

EUPHORBIACEAE VE THYMELAEACEAE FAMILİYALARININ BAZI CİNSLERİNDE BULUNAN DİTERPENLER I. YAPILARI VE İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Mualla YENEN *

ÖZET:

Euphorbiaceae ve Thymelaeaceae familyalarında dağılmış olan diterpenlerin yapıları ile izolasyonları üzerinde yapılmış araştırmalar özetlenmiştir.

LES DITERPÉNES D'EUPHORBIACÉES ET DE THYMÉLÉACÉES. I. LES STRUCTURES ET LES METHODES D'ISOLATION

RESUME:

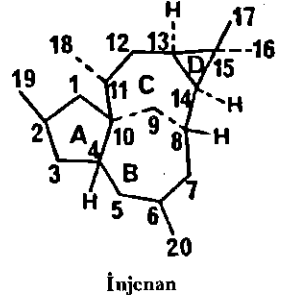
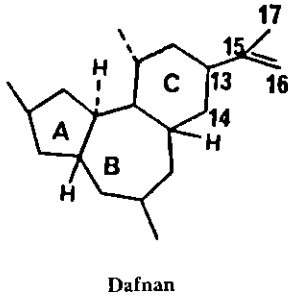
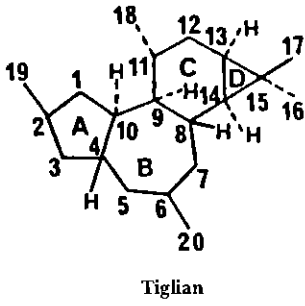
On a fait revue les structures et les méthodes d'isolation des diterpenes dans les familles des Euphorbiacees et des Thyméléacées.

Yüksek bitkilerin biyolojik aktivite gösteren kimyasal yapıları üzerindeki sistematik araştırmada son zamanlarda hayli gelişme olmuş; tıp ve eczacılıkta entere-san birçok sekonder metabolitin yeni birkaç sınıfı daha bulunmuştur. Tiglian, dafnan ve injenanlar olarak bilinen diterpenler oldukça önemli bir gruptur (Şekil 1).

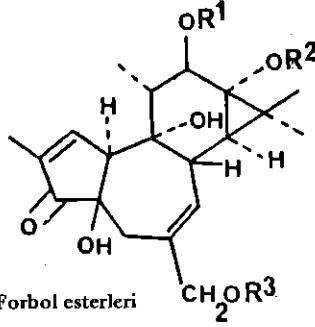
Kompleks bir ayırım (1) sonucu bulunan bu bileşiklerden ilki; *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) (2) ve daha sonra da

Euphorbia türlerinden (3) bir esterler serisi olarak izole edilen, bir tiglian olan forbol'dür (Şekil 2) (Tablo 1). Son zamanlarda benzer yapıların, Euphorbiaceae ve Thymelaeaceae familyalarındaki bazı genuslarda bulunduğu ortaya konmuştur. Bu bileşiklerin, az ya da çok oranda iki toksikolojik etkisinin bulunduğu açıklanmıştır. Bunlardan ilki, cilde uygulandığında oluşturduğu kuvvetli inflamasyon (4), diğeri ise karsinojen etki eşliğinin al-

(*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı.



Şekil 1. Tiglian, Dafnan ve İnjenan İskeletleri.



Tablo 1. Forbol esterleri

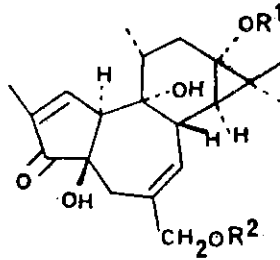
R ¹	R ²	R ³	Kaynağı
Tetradekanoat	Asetat	H	} Croton tiglium
Dekanoat	Asetat	H	
Dodekanoat	Asetat	H	
Hekzadekanoat	Asetat	H	
2-Metilbutirat	Dodekanoat	H	
2-Metilbutirat	Dekanoat	H	
Asetat	Dodekanoat	H	
Asetat	Dekanoat	H	
Tigliat	Dekanoat	H	
Tigliat	Oktenoat	H	
2-Metilbutirat	Oktenoat	H	
Tigliat	Dekanoat	H	
Tigliat	Dodekanoat	H	
Tigliat	Butirat	H	
Butirat	Dodekanoat	H	
Dodekanoat	Asetat	H	} C.sparciflorus
Dodekanoat	Asetat	Linolenat	
İzobutirat	Asetat	Anjelat	} Euphorbia franckiana
2-Metilbutirat	Anjelat	H	
Deka-2,4,6-trienoat	Asetat	H	

tında farelere uygulanmaya devam edildiğinde gösterdiği tümör yapıcı etkidir (5). Bu toksinlerin etki mekanizması yapılan biyokimyasal çalışmalarla, birbirini izleyen inflamasyon oluşumuyla malign cilt tümörünün başlangıç mekanizmasına bağlı olarak açıklanabilir. Daha önemlisi de, bu esterlerin bazısının antilösemik etki göstermesidir.

