

호장으로부터 분리한 안트라퀴논류의 Nitric Oxide 저해활성

주시몽 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received March 23, 2010; Revised September 12, 2010; Accepted September 20, 2010)

Inhibition of Nitric Oxide Production by Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum*

Si Mong Joo and Ki Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract – *Polygonum cuspidatum* which is widely distributed in Korea has been used as treatments of dermatitis, gonorrhoea and inflammation in traditional medicine. We examined anti-inflammatory activities by the inhibition of NO production in RAW264.7 murine macrophages cells. Phytochemical examination of *Polygonum cuspidatum* led to the isolation and characterization of emodin (1), emodin 8-O-β-D-glucopyranoside (2), emodin 1-O-β-D-glucopyranoside (3). Anti-oxidative activities of these compounds were determined by measuring the radical scavenging effects on DPPH radicals. Compounds 1 and 3 showed potent activities compared with L-NMMA. These results suggested that the anthraquinone compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* might be used as antiinflammatory agents.

Keywords *Polygonum cuspidatum*, emodin, emodin 8-O-β-D-glucopyranoside, emodin 1-O-β-D-glucopyranoside, antiinflammatory agents

호장(*Polygonum cuspidatum* Sied. et Zucc.)은 한국, 중국, 일본, 대만 등 동아시아에서 간염, 종양, 설사, 피부질환, 및 골수염 등의 치료에 사용되어 왔다.¹⁾ 성분에 관한 연구로는 Yang 등²⁾ resveratrol과 anthraglycoside, Zhao 등³⁾이 emodin, resveratrol, polydatin, Matsuda 등⁴⁾이 hydroxyanthraquinones, Xiao 등⁵⁾은 stilbene glycoside sulfates 등을 분리 보고하였다. 생리활성으로는 항균작용,⁶⁾ acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase 작용,⁷⁾ *Helicobacter pylori* 생육저해작용,⁸⁾ *in vitro*에서의 세균과 진균의 발육억제작용,⁹⁾ kinase inhibitor로써의 활성,¹⁰⁾ emodin의 tyrosine kinase¹¹⁾ NF-κB 활성억제작용,¹²⁾ 추출물의 항산화효과,^{13,14)} 종양 신생억제효과,¹⁵⁾ 지질과산화 억제작용,^{16,17)} 미백작용 등¹⁸⁾ 이 보고된 바 있다. 본 연구에서는 호장의 생리활성을 규명하기 위하여 안트라퀴논류 화합물 3종을 분리하고 이들 화합물 중 emodin의 NF-κB 활성억제작용이 알려져 있을 뿐이므로 emodin 유리형과 두가지 배당체 성분에 대하여 DPPH법을 이용한 항산화작용과 RAW264.7 murine macrophages cells을 이용한 염증

매개인자생성에 미치는 작용을 평가하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에서 사용한 호장은 숙명여자대학교 약초원에서 채취하여 뿌리를 사용하였다.

추출 및 분리

메탄올 추출물로부터 안트라퀴논류 화합물의 분리

뿌리를 음건, 세절 후 2 kg을 취하여 환류 냉각하면서 MeOH로 가온 추출하여 여과하였다. 추출액을 감압농축 후 물에 현탁하여 여과 후 이온수지 MCI-gel CHP-20P chromatography (gradient, H₂O→MeOH)를 실시하였다. 용매는 물에서부터 메탄올을 10%씩 올려 100%까지 농도를 증가시켰으며 TLC를 실시하여 6개의 subfraction(Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3, Fr. 4, Fr. 5 그리고 Fr. 6)으로 나누었다. Fr. 2, Fr. 3 및 Fr. 5를 sephadex LH-20 chromatography (gradient, H₂O→MeOH) 및 low pressure chromatography (gradient, H₂O→MeOH)를 반복 실시하여, Fr. 2에서 화합물 2(4.29 g), Fr. 5에서 화합물 1(650 mg)과 화합물

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02710-9578 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) ksyang@sookmyung.ac.kr

3(245 mg)을 분리하였다.

화합물 1의 단리

Orange color amorphous powder – $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11.95(1H, br s, OH), 11.87(1H, br s, OH) 7.23(1H, s, H-4), 7.00(1H, s, H-2), 6.98(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5), 6.48(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-7), 2.33(1H, s, CH_3), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 161.5(C-1), 124.2(C-2), 148.4(C-3), 120.6(C-4), 108.8(C-5), 165.6(C-6), 106.0(C-7), 164.5(C-8), 189.8(C-9), 181.5(C-10), 21.6(CH_3).

