTRACT

Umbelliprenin (1), a sesquiterpenyl coumarin, isolated as the major component present in the n-hexane and dichloromethane extracts of the seeds of Angelica sylvestris (Apiaceae), has been assessed for antibacterial and antioxidant activities. General toxicity of 1 has also been evaluated by the brine shrimp lethality (BSL) bioassay.

KEY WORDS: *Angelica sylvestris*. Apiaceae. Antioxidant activity. Antibacterial activity. Brine shrimp lethality bioassay.

1. INTRODUCCIÓN

La *angelica sylvestris* L. (Apiaceae *alt.* Umbelliferae), conocida generalmente como 'angélica de los bosques', es una planta británica resistente, perenne y casi lampiña que crece en zonas pantanosas, bosques y praderas húmedos, con amplia presencia en muchos otros países de Europa y Asia Menor^{1,2}. Las semillas de *A. sylvestris* se han utilizado tradicionalmente para la elaboración de vinos

1. INTRODUCTION

Angelica sylvestris L. (Apiaceae *alt.* Umbelliferae), commonly known as 'Wild angelica', is a stout nearly glabrous British perennial that grows in fens, damp meadows and woods and widely distributed in many other countries in Europe and Asia Minor.^{1,2} The seeds of *A. sylvestris* have been used traditionally to make flavoured wine, to stimulate appetite after long illnesses, to treat anorexia

aromatizados, para estimular el apetito después de largos períodos de enfermedad, para el tratamiento de la anorexia nerviosa, anemias, migrañas, vértigo, gripe, bronquitis y mareos generalizados^{3,4}. También se ha utilizado como expectorante y para el alivio de la tos, resfriados, angina flatulenta e indigestión. La raíz de *A. sylvestris* se puede confitar y tomar para tratar diversas infecciones, y la hierba se puede utilizar para el tratamiento de la cistitis y como antiséptico urinario^{3,5}. Se afirma que la *A. sylvestris* puede inducir la diuresis, tratar los calambres musculares y prevenir dolores de cabeza y reumáticos. A pesar de los usos medicinales tradicionales de la *A. sylvestris* en la medicina europea y oriental, existen muy pocos datos farmacológicos documentados sobre esta especie. Recientemente se han publicado datos sobre la actividad antibacteriana y antioxidante, así como la toxicidad, de diversos extractos de *A. sylvestris*⁶. Anteriormente se han publicado diversas cumarinas simples y furanocumarinas y un serquistespánico, el globulol, procedentes de esta planta⁴. Más recientemente, se ha aislado la umbelliprenina como el componente principal presente en las semillas⁷. Como parte de nuestra búsqueda continuada de principios biológicamente activos en plantas⁸⁻¹⁷, comunicamos ahora la actividad antibacteriana y antioxidante, así como la toxicidad general, de la umbelliprenina, el principal componente presente en las semillas de *A. sylvestris*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

General: Los espectros UV se obtuvieron en MeOH mediante un espectrómetro Hewlett-Packard 8453 UV-vis. Los espectros de RMN se registraron en CD₃OD en un espectrómetro de RMN Varian Unity INOVA 400 MHz (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) utilizando el pico de disolvente residual como estándar interno. Se realizaron análisis CIMS y FABMS (modo de ión positivo), respectivamente, en un instrumento cuádrupolo triple Quattro II y en un espectrómetro Finnigan MAT95.