Tiglian diterpenleri ve esterleri: Forbol tetrasiklik tiglian çekirdeği taşıyan bir diterpendir (Şekil 2). 5 üyeli bir A, 7 üyeli B, 6 üyeli C halkalarını ve bir siklopropan sistemi olan D halkasını taşımaktadır. 6 Oksijen fonksiyonu vardır ve A halkasında C-3'te $\alpha\beta$ - doymamış ketol; B halkasında C-20'da, B ve C halkalarının birleşme yerinde C-9'da ve C halkasında C-12 ile C-13'te 1,2-diglikol oluşturarak lokalize olmuşlardır. Forbolün doğal olarak ester halinde bulunduğu düşünülmektedir. Forbolün 12,13-diesterlerinin bir kısmı ile "kriptik iritanlar" olarak bilinen üç triesteri *Croton tiglium* yağundan, daha sonra

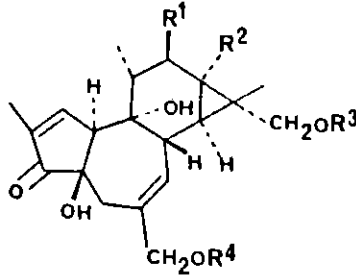
da di- ve triesterleri, *Croton sparciflorus* (6), *Sapium japonicum* (7), *Euphorbia tirucalli*(4), *E. corerulescens* ve *E. frankiana*'dan (8) izole edilmiştir. İlk olarak *Euphorbia triangularis*'ten (9,10) izole edilen önemli bir alkol olan 12-deoksiforbol (Tablo 2), C-13'te bir dizi monoesterleri ve C-13 ile C-20 de de diesterleri halinde bulunmaktadır. Bu esterler, forbol esterlerinden daha yaygın bir biçimde *Euphorbia* genusuna dağılmıştır (11,12,13,14). C-20'deki acil grubu, *Euphorbia balsamifera* lateksindeki bir ester dışında, asetatı halinde ayrılmıştır. Ana diterpen, forbolden daha dayanıksız olup ancak diasetatı halinde izole edilebilir. Söz konusu diterpen, 12-deoksi-16- hidrok-siforbol, iki *Euphorbia* türünden elde edilmiştir. Diğer *Euphorbia* tiglianlarından farklı olan bu bileşiğin siklopropan halka sisteminde C-16'da primer bir hidrok-sil grubu bulunmaktadır (15). Bu, *Aleurites fordii* (Euphorbiaceae)den elde edilen 16-hidroksiforbol ile yakından ilişkilidir (Tablo 3).

Tablo 2. 12-Deoksiforbol esterleri



R ¹	R ²	Kaynak
İzobutirat	H	<i>Euphorbia triangularis</i> , <i>E. poisonii</i>
Anjelat	H	<i>E. poisonii</i>
Anjelat	Asetat	<i>E. resinifera</i> , <i>E. poisonii</i>
Dodekanoat	Asetat	<i>E. coerulescens</i>
Dodekadienoat	Oktadienoat	<i>E. balsamifera</i>

Tablo 3. 12 - deoksi - 16 - hidroksiforbol ve 16 - hidroksiforbol esterleri

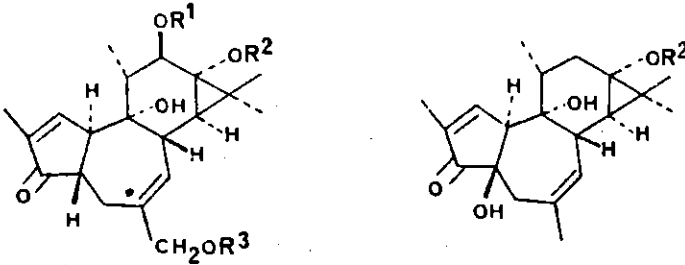


R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Kaynak
H	Anjelat	İzobutirat	H	Euphorbia cooperi
H	Anjelat	İzobutirat	Asetat	Euphorbia cooperi
H	Fenilasetat	2-Metilbutirat	Asetat	E.poisonii
H	Fenilasetat	2-Metilbutirat	H	E.poisonii
Palmitat	Anjelat	H	H	Aleurites fordii

