

アーユルヴェーダ生薬および熱帯植物からの アンチエイジングを志向した抗糖化および美肌薬の創薬研究

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

杉本 幸子

Advanced glycation endproducts (AGEs), which readily form and accumulate with sustained hyperglycemia, contribute to the development of diabetic complications and, as such, are considered a potential therapeutic target. Some isolated compounds from two plants showed strong inhibitory activity toward AGEs formation, the inhibitory activity of a positive control, aminoguanidine, being 1.29 mM. The current results indicate that, in comparison with the reference compound, aminoguanidine, which once entered phase II clinical trials, but was withdrawn because of its side effects¹⁾, flavonoid glycosides were clearly more efficient in inhibiting the formation of AGEs. Thus, these compounds seem to be worthy of consideration as potential therapeutic agents for diabetic complications and related diseases though additional biological evaluation. Among the isolated compounds, isolinariins C, D and E (**1**, **2** and **3**) showed inhibition toward AGE formation (IC₅₀ values of 34.8, 35.0 and 19.5 μM, respectively). Collagenase is an enzyme that is known to be a member of matrix metalloproteinase (MMP) family. The agents that inhibit collagenase may have beneficial effects for maintaining healthy skin by preventing dermal matrix degradation. Therefore, the isolated compounds were evaluated the collagenase inhibitory activity. The results showed that linariin (**4**) and pectolinarin (**5**) exhibited weak inhibition with IC₅₀ values of 79.4 and 78.6 μM, respectively. Luteolin (8, 40.5 μM) showed stronger inhibitory activity than that of a positive control, caffeic acid (an IC₅₀ value of 120 μM) as reported previously²⁾.

1. 緒言

機能的食品や飲料、健康食品、サプリメント、医薬品など幅広い産業へと美白・アンチエイジング市場が拡大しており、特に医療と美容が融合したコスメシューティカル(機能的化粧品)が注目されている。その中でも特に美白機能を中心とした機能的化粧品が近年大きな市場となり、また、若年層をターゲットとした初期段階からの美白・老化症状の予防なども求められており、日本のみならず海外でも活発に研究がなされている。

本研究では、探索対象の植物が未利用植物、もしくはアーユルヴェーダ生薬であってもその含有成分や、薬理活性が未解明の植物が主であるため、*Entada*属植物で得られた含硫含窒素化合物のような³⁻⁵⁾、既存のものとは異なる新しいタイプの美容薬のリード化合物が期待できる。近年、活発に美白に関する研究は行われているが、実際の市場調査などによると、それら美白薬を使用して効果があると実感しているのは少数例である。そこで、遺伝的多様性に富む亜熱帯、熱帯地域産の未利用植物資源から抽出・単離を行い、美容薬の医薬シード化合物を見出すことを研究目的とする。

特に、皮膚の老化にかかわるだけでなく、糖尿病合併症

や動脈硬化症などの発症に関与することが知られている Advanced glycation end-products (AGEs) の生成阻害活性を有する化合物を天然物素材より探索する。AGEはタンパク質と糖によりメイラード反応や褐変反応といった非酵素反応で形成される。簡潔に書くとメイラード反応は二段階で起こり、最初のグリケーションは可逆的で、還元糖のカルボニルからのシッフ塩基の保護、タンパク質(リジン、アルギニン)の第一級アミノ基の保護を含んだ反応であり、イミン付加体は再転位してHbA1cのようなアマドリ化合物を形成する。アマドリ化合物は糖尿病のコントロールマーカーとして広く使われている。後の反応では複合体は不可逆的酸化反応、縮合と環化を起こし分子内外で架橋形成をして、AGEを形成する⁶⁾。

また、皮膚の老化や骨粗しょう症などの代謝性疾患、関節炎などの緩和に有効とされるコラゲナーゼ阻害化合物についても合わせて探索している。コラーゲンは動物の結合組織を構成する皮膚の弾力性やハリを保つ真皮の大部分を占める主要タンパク質であり、コラーゲンの減少・変性によってシワ、シミ、タルミなどの皮膚の老化現象が引き起こされる。種々の組織においてI型～XIII型の13種類の存在が知られている。コラゲナーゼは、コラーゲンタンパク質を特異的に切断する酵素であり、加齢や紫外線による皮膚のシワの発生や粘弾性の低下、骨粗しょう症等の代謝性疾患、炎症性疾患、リウマチなどの関節性疾患など多くの疾患に関与する。このコラゲナーゼ活性を阻害することにより、上述した疾患の改善につながると考えられる。このような背景のもと、我々は美容薬として有効な化合物を天然物素材から探索している。