Material de la planta: Las semillas de esta planta (cat. n° 15057) se obtuvieron de un proveedor comercial de semillas, B & T

nervosa, anaemia, migraine, vertigo, influenza, bronchitis and general dizziness.^{3,4} It has also been used as an expectorant and to relieve coughs, colds, sore throat flatulence and indigestion. The roots of *A. sylvestris* can be candied and eaten to treat various infections and the herb can be used to treat cystitis and as a urinary antiseptic^{3,5}. It is claimed that *A. sylvestris* can induce diuresis, treat muscular cramps, and prevent headaches and rheumatic pain. Despite established traditional medicinal uses of *A. sylvestris* in European and oriental medicine, there is still little documented pharmacological data available for this species. Antibacterial, antioxidant activities and general toxicity of various extracts of *A. sylvestris* have also been reported recently.⁶ A number of simple- and furano-coumarins and a sesquiterpene, globulol have previously been reported from this plant.⁴ Most recently, umbelliprenin has been isolated as the major component present in the seeds.⁷ As part of our on-going search for biologically active principles from plant sources,⁸⁻¹⁷ we now report on the antibacterial, anti-oxidant activities and general toxicity of umbelliprenin, the major component present in the seeds of *A. sylvestris*.

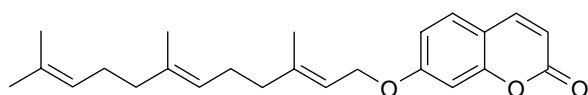
2. MATERIAL AND METHODS

General: UV spectra were obtained in MeOH using a Hewlett-Packard 8453 UV-vis spectrometer. NMR spectra were recorded in CD₃OD on a Varian Unity INOVA 400 MHz NMR Spectrometer (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C) using residual solvent peak as internal standard. CIMS and FABMS (positive ion mode) analyses were performed, respectively, on a Quattro II triple quadrupole instrument and Finnigan MAT95 spectrometer.

Plant Materials: Seeds of this plant (cat. no. 15057) were obtained from a commercial seed supplier, B & T World Seeds Sarl, Pagnignan, 34210 Olonzac, France. A voucher specimen (PP00001-02) has been deposited in the herbarium of Plant and Soil Science Department, University of Aberdeen, Scotland (ABD).

World Seeds Sarl, Paguignan, 34210 Olonzac, Francia. Un espécimen de muestra (PP00001-02) se ha depositado en el herbario del departamento de ciencias de plantas y tierra (Plant and Soil Science Department), University of Aberdeen, Escocia (ABD).

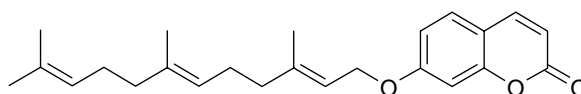
Aislamiento e identificación de la umbelliprenina: La umbelliprenina (**1**, 59,2 mg) se aisló a partir de los extractos combinados de n-hexano y diclorometano de las semillas de *A. sylvestris* (60,6 g) mediante una combinación de cromatografía líquida de vacío (CLV) en gel de sílice 60 H y cromatografía preparativa en capa fina (prep-CCF) en gel de sílice siguiendo el método descrito en otro lugar⁷. La identidad de **1** se confirmó inequívocamente mediante espectroscopia UV, ESI-MS y RMN (¹H y ¹³C) y también mediante comparación directa de estos datos con los datos publicados⁷.



Umbelliprenina (1). Sólido amorfo. Los datos de UV, IR, MS, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) y ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) fueron idénticos a los publicados⁷.

Ensayo antibacteriano: Se evaluó la actividad antibacteriana de la umbelliprenina (**1**) contra 7 cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Tabla I), utilizando el método de dilución en caldo basado en microplacas de 96 pocillos, también conocido como ensayo del «tablero de ajedrez»¹³. El caldo de cultivo isosensibilizado fue proporcionado por Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra. Las placas de microvolúmenes procedían de Sero-wel, Bibby sterilin, Stone, Staffs, Reino Unido. Las pipetas Eppendorf se adquirieron a Netheter-hinz-GmbH, 22331, Hamburgo, Alemania. Se utilizó suspensión bacteriana (20 µL) en caldo de cultivo de doble fuerza en una concentración de 5 x 10⁵ CFU/mL. El compuesto de la prueba (**1**) se disolvió en DMSO para obtener la concentración madre de 1 mg/mL. Como control positivo se utilizó ciprofloxacino, un antibiótico de amplio espectro bien conocido. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIH) de cada componente y se comparó con la del ciprofloxacino.