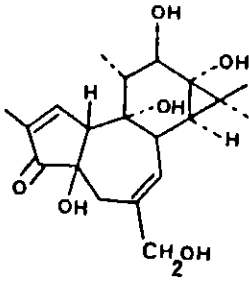
Fürstenberger ve Hecker (5), daha önce izole edilmiş forbol bileşiklerinin analogu olan bir seri 4-deoksiforbol esterini bulmuşlardır (Tablo 4). Tablo 1-3'de görülen esterler, memeliler sisteminde az ya da çok, biyolojik aktivite göstermektedirler. *E.unispina* ve *E.resinifera*'nın iki esterinin kullanılan standart test sistemlerin-

de aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür (16). Bu bileşikler, 12,20-dideoksiforbol'ün monoesterleri olup, C-20'de metil grubu taşıdığı tahmin edilen diterpenlerin tek örneğidirler. Birkaç minör bileşik, hidroliz edilen *Croton tiglium* yağından sentetik asetatları halinde elde edilmiştir.

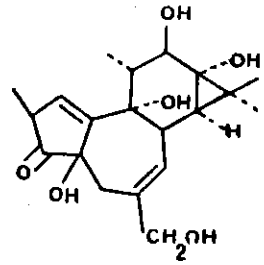
Tablo 4. 4-Deoksiforbol ve 12, 20-dideoksiforbol esterleri



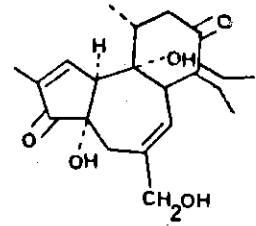
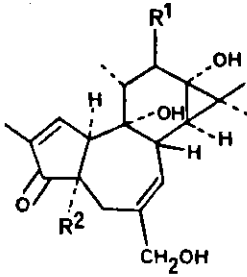
4 - deoksiforbol		12,20-dideoksiforbol	
R ¹	R ²	R ³	Kaynak
Asetat	CH ₃ (CH ₂) ₂ (CH = CH) _n CO n = 2, 3, 4, 5	H	Euphorbia tirucalli
Asetat	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH = CH) _n CO n = 1, 2, 3, 4	H	
CH ₃ (CH ₂) _m (CH = CH) _n CO m = 2, n = 2, 3, 4, 5	Asetat	H	



10β-forbol



Δ¹⁻¹⁰ izoforbol



R¹

R²

H	OH	12-deoksi-4α-forbol
OH	OH	4α-forbol
OH	H	4-deoksi-4α-forbol

Croton rhamnifolius'tan izole edilen diterpen

Şekil 3. Diğer tiğlian türevleri

Bunlar 4α-forbol, 4-deoksi-4α-forbol, 10β-forbol ve Δ¹⁻¹⁰-izoforboldür (2) (Şekil 3). Benzer şekilde, *E. triangularis*'ten (9) 12-deoksi-4α-forbol, *Croton rhamnifolius*'tan da trisiklik bir diterpen (17) elde edilmiştir.

Dafnan diterpenleri ve esterleri: Dafnanlar yapı olarak tiğlianlara benzeyen trisiklik diterpenlerdir. Tiğliandaki siklopropan D halkası, dafnanlarda C-13'teki izopropilen yan zincirini vermek üzere açılmıştır (Şekil 1). Bu bileşikler, çoğunlukla doğal olarak ortoesterleri halinde bulunmaktadır; ve oksijen köprüsü, hemiasetal yapı gösteren tetradotoksin'in (18) oksijen köprüsünü hatırlatmaktadır. Bu nedenledir ki orto-ester dafnanların, hayvan sistemlerinde birçok biyolojik aktiviteye sahip olmaları enteresandır.

Bu serinin ilk bileşiği, *Daphne mezere-*

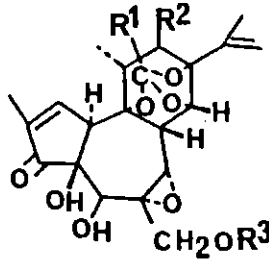
um (Thymelaeaceae) dan elde edilmiş olan dafnetoksidir. Dafnetoksin, tipik bir izopropilen yan zinciri taşır; C-6 ve C-7'de bir epoksit grubu, C-5'te sekonder bir hidroksil grubu ve C halkasının C-9, C-13 ve C-14 arasında bir orto-ester benzoat köprüleşmesi bulunmaktadır. Mezerin, dafnetoksinin 12-0-açıl esteri olup, aynı bitkiden ve *Lasiosiphon burchellii* (Thymelaeaceae) den elde edilmiştir (7,19). Daha sonraları, benzer esterlerin bir serisi birçok *Gnidia* türlerinden (20,21, 22) izole edilmiştir (Tablo 5). Euphorbiaceae familyasından da bu bileşiklere benzer bileşikler elde edilmiştir.