Search for anti-aging drugs from ayurvedic and tropical plants

Sachiko Sugimoto

Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

2. 実験

2.1. 植物抽出エキスおよび各溶出画分からの化合物の精製・解析

本研究で用いた植物サンプルはいずれも乾燥物を室温で1週間メタノールに浸し、得られた抽出液はエバポレーターを用いて溶媒を留去させ、エキスを得た。そのエキスをヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水を用いて溶媒分配を行い、各移行部について、順相カラムシリカゲルクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィーを用いて化合物を単離した。単離した化合物については、薄層クロマトグラフィーで確認後、化学構造を決定するために、まず核磁気共鳴装置(NMR)を用いて化学構造を推定し、質量分析装置(MS)でその分子式を決定した。さらに、不斉炭素のある化合物についてはその旋光度測定や分解反応を行い立体配置を決定した。

測定機器に関しては、NMRはBruker Avance III 600 spectrometer、MSはLTQ Orbitrap XL、赤外吸収スペクトルはHORIBA FT-710、UVスペクトルはJASCO V-520 UV/Vis spectrophotometerを用い、旋光度測定にはJASCO P-1030 digital polarimeter、CDスペクトルにはJASCO J-720 spectropolarimeterを用いた。

2.2. AGEs形成阻害活性試験

96ウェルプレートに、10mg/mL ウシ血清アルブミンBSA (0.02%アジ化ナトリウムを添加した50mMリン酸緩衝液)に、0.5Mリボース溶液を加えたのち、サンプルを添加した。24時間37度で培養後、その蛍光を測定した(EnSpire, PerkinElmer Japan; Ex: 370nm, Em: 440 nm)。

ポジティブコントロールとして、アミノグアニジン塩酸塩(東京化成工業株式会社、CAS番号: 1937-19-5)を用いた(Fig. 1)。

阻害の程度については以下の式で算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Fluorescence intensity(sample)} - \text{Fluorescence intensity(blank of sample)}}{\text{Fluorescence intensity(control)} - \text{Fluorescence intensity(blank of control)}} \right) \times 100$$

sample: 試料添加

blank of sample: 試料添加、リボースを添加せずに、BSAを代わりに添加

control: 試料添加なし

blank of control: 試料添加なし、リボースを添加せずに、BSAを代わりに添加

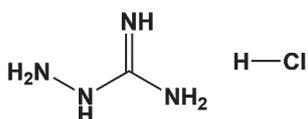


Fig. 1 Aminoguanidine Hydrochloride

2.3. コラゲナーゼ阻害活性試験

96ウェルにサンプル、50mM Tricine緩衝液、20μg/mLコラゲナーゼを加えて、37度で10分間培養後、40μg/mLの基質を加える。すぐに蛍光光度計でEx (測定励起波長)=320nm、Em (測定蛍光波長)=405nmで測定し、この時を0分後とし、15分後、30分後に測定をする。なお、測定するまでの間は常に37度にキープした。この活性試験の原理は、基質MOCAC-PRO-Leu-Gly-Leu-A₂pr (Dnp)-Ala-Arg-NH₂のLeu-Glyの結合を特異的にコラゲナーゼが切断し、切断された部分構造が蛍光光度計ではEx 320nm、Em 405nmで測定されることより、阻害化合物を添加することによって、コントロールに比べどの程度阻害されたのかが判断できる。

ポジティブコントロールはカフェイン酸(IC₅₀=2.91mg/mL、東京化成工業株式会社、CAS番号: 331-39-5)を用いた(Fig. 2)。コラゲナーゼはCollagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich Japan, C9263)を使用し、基質はMOCAC-PRO-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂(ペプチド研究所、Code:3163-vLot:630316)を、Tricineは(東京化成工業株式会社、CAS番号: 5704-04-1)を用いた。