Isolation and identification of umbelliprenin: Umbelliprenin (**1**, 59.2 mg), was isolated from the combined n-hexane and dichloromethane extracts of the seeds of *A. sylvestris* (60.6 g) by a combination of vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel 60H and preparative thin layer chromatography (prep-TLC) on silica gel following the method described elsewhere.⁷ The identity of **1** was confirmed unequivocally by UV, ESI-MS and NMR (¹H and ¹³C) spectroscopy and also by direct comparison of these data with published data.⁷



Umbelliprenin (1). Amorphous solid. UV, IR, MS, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, J in Hz) and ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) data were identical to published data.⁷

Antibacterial assay: Antibacterial activity of umbelliprenin (**1**) was assessed against⁷ strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table I), using the 96-well microplate-based broth dilution method, also known as the checkerboard assay.¹³ Isosensitised nutrient broth was obtained from Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England. Microtitre plates were from Sero-wel, Bibby sterilin, Stone, Staffs, UK. Eppendorf pipettes were purchased from Netheter-hinz-GmbH, 22331, Hamburg, Germany. Bacterial suspension (20 µL) in double strength nutrient broth at a concentration of 5 x 10⁵ CFU/mL was used. Test compound (**1**) was dissolved in DMSO to obtain the stock concentration 1 mg/mL. Ciprofloxacin, a well known broad-spectrum antibiotic, was used as positive control. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each compound and compared with that of ciprofloxacin.

Antioxidant (DPPH assay): 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), molecular formula C₁₈H₁₂N₅O₆, was obtained from Fluka Chemie AG, Bucks. Quercetin was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd, Shore road, Heysham, Lancs. The method used by Takao et al.¹⁸ was adopted with suitable modifica-

Antioxidante (ensayo DPPH): El 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH), fórmula molecular $C_{18}H_{12}N_5O_6$, se adquirió a Fluka Chemie AG, Bucks. La quercetina se obtuvo de Avocado Research Chemicals Ltd, Shore road, Heysham, Lancs. Se adoptó el método utilizado por Takao et al.¹⁸ con las modificaciones adecuadas¹³. Se disolvió el DPPH (4 mg) en MeOH (50 mL) hasta obtener una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$.

Ensayo cualitativo: El compuesto de prueba (1) se aplicó en una placa de CCF y se pulverizó con solución DPPH mediante un atomizador. Se dejó desarrollar durante 30 min. Se registraron los cambios de color (púrpura sobre blanco).

Ensayo cuantitativo: El compuesto de la prueba (1) se disolvió en MeOH para obtener una concentración de 0,5 mg/mL. Se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , 5×10^{-9} , 5×10^{-10} mg/mL. Las soluciones diluidas (1,00 mL de cada una) se mezclaron con DPPH (1,00 mL) y se dejaron reposar durante 30 min. para que se produjera cualquier reacción. La absorbencia UV se registró a 517 nm. El experimento se realizó por triplicado y se registró la absorción media de cada concentración. Se realizó el mismo procedimiento con los estándares (quercetina).

Ensayo de letalidad de gambas en salmuera: Las huevas de gambas en salmuera se adquirieron a Water Life, Middlesex, Reino Unido. El bioensayo se realizó según el procedimiento publicado anteriormente^{13,19}. El valor de LD_{50} se determinó a partir de los recuentos de 24 h mediante el método de análisis de probit²⁰. Los porcentajes de mortalidad se ajustaron en relación al índice de mortalidad natural, según la fórmula de Abbots $P = (P_i - C)/(1 - C)$, donde P denota el índice de mortalidad observado distinto de cero y C representa el índice de mortalidad del control.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La umbelliprenina (1) inhibió el crecimiento de 4 de las 7 cepas de patógenos de la prueba (Tabla I). Las concentraciones inhibi-

tions.13 DPPH (4 mg) was dissolved in MeOH (50 mL) to obtain a concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$.