Dafnan diterpenlerinin üçüncü grubu, özellikle *Euphorbia* genusunda bulunmaktadır. Bu bileşikler, forbol tipi diterpenlerin B halkasındaki C-6 ve C-7 arasında çift bağ taşıyan grubun önceki örneklerin-

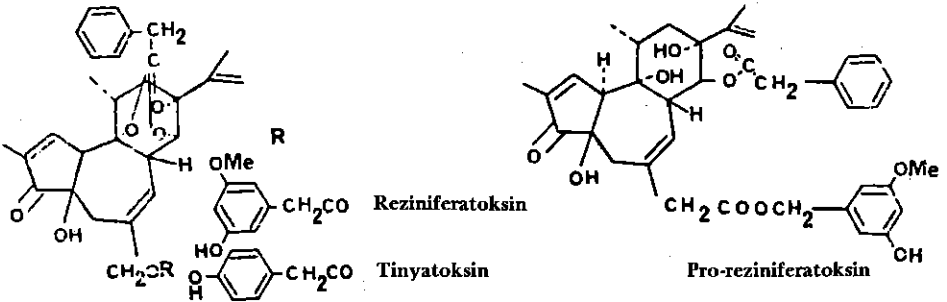
den farklıdır. Reziniferatoksin, bu grubun ilkidir ve hemen hemen aynı zamanlarda *Euphorbia unispina*, *E.resinifera* ve *E.poisinii*'den elde edilmiştir (16,12,23) (Şekil 4). Reziniferatoksin *E.poisinii* lateksinde, benzer bileşik olan ve yalnız C-20 de doğal olarak O-açıl grubu taşıyan tinyatoksin ile birlikte bulunmaktadır. Bu iki tok-

sin, bu tip diterpenlerin en etkili cilt iritandır (12). Pro-reziniferatoksin (Şekil 4), *Euphorbia* türlerinde reziniferatoksin (16) ile birlikte bulunmaktadır ve bu bileşiğin muhtemel biosentetik bir prekürsör olduğu, hafif asit katalizi ile reziniferatoksin'e dönüştüğü düşünülmektedir (16,13).

Tablo 5. Dafnan grubu bazı diterpen esterleri



Esterler	R ¹	R ²	R ³	Kaynak
Dafnetoksin	C ₆ H ₅	H	H	Daphne mezereum
Mezerein	"	C ₆ H ₅ (CH = CH) ₂ COO	"	Lasiosiphon burchellii
Gnidisin	"	C ₆ H ₅ . CH = CH.COO	"	Gnidia lamprantha



Şekil 4. Diterpenlerin orto-esterleri

İnjenan diterpenleri ve esterleri: İnjenanlar, *Euphorbia* genusundaki tetrasiklik diterpenlerin yeni bir grubu olup ilk örneği, injenoldür. Bu bileşik, *Euphorbia ingens* (1,5), *E.desmondi* (24,25) nin latekslerinden ve *E.lathyrus*'in tohum yağından (7) izole edilmiştir. Bu ana diterpen, 5 üyeli A halkasına bağlı 7 üyeli B halkası

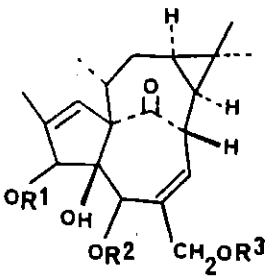
taşıyan forbolle yapısal bakımdan ilişkilidir (Şekil 1). İnjenol, β^α - keto köprüsünden dolayı, C-9'daki kuaterner merkeze C-10 ile bağlı 7 üyeli C halkası taşıması nedeniyle, forbolden farklıdır. Diğer yapısal benzerlikler, A halkasında C-1 ile C-2 arasındaki ve B halkasında C-6 ile C-7 arasındaki birer çifte bağ; C-20'deki pri-

mer alkol grubu ile A ve B halkalarının birleştiği konumda trans konfigürasyonda 4β - hidroksil grubu ve siklopropan D halkasıdır. Forboldeki 12, 13-diglikol grubu injenolde mevcut değildir, ancak A halkasında C-3'te ve B halkasında C-5'te iki sekonder hidroksil grubu görülmektedir. *Euphorbia ingens*'ten injenan iskeletinin C-3 veya C-20 konumlarında tek bir açıl grubu taşıyan bir seri injenol esterleri izole edilmiştir (1,5). Daha sonra, *E.lathyris*, *E.jolkini*, *E.kansui*, *E.resinifera* ve *E.esula*'dan (7,26)da diğer esterler elde edilmiştir (Tablo 6). Ayrıca *E.millii*'den de (27, 28) bir grup az rastlanan injenol peptitleri, Miliaminler izole edilmiştir. Şimdiki halde, injenolün iki *Elaeophorbia* türünde bulunması dışında, *Euphorbia* genusuna yayılışının sınırlı olduğu düşünülmektedir (29). Genusun Webster tarafından yapılan son revizyonunda *Elaeophorbia*'lar, *Euphorbia*'nın alt genusu olarak yer