2.4. 細胞増殖抑制試験

ヒト肺がん上皮細胞(A549)を用いて化合物の細胞増殖抑制活性を検討した。10%FBS Dulbecco's modified Eagle's mediumに100μg/mLのkanamycinおよび0.5μg/mLのamphotericin Bで培養したA549細胞を、96ウェルプレートに5 × 10³cells/wellになるように播種し、サンプルを添加後二酸化炭素存在下37度72時間培養した。ポジティブコントロールはdoxorubicinを用いた。培地を吸引後MTT溶液を加え、1.5時間さらに同様に培養した。MTT溶液を吸引し、DMSOを添加し、マイクロプレートリーダー(Abs: 540 nm)でその吸光度を測定した。

3. 結果⁷⁻⁹⁾

3.1. ウンランからの化合物の単離・構造解析

ゴマノハグサ科ウンラン属 *Linaria japonica*、和名: ウンラン(海蘭)は海岸の砂地を這うように自生する多年草で、高さは10~15cm程度であり、葉は対生か3~4枚の輪生で楕円形をしている。花は黄白色の地上部の大きさに比べ、大きな花を咲かせる。近年は自然海岸が減少していることから、それに伴い、ウンランの自生地も減少していると言

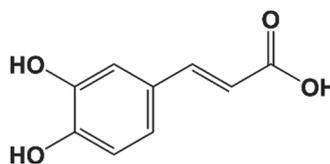


Fig. 2 Caffeic acid

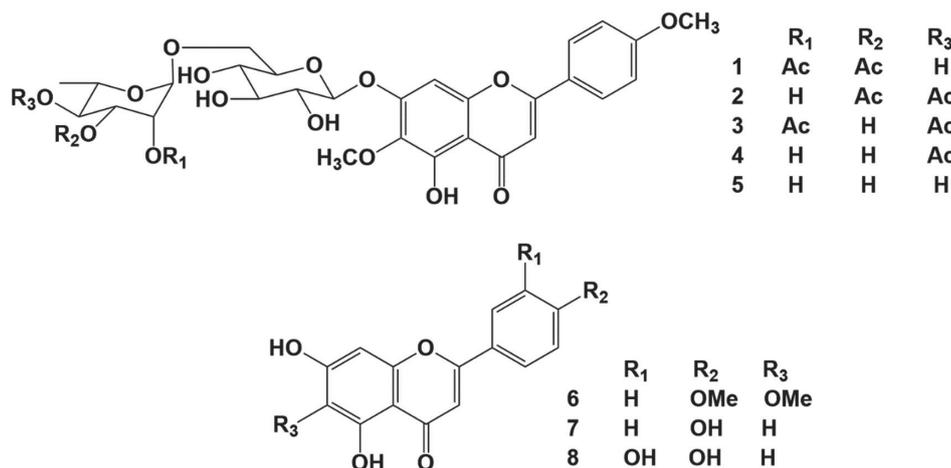


Fig. 3 Isolated compounds from *Linaria japonica*

われている。利尿作用や、緩下作用があり、乾燥した全草 5～10 gを煎じて服用する。

ウンランの全草をメタノールで抽出し、溶媒分配後、各種カラムクロマトを用いて含有化合物の単離を行ったところ、いずれもフラボノイド骨格を有する化合物が単離された (Fig. 3)。化合物 1~5 はフラボノイドの配糖体であり、そのうち 1~3 は新規化合物であったことから、各化合物をそれぞれ 5mg 秤量し、1M の塩酸を用いて酸加水分解後、amberlite IRA-400 を用いて中和後、溶媒を留去した。残渣および糖の標品をそれぞれ 0.2mL ピリジンに溶解させ L-cysteine methyl ester (15 mg/mL) を加えて 60 度で一時間反応させた¹⁰⁾。

標品との比較の HPLC 条件

[Cosmosil 5C₁₈ ARII (250 × 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque) ; 溶出溶媒 25% CH₃CN 50mM H₃PO₄ ; 流速 0.8mL/min ; カラム温度 35℃ ; 検出波長 250nm]