Qualitative assay: Test compound (1) was applied on a TLC plate and sprayed with DPPH solution using an atomiser. It was allowed to develop for 30 min. The colour changes (purple on white) were noted.

Quantitative assay: Test compound (1) was dissolved in MeOH to obtain a concentration of 0.5 mg/mL. Dilutions were made to obtain concentrations of 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , 5×10^{-9} , 5×10^{-10} mg/mL. Diluted solutions (1.00 mL each) were mixed with DPPH (1.00 mL) and allowed to stand for 30 min for any reaction to occur. The UV absorbance was recorded at 517 nm. The experiment was performed in triplicate and the average absorption was noted for each concentration. The same procedure was followed for the standards (quercetin).

Brine shrimp Lethality Assay: Brine shrimp eggs were purchased from Water Life, Middlesex, UK. The bioassay was conducted following the procedure published previously.^{13,19} The LD_{50} value was determined from the 24h counts using the probit analysis method.²⁰ Percentage mortalities were adjusted relative to the natural mortality rate of the control, following Abbots formula $P = (P_i - C)/(1 - C)$, where P denotes the observed nonzero mortality rate and C represents the mortality rate of the control.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Umbelliprenin (1) inhibited the growth of 4 of 7 pathogenic bacterial strains tested (Table I). The minimum inhibitory concentrations (MICs) were in between 1.5×10^{-3} and 1.5×10^{-2} mg/mL. It was most active against *Citrobacter freundii* and *Escherichia coli* (1.5×10^{-3} mg/mL). It also showed activity, although at a higher concentration, against penicillin-resistant *E. coli* (MIC = 7.5×10^{-3} mg/mL) and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MIC = 1.5×10^{-2} mg/mL). The brine shrimp lethality assay, which has been proven to be an effective and rapid assay method for screening compounds for potential cyto-

torias mínimas (CIH) se encontraron entre $1,5 \times 10^{-3}$ y $1,5 \times 10^{-2}$ mg/mL. La mayor actividad fue contra *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli* ($1,5 \times 10^{-3}$ mg/mL). También presentó actividad, aunque a concentraciones más elevadas, frente a *E. coli* resistente a las penicilinas (CIH = $7,5 \times 10^{-3}$ mg/mL) y *Staphylococcus aureus* resistente a las meticilinas (CIH = $1,5 \times 10^{-2}$ mg/mL). Para determinar la toxicidad general de 1 se utilizó el ensayo de letalidad de gambas en salmuera, que ha demostrado ser un método de ensayo rápido y eficaz para la detección de compuestos con actividad citotóxica potencial¹⁹. En el análisis probit²⁰, el valor LD₅₀ de 1 fue de $9,0 \times 10^{-3}$ mg/mL, aproximadamente 3 veces menos activo que el control positivo de podofilotoxina, un lignano citotóxico bien conocido (LD₅₀ = $2,7 \times 10^{-3}$ mg/mL).

toxic activity,¹⁹ was employed to determine the general toxicity of 1. From Probit analysis²⁰, the LD₅₀ value of 1 was found to be 9.0×10^{-3} mg/mL, which was about 3 fold less active than the positive control podophyllo-toxin, a well-known cytotoxic lignan, (LD₅₀ = 2.7×10^{-3} mg/mL).

TABLA 1: Actividad antibacteriana de la umbelliprenina

TABLE 1: Antibacterial activity of umbelliprenin

Especies bacterianas <i>Bacterial species</i>	NCTC	CIH (mg/mL)	
		Umbelliprenina	Ciprofloxacino
<i>Citrobacter freundii</i>	9750	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-7}$
<i>Escherichia coli</i>	8110	$7,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-7}$
<i>Escherichia coli</i>	4174	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-6}$
<i>Klebsiella aerogenes</i>	9528	-	$2,5 \times 10^{-6}$
<i>Salmonella goldcoast</i>	13175	-	$2,5 \times 10^{-5}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	10788	$7,5 \times 10^{-3}$	
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	11940	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-5}$

(-) = Sin inhibición del crecimiento en las concentraciones comprobadas. Sin inhibición con control negativo (1% DMSO).