화합물 2의 단리

Light yellow amorphous powder – $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13.16(1H, br s, OH-1), 7.41(1H, d, $J=1.6$ Hz, H-4), 7.27(1H, d, $J=1.6$ Hz, H-2), 7.12(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5), 7.00(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 2.38(1H, s, CH_3), 5.07(1H, d, $J=7.8$ Hz, anomeric H), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 161.8(C-1), 124.9(C-2), 146.6(C-3), 119.2(C-4), 109.7(C-5), 166.4(C-6), 108.9(C-7), 161.5(C-6), 108.9(C-7), 161.5(C-6), 185.9(C-9), 182.5(C-10), 21.4(CH_3), 101.3(glu C-1), 73.4(glu C-2), 76.4(glu C-3), 69.6(glu C-4), 77.4(glu C-5), 60.7(glu C-6).

화합물 3의 단리

Yellow amorphous powder – $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13.22(1H, br s, OH-8), 7.67(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-4), 7.51(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 7.06(1H, d, $J=1.55$ Hz, H-5), 6.58(1H, d, $J=1.55$ Hz, H-7), 2.45(1H, s, CH_3), 5.10(1H, d, $J=7.6$ Hz, anomeric H), $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 158.1(C-1), 123(C-2), 146.5(C-3), 121.3(C-4), 107.0(C-5), 164.3(C-6), 108.1(C-7), 164.3(C-8), 181.0(C-9), 182.0(C-10), 26.8(CH_3), 100.6(glu C-1), 13.2(glu C-2), 76.3(glu C-3), 69.4(glu C-4), 77.1(glu c-5), 60.4(glu C-6).

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – Hatano의 방법¹⁹⁾에 의하여 시료를 각 농도별로 조제한 용액 0.1 ml(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액 1.9 ml을 가하였다. 각 시료를 농도별로 조제하여 시험관 진탕기로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 반응시키고 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC_{50} (DPPH radical 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 농도)로 나타내었다.

RAW 264.7 세포에서의 NO생성 저해 작용 측정

세포주의 배양 – Mouse macrophage RAW 264.7 세포는 한국 세포 주 은행에서 동결상태로 구입하였으며 실험실에서 재빨리

녹여 10% FBS(fetal bovine serum), penicillin G(100 IU/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g/ml}$)을 포함한 RPMI 1640 배지를 이용, 온도 37°C와 5%의 CO_2 를 유지하면서 배양기에서 배양하였다.

MTT 시험법을 이용한 세포 독성 측정

본 실험에서 RAW 264.7 세포에 대한 화합물 1-3의 세포독성 및 실험시 처리농도를 결정하기 위해 MTT 시험법을 사용하였다. 이 정량법은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시한 것으로 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase에 의해서 노란색의 수용성 기질인 MTT용액이 진청색의 비수용성인 formazan으로 환원되는 것을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례하므로 세포의 생존율을 측정할 수 있다.

IFN- γ 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO생성 저해 작용의 측정

본 실험은 IFN- γ 및 LPS를 이용 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide synthase enzyme을 발현시키고 생성된 NO의 양을 Griess assay로 측정하는 방법이다. Griess reagent(1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4)는 NO를 산화시켜 NO_2 로 변화시키며 생성된 NO_2 는 570 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를 NaNO_2 의 검량선을 이용하여 구하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 medium (10% fetal bovine serum, 5% antibiotics)으로 충분한 세포 수

Table I – Antioxidative activities of compounds by DPPH method

Compounds	IC_{50} (μM)
Compound 1	21.3
Compound 2	0.31
Compound 3	0.32
Ascorbic acid	0.04

Compound 1: emodin. Compound 2: emodin 8-O-B-D glucopyranoside. Compound 3: emodin 1-O-B-D glucopyranoside.