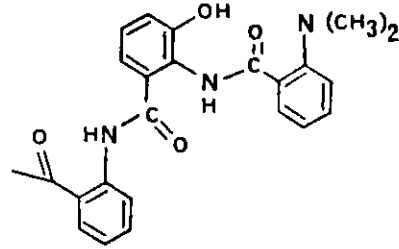
almaktadır. Diğer bazı injenan diterpenleri, bu genus türlerinden izole edilmiştir. 5-Deoksiinjenol (30) bunların ilki olup diasetatı halinde *E.biglandulosa* ve *E.myrsinites*'ten elde edilmiştir. (Tablo 7). Bir seri 16-hidroksiinjenol esterleri *E.ingens* ve *E.lactea*'dan (31,32); bazı 13-oksiinjenol esterleri (33) ile daha sonra da 20-deoksiinjenol (26) bileşikleri *E.kansui*'den izole edilmiştir.

İzolasyon Yöntemleri: Nötral lipid bileşikler olan diterpen esterlerinin kompleks ve izolasyonları partisyon yöntemine dayanmakta; bu nedenle izolasyon ve purifikasyonları için kromatografik özellikleri gerekli olmaktadır. Ayırılmaları, nukleustaki hidroksil gruplarının konumu ve değişik sayıları ile açıl yarılarının tipi ve molekül ağırlıkları yardımıyla yapılmaktadır. Bu bileşikler, ısıya, ışığa, oksijene, asit ve alkali şartlara duyarlı olduklarından stabil değildirler (1,2).

Tablo 6. *Euphorbia* genusundaki bazı injenol esterleri



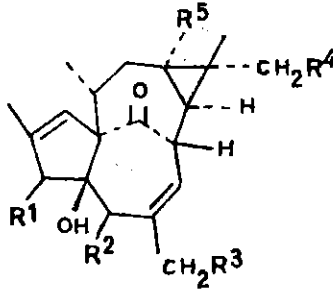
Injenol



Miliamin peptidi

R ¹	R ²	R ³	Kaynak
Palmitat	H	H	<i>Euphorbia lathyris</i> , <i>E. ingens</i>
H	H	Palmitat	<i>Euphorbia lathyris</i> , <i>E. ingens</i>
CH ₃ (CH) ₂ (CH = CH) ₅ CO	H	H	<i>E.jolkini</i> , <i>E.lathyris</i>
CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH = CH) ₂ CO	H	Asetat	<i>E.kansui</i>
Benzoat	H	Benzoat	<i>E.esula</i>
2-Metildekanoat	H	H	<i>E.resinifera</i>
Peptid	H	Asetat	<i>E.millii</i>
H	H	Peptid	<i>E.millii</i>

Tablo 7. İnjenan diterpenleri



Ana diterpen	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Kaynak
5-Deoksiinjenol	Asetat	H	Asetat	H	H	1,2
16-OH-injenol	Asetat	Asetat	Asetat	Asetat	H	3
16-OH-injenol	2-4,-6- dekatrienoat	OH	OH	Anjelat	H	4
13-Oksiinjenol	OH	OH	OH	H	Dodekanoat	5
20-Deoksiinjenol	Benzoat	OH	H	H	H	5