サンプル誘導化合物および標品の誘導化合物の保持時間は D-glucose が 18 分、L-rhamnose は 30 分であり、相違ないことを確認した。

化合物 1 は負の旋光性 (-4.81, MeOH) を示す淡黄色の粉末として得られ、高分解能マススペクトルから、その分子式が C₃₃H₃₈O₁₇ であると分かった。IR スペクトルより、ヒドロキシ基 (3437cm⁻¹)、メチレン (2933cm⁻¹)、エステル (1746cm⁻¹)、α,β-不飽和結合 (1653 および 1606 cm⁻¹)、芳香環 (1566 および 1509cm⁻¹) およびエーテル結合 (1251cm⁻¹) を有することが示唆された。¹H NMR スペクトルより、ラムノースの 6 位のメチル基に由来するピーク δH 1.17 (d, J=6.2 Hz)、2 個のアセチル基のメチル部分に由来するピーク δH 1.75 (s) および 1.93 (s)、グルコースの酸素官能基に結合した 2 つのピーク δH 3.76 (m)、4.05 (d, J=9.9 Hz)、6H 分に積分値で観測された 2 個のメトキシ基由来のピーク δH 3.89 (s)、2 個のアノメリックプロトン由来のピーク δH 4.72 (br s) および 5.19 (d, J=7.2 Hz)、2 個の芳香環の

ピーク δH 6.68 (s) および 6.89 (s)、そして AA' BB' のカップリングパターンを示したピーク δH 7.08 (d, J=8.1 Hz) および 7.95 (d, J=8.1 Hz) が観測された。

¹³C NMR スペクトルでは計 33 本の炭素が確認され、HSQC スペクトルから ラムノースの 6 位のメチル (δC 18.0)、2 個のアセチル基に由来するピーク (δC 20.6, 171.5 および δC 20.8, 172.1)、2 個のメトキシ基由来のピーク (δC 56.2, 61.7)、酸素官能基に結合したメチレン (δC 67.5)、糖部分の 8 個の酸素官能基に結合したメチン (δC 70.0, 71.1, 71.3, 71.6, 73.3, 74.8, 77.3, 77.9)、4 個の二重結合のメチン (δC 95.5, 104.5, 115.8, 129.8)、2 個のアノメリックカーボン由来のピーク (δC 99.3, 101.6)、2 個の四級炭素 (δC 108.0, 124.7)、6 個の二重結合の四級炭素由来のピーク (δC 134.0, 154.3, 154.3, 158.0, 164.5, 166.9)、およびカルボニルカーボン δC 184.6 が観測された。

糖鎖構造のうち、グルコースのアノマーカーボン δC 101.6 に対応するプロトンは HSQC より (δH 5.19) であり、そのカップリング定数は (J=7.2 Hz) であったことから、グルコースは β 結合していることが明らかとなった。さらに、ラムノースは同様に、アノマーカーボン (δC 99.3) に対応するプロトンは (δH 4.72) に観測され、これは brs に観測されたことから、ラムノースは α 結合していることが判明した。

これらの NMR データは 2'' と 3''' 位の値を除いて linariin と非常に類似していた (Fig. 4)⁹⁾。低磁場に観測されたプロトンおよび δH 5.15、カーボン δC 71.1 の値から、アセチル基の一つは 2''' に結合していると推測された。また、同様に δH 5.01 に観測されたプロトン、δC 73.3 に観測された

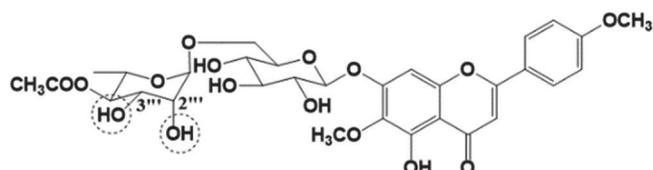


Fig. 4 Linariin

カーボンから3''位にもう一つのアセチル基が結合していることも推測された。これらはいずれも、二次元NMRの測定方法の一つであるHMBC相関から区別され、結合位置が決定できた。すなわち、H-2'' (δ H 5.15)と3'' (δ H 5.01)はそれぞれ δ C 171.5 (2''OAc)と172.1 (3''OAc)に相関が観測された。また、グルコースのアノマープロトンから7位の δ C 158.0 (C-7)にHMBC相関がみられ、ラムノースのアノマープロトンからはグルコースの6位である6''位 δ C 67.5 (C-6'')にHMBC相関が観測されたことから、それぞれ糖鎖の結合位置の決定をした。以上のように、各種物理化学データの解析および酸加水分解を行い、化合物1をpectolarigenin-7-O- β -D-glucopyranoside-(1 \rightarrow 6)-2'',3''-O-diacetyl- α -L-rhamnopyranosideであると決定した。