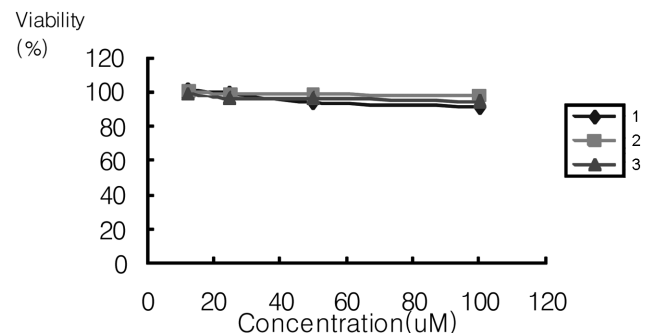


Fig. 1 – Effect of compounds on the viability of RAW 264.7 cells. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. 1: emodin, 2: emodin-8-O-B-D-glucopyranoside, 3: emodin 1-O-B-D-glucopyranoside.

Table II – NO production inhibitory activity of compounds 1-3

Compounds	IC ₅₀ (μM)
Compound 1	48.8
Compound 2	77.9
Compound 3	44.6
L-NMMA	71.0

RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 mg/ml) and various concentrations of compounds for 20 hrs, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent. Compounds 1: emodin, 2: emodin 8-O-β-D-glucopyranoside, 3: emodin 1-O-β-D-glucopyranoside.

가 될 만큼 배양시킨 다음 세포를 ml당 5×10^5 개로 희석하여 96 well에 160 μl씩 넣고 약 20시간 배양해서 cell이 부착되도록 한 다음 IFN-γ(200 IU/ml) 10 μl와 LPS(40 μg/ml) 10 μl 및 (+) control을 포함한 각각의 시료 20 μl씩 넣고 16시간 배양시킨 후 배양액에 생성되어 있는 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 정량한다.

자료의 통계적 처리

실험결과에서 얻은 모든 값은 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의적 차이의 정도는 Student's *t*-test를 사용하여 $p < 0.1$, $p < 0.01$, 그리고 $P < 0.001$ 인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

실험결과 및 고찰

분리한 안트라퀴논류 화합물의 구조결정

화합물 1의 구조결정 – 화합물 1은 주황색 분말로 TLC에서 FeCl₃ 분무에 의해서 양성이고, 10% H₂SO₄(EtOH)을 분무하고 가열시 황색으로 발색하였으며, 1% NaOH 시액의 분무에 의해 적색으로 나타나 안트라퀴논계 화합물로 추정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 2.33에서 방향족 수소에 결합한 methyl signal 수소가 singlet으로 나타나고 있으며, 4개의 방향족 수소 중 H-4, H-2의 proton이 각각 δ 7.23(1H, s), 7.00(1H, s)으로 나타났다. δ 6.93(1H, d, *J*=2.4 Hz), 6.48(1H, d, *J*=2.4 Hz)에서 서로 *m*-coupling한 H-5, H-7이 나타나 3-methyl 6-hydroxyl 9, 10-anthraquinone(emodin)으로 추정되었다. 또한 ¹³C-NMR에서 각각의 signal을 문헌^{20,21}과 비교하여 일치함을 확인하여 emodin으로 동정하였다.

화합물 2의 구조결정 – 화합물 2는 연한 황색분말로 TLC에서 FeCl₃ 분무에 의해서 양성이고, 10% H₂SO₄(EtOH)을 분무하고 가열시 황색으로 발색하였으며, 1% NaOH 시액의 분무에 의해 적색으로 나타나 anthraquinone계 화합물로 추정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 2.45 방향족 수소에 결합한 methyl signal 수소가 singlet으로 나타나고 있으며, 4개의 방향족 수소 중 H-4, H-2의

proton이 각각 δ 7.41(1H, s), 7.27(1H, s)으로 나타났으며, δ 7.17(1H, d, *J*=2.1 Hz), 7.00(1H, d, *J*=2.4 Hz)에서 서로 *m*-coupling한 H-5, H-7이 나타났다. 또한 δ 5.07(d, *J*=7.6 Hz)은 anomeric proton으로서 당이 β 결합하고 있음을 보여주고 있다. ¹³C-NMR에서도 emodin(1)의 signal을 확인하였고, δ 100.91, 77.38, 76.46, 73.34, 69.5, 60.62 ppm의 signal로부터 당은 glucose임을 확인 할 수 있었다. 한편, ¹³C-NMR에서 C-8이 3.1 ppm 고자장 shift 하였고, C-7, C-8a가 각각 2.4 ppm, 4.4 ppm 저자장 shift가 일어나 화합물 1의 8번 OH에 glucose가 결합된 것으로 추정되었고, 문헌^{20,21}과 비교하여 각각의 signal이 일치하여 emodin-8-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였다.