1.Euphorbia myrsinites, 2.E.biglandulosâ, 3.E.ingens, 4.E.lactea, 5.E.kansui

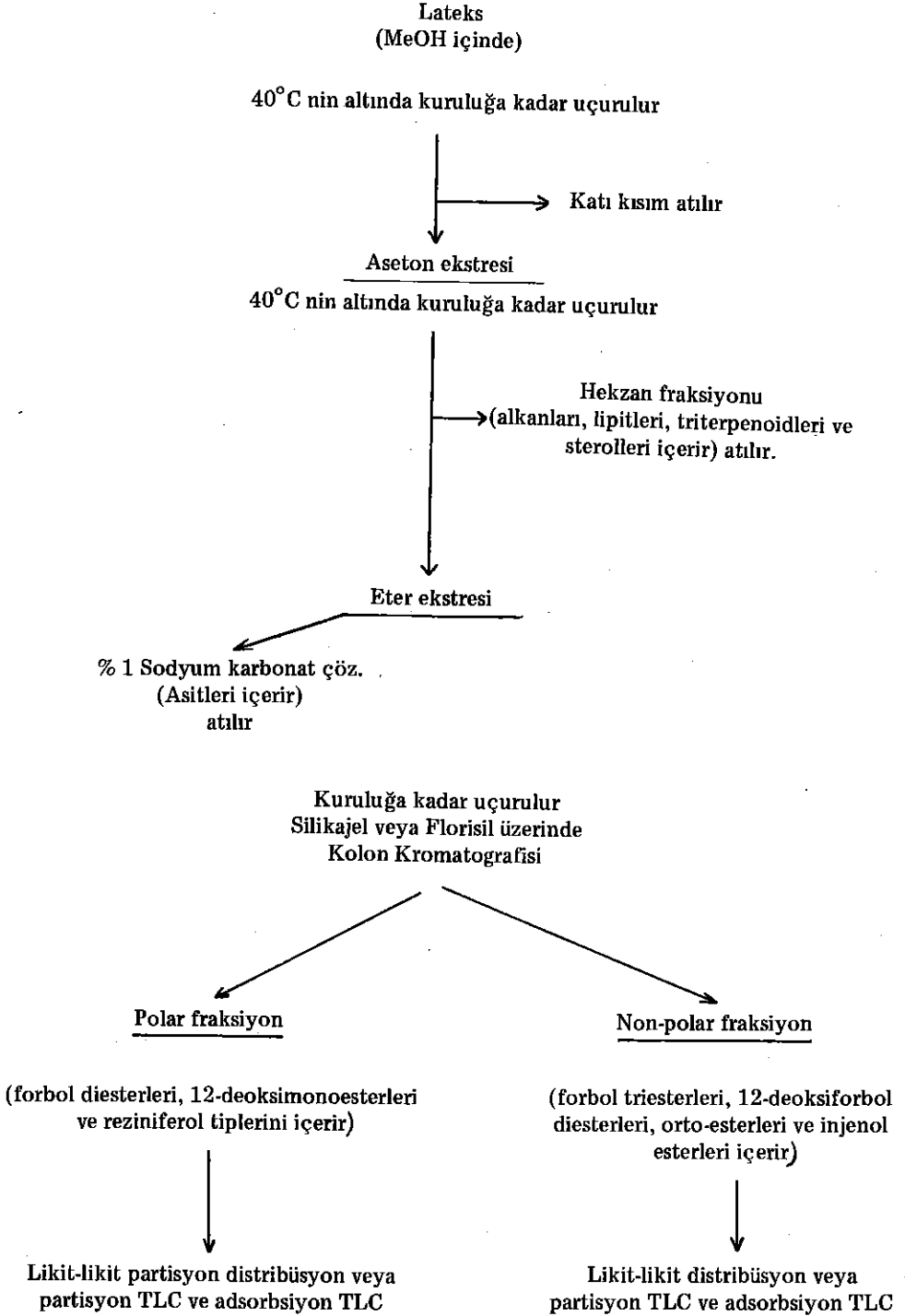
Kurutulmuş lateks, metanol ya da aseton ile ekstre edilir. Solvan uzaklaştırıldıktan sonra, artık metanol - su karışımında çözülür. Böylece ekstre, triterpenler ve steroidlerden temizlenmiş olur ve polar metanolik çözeltinin eterle ekstraksiyonu ile iritan toksinler, eter fazında elde edilir (11,12,13) (Şekil 5). Eter fazı, kolon kromatografisiyle herbiri birkaç diterpen esteri içeren fraksiyonlara ayrılabilir. Konvansiyonel gradient elüsyon yöntemi ile Silikajel (1,2,34,35) ve Florisil (7) adsorbanları kullanılmaktadır. Karışımların daha sonraki ayırımı için bir seri adsorban üzerinde tekrarlanan kolon ayırımını partiyon yöntemi izlemiştir. Elle kullanılan O'Keefe tipi veya otomatik Craig tipi likit-likit distribüsyonu kolayca uygulanmıştır. Son zamanlarda, stasyoner faz olarak dietilen glikol veya polietilen glikol'un kullanıldığı preparatif ince tabaka tekniği, hem partiyon ayırım hızını ve hem de çözünürlüğü büyük oranda artırmıştır. Reçineli ürünlerin son purifikasyonları, tamponlanmış silikajel ince tabaka plaklarında (2, 7) veya yüksek basınç

sıvı kromatografisiyle (33) yapılmıştır. Reçinelerin saflığı, kantitatif olarak yapılan biyolojik bir testle birlikte kütle, ince tabaka ve gaz kromatografileriyle denetlenebilmektedir (25, 36).

Mikro-Analitik Teknikler: Az miktardaki bitki materyali ya da kolonlardan alınan fraksiyonların incelenmesi için birçok mikro yöntem vardır. Birkaç ana alkolün asetatlarını (37) incelemek üzere ince tabaka kromatografisiyle yapılan geniş kapsamlı bir çalışma 11 solvan, 3 adsorban ve birkaç püskürtme reaktifini kapsamaktadır (Tablo 8). Kütle spektroskopisi bilgileriyle birleştirildiğinde, az miktarlardaki birçok tiglian ve injenan grubu diesterin teşhisi mümkün olabilmektedir. Asetatların kullanılan solvan sistemlerindeki sınırlanma oranı, nükleustaki hidroksil gruplarının konumuna ve sayısına, daha az olarak da asetil gruplarının tip ve sayısına bağlı olarak bulunmuştur (8,37).