(-) = no inhibition of growth at the concentrations tested. No inhibition with negative control (1% DMSO).

Las propiedades antioxidantes¹³ de los compuestos fenólicos presentes en forma natural, entre los que se incluyen diversas cumarinas, flavonoides y lignanos, que son la consecuencia de las fracciones fenólicas en las estructuras, son bien conocidas. La actividad antioxidante de los productos fenólicos naturales se debe principalmente a sus propiedades redox, es decir, a su capacidad para actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y receptores de singletes de oxígeno, y en cierta medida también podría deberse a su potencial

Naturally occurring phenolic compounds including various coumarins, flavonoids and lignans are well known for their antioxidant property¹³ which is the consequence of the presence of the phenolic moieties in the structures. The antioxidant activity of phenolic natural products is predominantly owing to their redox properties, i.e. the ability to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers, and to some extent, could also be due to their metal chelation potential.¹³ However, there was no antioxidant acti-

de quelación de metales¹³. Sin embargo, no se detectó ninguna actividad antioxidante en **1** en el ensayo de DPPH en las concentraciones de la prueba. La ausencia de toda actividad antioxidante puede explicarse por el hecho de que, a pesar de ser una cumarina, este compuesto carece de cualquier hidroxil fenólico en su estructura molecular.

Éste es el primer estudio sobre la evaluación de las actividades antibacteriana (mediante ensayos antibacterianos basados en microplacas) y antioxidante, así como de la toxicidad general de la umbelliprenina (**1**) aislada a partir de las semillas de *A. sylvestris*. No obstante, hasta la fecha hay disponibles publicaciones sobre la actividad antimicrobiana de **1** y de otras cumarinas relacionadas aisladas a partir de diversas plantas²¹⁻²³, y el efecto inhibitor de la producción del pigmento rojo en *Serratia marcescens*²⁴.

4. CONCLUSIÓN

La actividad antibacteriana y la toxicidad general de la umbelliprenina (**1**), que es la principal cumarina presente en las semillas de *A. sylvestris*, puede proporcionar alguna explicación a los usos medicinales tradicionales de esta planta.

5. RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre (Department of Chemistry, University of Wales Swansea, Swansea, Gales, Reino Unido) la realización de los análisis de MS.

activity detected for **1** in the DPPH assay at test concentrations. The absence of any antioxidant activity might be explained from the fact that, despite being a coumarin, this compound devoids of any phenolic hydroxyl in its molecular structure. This is the first report on the assessment of antibacterial (using microplate based antibacterial assay) and antioxidant activities, and general toxicity of umbelliprenin (**1**) isolated from the seeds of *A. sylvestris*. However, the reports on the antimicrobial activity of **1** and other related coumarins isolated from various plant sources,²¹⁻²³ and the inhibitory effect on the red pigment production in *Serratia marcescens*²⁴ are available to date.

4. CONCLUSION

The antibacterial activity and general toxicity of umbelliprenin (**1**), which is the major coumarin present in the seeds of *A. sylvestris*, may provide some explanation for the traditional medicinal uses of this plant.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre (Department of Chemistry, University of Wales Swansea, Swansea, Wales, UK) for MS analysis.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Clapham AR, Tutin TG and Warburg EF. Flora of the British Isles. 1952. Cambridge University Press, UK.
2. USDA-ARS-GRIN Database. USDA, ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network - (GRIN), National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA. 2004. Available on-line at <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3425>
3. Howard M. Traditional Folk remedies Comprehensive Herbal. 1987. London: Century Hutchinson Ltd.
4. Sarker SD and Nahar L. Natural medicine: the genus *Angelica*. Current Medicinal Chemistry 2004. 11: 1479-1500.
5. Potterton D. Couplers' Colour Herbal. 1997. Cippenham: Foulsham Publishing.
6. Sarker SD, Eynon E, Fok K, Kumarasamy Y, Murphy EM, Nahar L, Shaheen EM, Shaw NM and Siakalima M. Screening the extracts of the seeds of *Achillea millefolium*, *Angelica sylvestris* and *Phleum pratense* for antibacterial, antioxidant activities and general toxicity. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 2003. 3: 157-162.