화합물 3의 구조결정 – 화합물 3은 진황색 분말로 TLC에서 FeCl₃ 분무에 의해서 양성이고, 10% H₂SO₄(EtOH)을 분무하고 가열시 황색으로 하였으며, 1% NaOH 시액의 분무에 의해 적색으로 나타나 anthraquinone계 화합물로 추정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 2.45에서 방향족 화합물에 결합한 methyl signal 수소가 singlet으로 나타나고 있으며, 4개의 aromatic proton중 H-4, H-2의 proton이 각각 δ 7.67(1H, d, *J*=2.1 Hz) 7.51(1H, d, *J*=2.1 Hz)에서 *emta* coupling하여 나타났으며 δ 7.06(1H, d, *J*=1.55 Hz), 6.58(1H, d, *J*=1.55 Hz)에서 서로 *m*-coupling한 H-5, H-7이 나타났다. δ 5.10(d, *J*=7.6 Hz)은 anomeric proton으로서 1 mole의 당이 β 결합하고 있음을 보여주고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 화합물 2와 매우 유사한 signal 패턴이 나타나 emodin의 glucoside임을 추정할 수 있었다. 한편 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-1이 3.28 ppm 고자장 shift 하였고, C-9a가 4.7 ppm 저자장 shift한 glycosylation shift가 일어났으므로, 화합물 1의 1번 OH에 glucose가 결합되어 있음을 추정하였으며, HMQC 및 HMBC 스펙트럼등의 2D NMR에서 correlation을 확인하여 최종적으로 emodin-1-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였다.

MTT 시험법에 의한 세포 독성

분리된 안트라퀴논류화합물 1-3의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 MTT분석법으로 측정된 결과 화합물 1-3 모두 12.5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM의 농도에서 모두 80% 이상의 생존율을 나타내어 정상세포에는 독성이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

NO 생성 저해 활성

분리된 안트라퀴논류에 대해 LPS로 활성화한 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성 저해 작용을 관찰한 결과 화합물 1인 emodin은 IC₅₀ 48.8 μM로 나타났다. Emodin은 exocyclic methyl group의 monohydroxylation이 주요한 변형을 나타내며²² 양성대조 약물인 L-NMMA²³의 IC₅₀ 71.0 μM보다 더 우수한 NO 생성 저해 작용을 나타내었다. 화합물 1의 8번 위치에 당이 결합된 화합물 2인 emodin 8-O-β-D glucopyranoside는 cerebro

ischemia reperfusion injury에 신경보호효과 및 glutamate neurotoxicity 억제작용 등이 알려져 있으며²⁴⁾ NO생성 저해활성은 IC₅₀ 77.9 μM로 유리형보다는 활성이 낮았으나 양성대조군과 비슷한 NO 생성저해 작용을 나타내었다. 1번 위치에 당이 결합된 화합물 3인 emodin 1-O-β-D glucopyranoside가 가장 우수한 NO 생성 저해 활성을 나타내었다.

결 론

호장의 뿌리를 MeOH로 추출한 후 물에 현탁시켜 여과한 수용성 분획에서 각종 chromatography를 이용하여 phenol계 화합물 3종을 분리, 정제하였으며 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 그리고 각종 기기분석 결과와 문헌을 통해서 안트라퀴논류인 emodin(1), emodin 8-O-β-D-glucopyranoside(2) emodin 1-O-β-D-glucopyranoside(3)임을 확인하였다. 이 화합물들의 항산화 활성을 확인하고자 DPPH를 이용한 유리기소거작용을 측정된 결과 유리형보다는 배당체에서 더 강한 항산화 활성을 나타내었다. 화합물들의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 평가하기 위한 MTT 분석 결과 처리 농도에서 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. IFN- 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성 측정결과 화합물 모두 농도 의존적으로 효과가 있었으며 특히, 화합물 3은 양성대조군인 L-NMMA 보다 우수한 활성을 나타내었다.