Gaz likit kromatografisi de, bitki materyalinin analizinde çabuk, kalitatif ve kantitatif bir metottur (38). Forbol ve

Şekil 5. Toksinlerin ekstraksiyonu



injenolü de içine alan çok sayıda diterpen SE-30 ve EGS kolonlarında, daha stabil olan asetatları halinde kantitatif

olarak değerlendirilmiştir (38). Forbol ve diesterlerinin PLC ile ayırmaları ise Sil-x üzerinde yapılmıştır (39).

Tablo 8. Diterpen asetatlarının ayırımı için kullanılan adsorban ve solvanlar

Silikajel G	Kloroform - Eter (95:5) Eter-Etil asetat-Sikloheksan (1:1:1) Sikloheksan-İzopropanol (2:1)	Forbol triasetat 12 - Deoksiforbol diasetat 4-Deoksi-4 α - forbol triasetat 4 α - Forbol triasetat 4 α - Forbol tetraasetat İnjenol triasetat
Silikajel H	Kloroform-Etil asetat (2:3)	
Al ₂ O ₃	Toluen-Etil asetat (9:2) Kloroform-Aseton-Benzen (95:5:50) Sikloheksan-Eter-Benzen (1:2:1) Sikloheksan-Benzen-Etil asetat-Eter (20:40:30:15) Kloroform-Eter-Benzen (1:3:3) Etil asetat-Benzen (1:3) Kloroform	

KAYNAKLAR

1. Hecker, E.: Co-carcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* 28, 2338 (1968)
2. Hecker, E. and R. Schmidt: Phorbol esters, the irritants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L. *Progress in the Chemistry of Natural Products.* 31, 377 (1974).
3. Kinghorn, A.D. and F.J. Evans: Isolation of phorbol from *Euphorbia franciana*. *Phytochem.* 14, 585 (1975).
4. Kinghorn, A.D. and F.J. Evans: A biological screen of selected species of the genus *Euphorbia* for skin irritant effects. *Planta Med.* 28, 325 (1975).
5. Fürstenberger, G. and E.Hecker: Zum Wirkungsmechanismus co-carcinogener Pflanzeninhaltsstoffe. *Planta Med.* 22, 241 (1972)
6. Upadhyay, R.R. and E.Hecker: A new cryptic irritant and co-carcinogen from the seeds of *Croton spiciflorus*. *Phytochem.* 15, 1070 (1976).
7. Schroeder, G.: Contribution a l'etude d'une drogue Chinoise: *Euphorbia fischeriana* Steud. proprietes cytotoxiques de diterpenes d'Euphorbiaceae de type lathyrane (La These de Doctorat). Universite Louis Pasteur, Strasbourg, 1979.
8. Evans, F.J. A new phorbol ester from the latices of *Euphorbia franciana* and *E.coerulescens*. *Phytochem.* 16, 395 (1977).
9. Gschwendt, A.D. and E.Hecker: Tumour promoting compounds from *Euphorbia triangularis*. Mono and di-esters of 12-deoxyphorbol. *Tetrahedron Lett.* 3509 (1969)