他の化合物も同様の手法を用いて、その構造解析を行った。また既知化合物については報告のある文献をもとに、同定を行った。

3. 2. ウンランから単離された化合物のAGEs形成阻害活性

単離した全化合物についてAGEs形成阻害活性試験を行った結果、ポジティブコントロールとして用いたアミノグアニジン塩酸塩(図中はAGと表記)はIC₅₀が1.29 mMであ

ったのに対し、得られた新規化合物1から3のIC₅₀値はそれぞれ34.8 μ M、35.0 μ M、19.5 μ Mであり、ポジティブコントロールよりもかなり36~60倍程度強い阻害活性を示した。また既知化合物である化合物8のIC₅₀は85.8 μ Mであり、こちらも中程度の阻害活性を示した。なお、活性試験の回数は3回行っている(Fig. 5)。

3. 3. ウンランから単離された化合物のコラゲナーゼ阻害活性

単離した化合物に対して、活性試験を検討した結果、化合物4と化合物5のIC₅₀は79.4および78.6 μ Mであり、単離した化合物のうち一番活性が強かったのはluteolin(化合物8, 40.5 μ M)であった。ポジティブコントロールのカフェイン酸のIC₅₀は0.12 mMであったので、有意な阻害活性を示すことを明らかとした。しかしながら、新規化合物1~3には有意な活性が認められなかった(Fig. 6)。

3. 4. ウンランから単離された化合物の細胞増殖抑制活性

得られた化合物について細胞増殖抑制試験を行った。その結果、ポジティブコントロールとして用いたdoxorubicinのIC₅₀は0.70 μ Mであり、化合物6および8