호장에서 추출한 안트라퀴논류 화합물들의 생리활성을 검색한 결과 *in vitro*에서 강한 항산화활성을 나타내지는 못하였으나, IFN-γ 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성에서는 우수한 효과를 보여주어 염증에 대하여 강한 억제 활성이 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2009학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울 p. 303 (1980).
- 2) Yang, F., Zhang, T. and Ito, Y. : Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **919**, 443 (2001).
- 3) Zhao, R. Z., Liu, S. and Zhou, L. I. : Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the Chinese herb *Polygonum cuspidatum*. *Chromatographia*. **61**, 311 (2005).
- 4) Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T. and Yoshikawa, M. : Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorgan. Medicin. Chem. Lett.* **11**, 1839 (2001).
- 5) Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y. and Bai, D. : Stilbene glycoside sulfates from *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1373 (2000).
- 6) Liu, X., Wu, L., Song, G., Liu, K., Zhang, X and Zhang, Y. : Study on the chemical constituents of *Polygonum cuspidatum* Sieb. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao.* **16**, 17 (1999).
- 7) Park, C. S., Lee, Y. C., Kim, J. D. and Kim, C. H. : Inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* water extract (PCWE) and its component resveratrol on acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase activity for cholesteryl ester synthesis in HepG2 cells. *Vascul. Pharmacol.* **40**, 279 (2004).
- 8) Kim, Y. S., Kim, H. H., Yoo, M. J. and Shin, D. H. : Bactericidal effects of the extracts of *Polygonum cuspidatum* on *Bacillus cereus*. *Food Sci. Biotech.* **13**, 4303 (2004).
- 9) Agarwal, S. K., Singh, S. S., Verma, S. and Kumar, S. : Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 43 (2000).
- 10) Jayatilake, G. S., Jayasuriya, H., Lee, E. S., Koonchanok, N. M., Geahien, R. L., Ashendel, C. L., McLaughlin, J. L. and Chang, C. J. : Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *J. Natur. Produc.* **56**, 1805 (1993).
- 11) Jayasuria, H., Koonchanok, N. M., Geahlen, R., McLaughlin, J. L. and Chang, C. J. : Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *J. Natur. Produc.* **55**, 696 (1992).
- 12) Kumar, A., Dhawan, S. and Aggarwal, B. B. : Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-κB activation, IκB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene.* **17**, 913 (1998).
- 13) Kong, L. Yang, C. and Qiu, X. : Effects of processing on antioxidation of *Rheum palmatum* and *Polygonum cuspidatum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **26**, 388 (2001).
- 14) Meng, J. and Hang, H. : Study on the antioxidative activity and stability of *Polygonum cuspidatum* extract. *Huaxue Shijie* **41**, 418 (2000).
- 15) Wang, S., Zheng, Z., Weng, Y., Yu, Y., Zhang, D., Fan, D. R. and Hu, Z. : Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herb extracts. *Life Scien.* **74**, 2467 (2004).
- 16) 김지연, 양기숙 : 호장근의 사염화탄소로 유도된 지질과산화 저해 활성. *약학회지* **43**, 572 (1999).
- 17) 주시몽, 이민원, 양기숙 : 호장으로 부터 분리한 안트라퀴논 및 스틸벤 화합물의 지질과산화 저해활성. *약학회지* **51**, 140 (2007).
- 18) Yann, L. L., Tsong, L. H., Jiuan, W. H. and Jia, Y. F. :

- Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal uses. *Phytother. Resear.* **22**, 552 (2008).
- 19) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshita, T. and Okuda, T. : Effects of the interation of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 20) Francis, G. W., Aksnes, D. W. and Holt, O. : Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of anthraquinone glycoside from *Rhamnus frangula*. *Magn. Reson. Chem.* **36**, 769 (1998).
- 21) Omur, D., Ayse, K. U., Isabelle, B., H. and Axel, Z. : The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry* **58**, 1213 (2001).
- 22) Rui, S., Hui, L., Zunjian, Z., Zhe, L., Lei, X., Haijuan, D. and Yuan, T. : Profiling the metabolic differences of anthraquinone derivatives using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with data-dependent acquisition, *Rapid Commun. Mass Spec.* **23**, 537 (2009).
- 23) Jain, R., Mukherjee, K. and Mohan, D. : Effects of nitric oxide synthase inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* **88**, 473 (2008).
- 24) Wang, C., Zhang D., Ma, H. and Liu, J. : Neuroprotective effects of emodin-8-O- β -D-glucoside in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **22**, 58 (2007).