10. Cashmore, A.R., R.N. Seelye, B.F. Cain, H.Mack, R.Schmidt and E. Hecker: The structure of prostratin A toxic tetracyclic diterpene ester of *Pimelea prostrata*. *Tetrahedron Lett.* 1737 (1976)
11. Evans, F.J. and A.D. Kinghorn: New diesters of 12-deoxyphorbol. *Phytochem.* 14, 1669 (1975).
12. Evans, F.J. and R.J. Schmidt: Two new toxins from the latex of *Euphorbia poisonii*. *Phytochem.* 15, 333 (1976)
13. Schmidt, R.J. and F.J. Evans: A new aromatic ester diterpene from *Euphorbia poisonii*. *Phytochem.* 15, 1778 (1976)
14. Schmidt, R.J. and F.J. Evans: The succulent *Euphorbias* of Nigeria. Part II. The aliphatic esters of the latices of *Euphorbia poisonii* and *E.unispina*. *Lloydia*, 40, 225 (1977)
15. Gschwendt, M. and E.Hecker: Tumour-promoting compounds from *Euphorbia cooperi*. Di- and tri-esters of 16-OH-12-deoxyphorbol. *Tetrahedron Lett.* 567 (1970)
16. Hergenbahn, M., W.Adolf and E. Hecker: Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *E.unispina*. *Tetrahedron Lett.* 1595 (1975)
17. Stuart, K.L. and M.Barrett: A phorbol derivative from *Croton rhamnifolius*. *Tetrahedron Lett.* 2399 (1969)
18. Goto, T., Y.Kishi, S.Takahashi and Y.Hirata: Tetrodotoxin. *Tetrahedron*, 21, 2059 (1965)
19. Nyborg, J. and T.La Cour: X-ray diffraction study of the molecular structure and conformation of mezerein. *Nature*, 257, 824 (1975).
20. Kupchan, S.M., J.G. Sweeny, R.L. Baxter, T.Muray, V.A. Zimmerly and B.R. Sickles: Potent antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia lamprantha*. *J.Am. Chem. Soc.* 97, 672 (1975)
21. Kupchan, S.M., Y.Shizuri, T.Muray, J.G. Sweeny, H.R. Haynes, M.S. Shan, J.C. Barrick, F.R. Bryan, D. Van der Helm and K.K.Wu: Gnidimaerin, gnidimaerin-20-palmitate. Novel macrocyclic antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia subcordata*. *J.Am. Chem. Soc.* 98, 5719 (1976)
22. Kupchan, S.M., Y.Shizuri, W.C. Sumner, H.R. Haynes, A.P.Leighton and B.R. Sickles: Isolation and structural elucidation of new potent anti-leukemic diterpenoid esters from *Gnidia* species. *J.Org. Chem.* 41, 3850 (1976)
23. Schmidt, R.J. and F.J. Evans: The structure and potency of the tinytoxins. *J.Pharm. Pharmacol.* 27, 50 P (1975)
24. Evans, F.J. and A.D. Kinghorn: The isolation of ingenol from *Euphorbia desmondi*. *Phytochem.* 13, 1011 (1974)
25. Evans, F.J. and A.D. Kinghorn: A screening method for co-carcinogens. *J.Pharm. Pharmacol.* 25, 145 P (1973)
26. Uemura, D., H.Ohwaki and Y.Hirata: New diterpene derivatives and ingenol derivative obtained from *Euphorbia kansui*. *Tetrahedron Lett.* 2527 (1974)
27. Uemura, D. and Y.Hirata: The isolation and structures of two new alkaloids, milliamines A and B, obtained from *Euphorbia millii*. *Tetrahedron Lett.* 3673 (1971)
28. Uemura, D. and Y.Hirata: Isolation and structures of irritant substances obtained from *Euphorbia* species (*Euphorbiaceae*). *Tetrahedron Lett.* 881, (1973)
29. Kinghorn, A.D. and F.J. Evans: Occurrence of ingenol in *Elaeophorbia* species. *Planta Med.* 26, 150 (1974)
30. Evans, F.J. and A.D. Kinghorn: A new ingenol diterpene from the irritant fractions of *Euphorbia myrsinites* and *E. biglandulosa*. *Phytochem.* 13, 2324 (1974)
31. Opferkuch, H.J. and E.Hecker: New diterpenoid irritants from *Euphorbia ingens*. *Tetrahedron Lett.* 261 (1974)
32. Upadhyay, R.R. and E.Hecker: Diterpene esters of the irritant and co-carcinogenic latex of *Euphorbia lactea*. *Phytochem.* 14, 2514 (1975)
33. Uemura, D. and Y.Hirata: New diterpene. 13-oxy-ingenol isolated from *Euphorbia kansui*. *Tetrahedron Lett.* 2529 (1974)

34. Zayed, S., B.Sorg and E.Hecker: Structure activity relations of polyfunctional diterpenes of the tiglane type, VI. *Planta Med.* 1, 65 (1984)
35. Urones, J.G., P.B.Barcala, J.S. Cuadrado and I.S.Marcos: Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri*. *Phytochem.* 27 (1) 207 (1988)
36. Uzabakiliho, B., C.Largeau and E. Casadevall: Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E.tirucalli* and *Synadenium grantii*. *Phytochem.* 26 (11) 3041 (1987)
37. Evans, F.J. and A.D. Kinghorn: Thin-layer chromatographic behaviour of the acetates of some polyfunctional diterpene alcohols of toxicological interest. *J.Chromatog.* 87, 443 (1973)
38. Kinghorn, A.D. and F.J. Evans: A quantitative GLC method for phorbol and related diterpenes as their acetates. *J.Pharm. Pharmacol.* 26, 408 (1974)
39. Gundlu, H.R., A.A. Rao, A.Jachimonicz and J.G. White: Rapid separation of tumour-promoting agents, phorbol and phorbol myristate acetate by high pressure liquid chromatography. *J.Chromatog.* 96, 151 (1974)