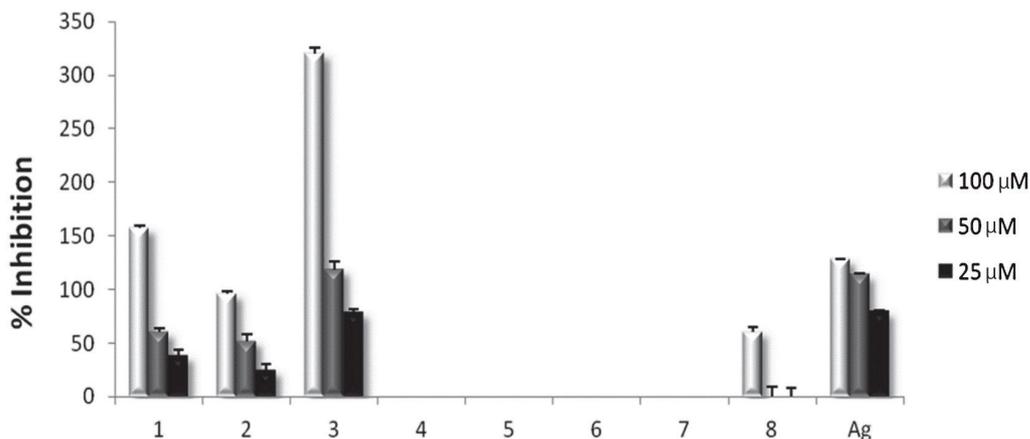


Fig. 5 AGEs formation inhibitory activity of compounds 1-8

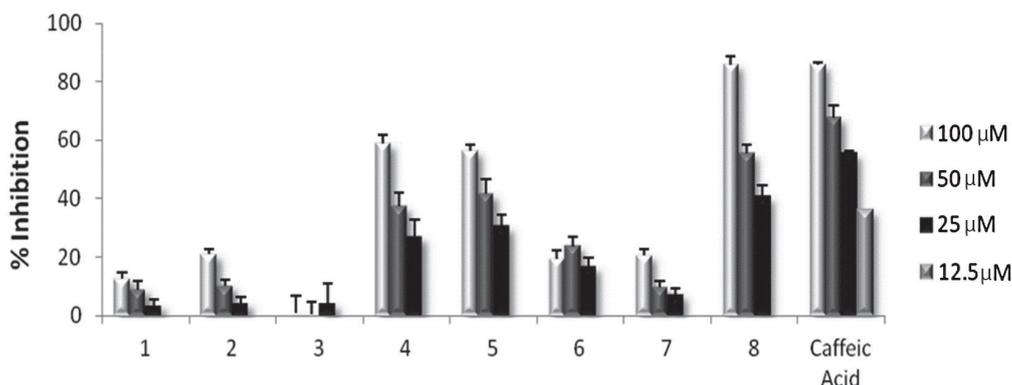


Fig. 6 Collagenase inhibitory activity of compounds 1-8

のIC₅₀は91.1および82.6 μMであり、ポジティブコントロールに比べて弱いものであった。

3. 5. *Ixora undulata*からの化合物の単離

アカネ科イクソラ属 *Ixora undulata* は東南アジアでは寺院への参拝の際に用いられる植物であり、赤やピンクなどの花を咲かせる。同属植物の *Ixora chinensis* はイリドイド化合物などがこれまでに、単離報告があるが、本植物については未詳であった。また、本植物は日本には自生しておらず、今回使用したものはエジプトで採取したものである。本植物も同様に化合物を探索し、その化学構造を決定した (Fig. 7)。

3. 6. *Ixora undulata* から単離された化合物のAGEs形成阻害活性

得られた化合物に活性試験を行った結果、化合物 9、10、12 それぞれのIC₅₀ は76.6 μM、98.6 μM および 86.0 μM であった。ウンランから得られた化合物ほどではないが、本植物からも抗糖化抑制化合物が単離された。また、いずれの化合物にも細胞毒性は認められなかった。

3. 7. ミツバウツギからの化合物の単離およびコラゲナーゼ阻害活性

ミツバウツギ (*Staphylea bumalda* DC.) は山菜としての食経験を有する植物であり、アジアに分布する落葉低木で樹高は約3~5m、5~6月に白い花を咲かせる。葉は楕

円形で細鋸歯があり、三出複葉で対生する。山斜面の道端などに生え、新芽や若葉は山菜として食されてきた。果実に鎮咳去痰作用、根に活血作用がある。本植物の葉部に関して当研究室から新規メガスティグマン配糖体等を報告しているが¹¹⁾、機能性についての詳細な検討はこれまであまり行われていない。そこで、ミツバウツギ葉部の成分分析および各種活性評価試験を通して、本植物の機能性成分についての研究を行うこととした。

ミツバウツギ乾燥葉 5.71 kg の MeOH 抽出物を n-Hexane、EtOAc、1-BuOH、H₂O で順次分配後、これらの画分について各種生物活性試験を行った結果、EtOAc 可溶画分にコラゲナーゼ阻害活性を見出し EtOAc 可溶画分について、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより 11 フラクションに分画し、活性試験を行った (Fig. 8)。そのうち、活性の比較的強かった fr. 2、3 は、TLC および HPLC 分析を詳細に行った結果、脂肪酸類、クロロフィル、カロテノイドなどを主に含むことが示唆された。これらの成分は植物には普遍的な成分であることから、これ以上の解析は行わなかった。

そこで、残る fr. 4~11 について、活性を指標に逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分離・精製を行った結果、12 種の化合物を単離することに成功した (Fig. 9)。単離した化合物についてコラゲナーゼ阻害活性試験を行った結果、終濃度 100 μg/mL において化合物 14、16~18 に阻害活性が見られた (Fig. 10)。