7. Murphy EM, Nahar L, Byres M, Shoeb M, Siakalima M, Rahman MM, Gray AI and Sarker SD. Coumarins from the seeds of *Angelica sylvestris* (Apiaceae) and their distribution within the genus *Angelica*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2004. 32, 203-207.
8. Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A and Sarker SD. Assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L.) seeds. *J. Herbal Pharmacotherapy*. 2005. in press).
9. Rahman MM, Sarker SD, Byres M and Gray AI. New salicylic acid and isoflavone derivatives from *Flemingia paniculata*. *J. Nat. Prod.* 2004. 67: 402-406.
10. Delazar A, Byres M, Gibbons S, Kumarasamy Y, Nahar L, Modarresi M, Shoeb M and Sarker SD. Iridoid glycosides from *Eromostachys glabra*. *J. Nat. Prod.* 2004. 67: 1584-1587
11. Datta BK, Datta SK, Chowdhury MM, Khan TH, Kundu JK, Rashid MA, Nahar L and Sarker SD. Analgesic, antiinflammatory and CNS depressant activities of sesquiterpenes and a flavonoid glycoside from *Polygonum viscosum*. *Die Pharmazie*. 2004. 59: 222-225.
12. Shoeb M, Rahman MM, Nahar L, Jaspars M, MacManus S, Delazar A and Sarker SD. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *DARU*. 2004. 12:87-93.
13. Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Delazar A, Jaspars M, Nahar L, Shoeb M and Sarker SD. Isolation, structure elucidation and biological activity of flavone C-glycosides from the seeds of *Alliaria petiolata*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2004. 40: 122-128.
14. Haque ME, Haque M, Rahman MM, Khondkar P, Wahed MII, Mossadik MA, Gray AI and Sarker SD. *E*-Octadec-8-en-5-ynoic acid from the roots of *Capparis zeylanica*. *Fitoterapia*. 2004. 75: 130-133.
15. Sarker SD, Kumarasamy Y and Nahar L. Insect sex pheromone type alkenes from the seeds of *Quercus robur* (Fagaceae). *Chemistry of Natural Compounds*. 2004. 40: 286-288.
16. Datta BK, Khan TH, Kundu JK, Rashid MA, Datta SK, Nahar L and Sarker SD. Anti-cholinergic, cytotoxic and anti-HIV-1 activities of sesquiterpenes and a flavonoid from *Polygonum viscosum*. *Pharm. Biol.* 2004. 42: 18-23.
17. Uddin SJ, Shilpi JA, Delazar A, Nahar L and Sarker SD. Free radical scavenging activity of some Bangladeshi plant extracts. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2004. 4: 185-193.
18. Takao T, Watanabe N, Yagi I and Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994. 58: 1780-1783.
19. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nicholas DE, McLaughlin JL. Brine shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*. 1982. 45:31-34.
20. Finney DJ. *Probit Analysis*, 3rd edn, Cambridge University Press Cambridge. (1971).
21. Dadak V, Hodak K. Some relations between the structure and the antibacterial activity of natural coumarins. *Experientia*. 1966. 22:38-39.
22. Zboril P, Holasova J, Dadak V. Antibiotic efficiency of natural coumarins. X. Mode of action of phenolic derivatives of coumarin on succinate oxidase in the Keilin-Hartree preparation. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1970. 35: 2983-2995.
23. Ngwendson JN, Badir E, Efange SMN, Okunji CO, Iwu MM, Schuster BG, Khan IA. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. *Die Pharmazie*. 2003. 58: 587-589.
24. Iranshahi M, Shahverdi AR, Mirjani R, Amin G, Shafiee A. Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratia marcescens*. *Journal of Bioscience*. 2004. 59: 506-508.