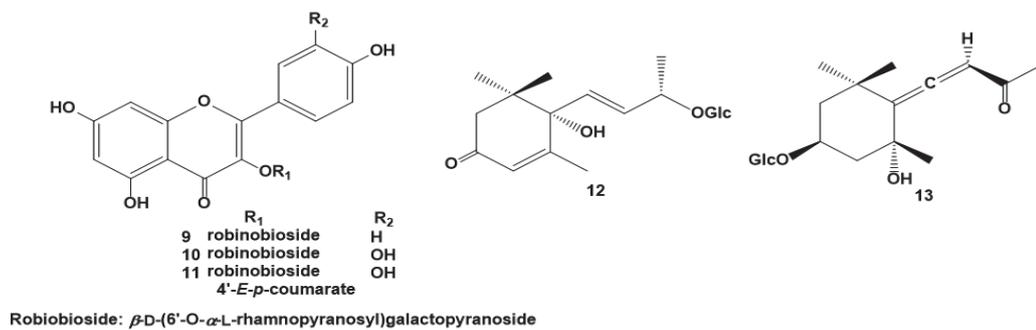


Fig. 7 Isolated compounds from *Ixora undulata*

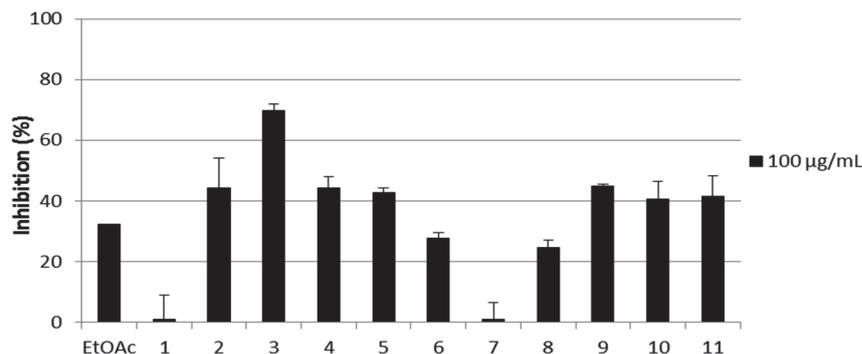


Fig. 8 Collagenase inhibitory activity of EtOAc layer after silica gel cc

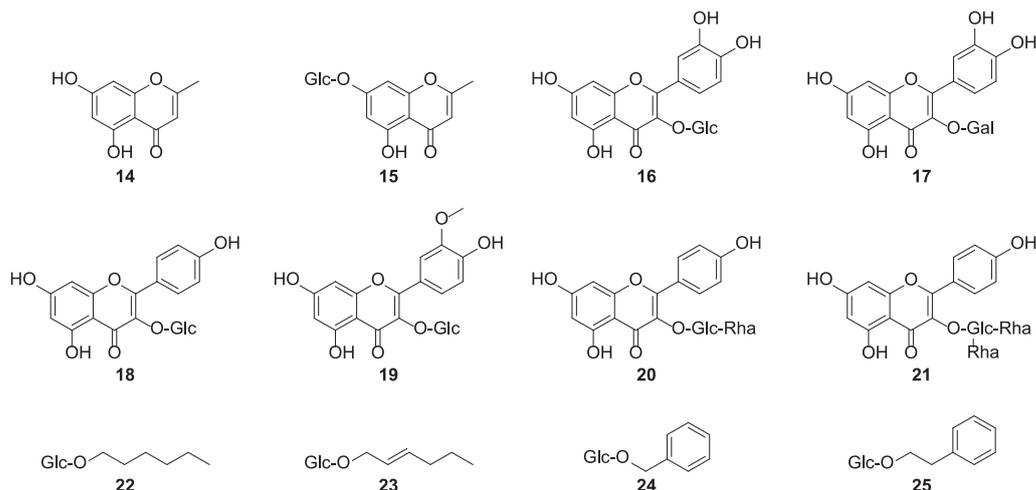


Fig. 9 Isolated compounds from *Staphylea bumalda* DC.

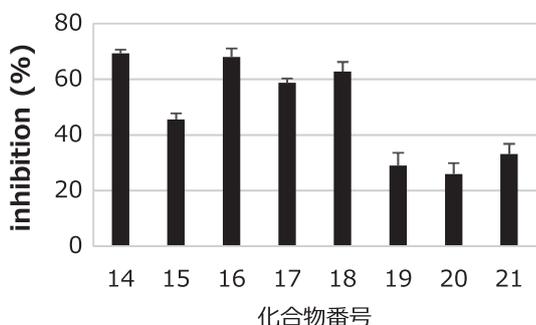


Fig. 10 Collagenase inhibitory activity of compounds 14-21

4. 考察

天然物素材は研究をやり尽くせないほどの数が存在し、まずは植物の選定が非常に重要となる。そこで特に含有成分や薬理活性が未詳の植物に限定して研究を行ったところ、ウンラン、Ixoraの抽出エキスが抗糖化抑制活性を有し、ウンラン、ミツバウツギの抽出エキスがコラゲナーゼ阻害活性を有することを見出した。続いてこれらの有効成分の単離構造解析を行ったところ、いずれもフラボノイド骨格を有する化合物が主な活性物質として得られた。一方、3.5.で示したIxora属から単離されたメガスティグマン配糖体は、天然物化学の分野ではあまり有用な活性が認められていなかった化合物群であり、今回、このメガスティグマンに強い活性が認められたことは大変に重要な知見となる。さらに、抗糖化抑制活性のポジティブコントロールである、アミノグアニジンは緒言にも書いたが、臨床試験にまで進んだ化合物でありながら、その副作用の為に薬となることはなかった。そういった背景から、今回の研究で抗糖化抑制活性を示しながら細胞毒性のない化合物が得られたことは重要な知見である。未利用植物の成分分析を通してその有用性を検証することや、様々な構造、薬効を持つ天然物を見出し、構造と薬効の情報を蓄積していくことが天然資

源の有効活用と創薬の両観点から重要である。

今後は、当研究室に保有するメガスティグマン化合物群について、抗糖化抑制試験を行い、その構造活性相関研究を行いたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Reddy V. Prakash, Beyaz Ayse: Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* 11, 646-654 (2006).
- 2) Fumihiko Teramachi, Takashi Koyano, Thaworn Kowithayakorn, Masahiko Hayashi, Kanki Komiyama, Masami Ishibashi: Collagenase Inhibitory Quinic Acid Esters from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.*, 68, 794-796 (2005).
- 3) Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Medicinal plants of Thailand. I: structures of rheedeiosides A-D and cis-entadamide A β -D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei* Sprengel. *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 466-471 (2011).
- 4) Yoshihiro Iwamoto, Sachiko Sugimoto, Liva Harinantenaina, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Entadosides A-D, triterpene saponins and a glucoside of the sulphur-containing amide
- 5) from the kernel nuts of *Entada phaseoloides* (L.) Merrill. *J. Nat. Med.*, 66, 321-328 (2012).

- 6) Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Medicinal plants of Thailand. II: chemical studies on the seed kernels of *Entada rheedii* Sprengel. *J. Nat. Med.*, 66, 552–557 (2012).
- 7) Luc Séro, Lionel Sanguinet, Patricia Blanchard, Bach Tai Dang, Sylvie Morel, Pascal Richomm, Denis Séraphin, Séverine Derbré: Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules* 18, 14320–14339 (2013).
- 8) Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Sukardiman, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami: New cis-ent-clerodanes from *Linaria japonica*, *Phytochemistry Letters*, 14, 56–62 (2015).
- 9) Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Sukardiman, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami: New isolinariins C, D and E, flavonoid glycosides from *Linaria japonica*, *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 517–521 (2016).
- 10) Sachiko Sugimoto, Samir Wanas Amira, Tsutomu Mizuta, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Structure elucidation of secondary metabolites isolated from the leaves of *Ixora undulate* and their inhibitory activity toward advanced glycation end-products formation, *Phytochemistry*, 108, 189–195 (2014).
- 11) Takashi Tanaka, Tatsuya Nakashima, Toshihisa Ueda, Kenji Tomii, and Isao Kouno: Facile Discrimination of Aldose Enantiomers by Reversed-Phase HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 899–901 (2007).
- 12) Hideaki Otsuka, Yu Qian, Katsuyoshi Matsunami: Bumaldosides A, B and C from the leaves of *Staphylea bumalda*, *Heterocycles*, 80, 339–348 (2010).