

on the cut surfaces by a spore suspension ($ca\ 1 \times 10^7/\text{ml}$) of *C. fimbriata* Ell. and Halst. and incubated at 29° for 3 days. The infected pieces of the slices were taken and homogenized with $ca\ 2$ parts of CHCl_3 -MeOH (1:1) and the homogenate was filtered. The residue was extracted twice with the same solvents. H_2O was added to the combined CHCl_3 -MeOH soln to adjust the final proportion of CHCl_3 -MeOH- H_2O to 1:1:1. The CHCl_3 layer was evaporated *in vacuo* yielding 46.5 g of an oily substance, which was chromatographed stepwise on a Si gel (350 g) column using 2 l. of *n*-hexane-EtOAc (4:1) and 1 l. of *n*-hexane-EtOAc (1:1). The fraction containing compound 4 (1.1 g) was eluted by the latter solvent just after compound 3. 4 was isolated by Kiesel gel HF_{254} TLC using *n*-hexane-EtOAc (1:1). Further purification was performed by repeating the TLC in an open system using C_6H_6 -EtOAc (23:2). The purity was monitored by HPLC.

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ), 243 (4.13); IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ (cm^{-1}): 3490 (br), 2930 (s), 1677 (br), 1560 (br), 1155 (s) and 872 (s); PMR: δ_{ppm} (CDCl_3): 8.07 (1H, q, C-4), 7.43 (1H, q, C-1), 6.78 (1H, q, C-2), 6.05 (1H, m, C-12), 4.45 (1H, br s, OH), 2.93 (2H, m, C-6), 2.61 (3H, s, C-10), 2.17 (3H, d, $J = 1$ Hz, C-15), 1.91 (3H, d, $J = 1.2$

Hz, C-14), 1.85 (2H, m, C-7) and 1.24 (3H, s, C-9). MS: m/e 264.1360 (M^+ , $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ requires 264.1361).

Acknowledgements—We thank Dr. B. J. Wilson for providing the authentic sample of 4-hydroxymyoporone, and express thanks to the members of the Laboratory of Pesticide Chemistry for assistance with PMR, MS and IR measurements and for providing HPLC facilities.

REFERENCES

1. Hiura, M. (1943) *Rep. Gifu. Agr. Coll.* **50**, 1.
2. Kubota, S. and Matsuura, T. (1952) *J. Chem. Soc. Japan* **74**, 101, 197, 248, 668.
3. Oguni, I. and Uritani, I. (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2443.
4. Kato, N., Imaseki, H., Nakashima, N. and Uritani, I. (1971) *Tetrahedron Letters* **13**, 843.
5. Yang, D. T. C., Wilson, B. J. and Harris, T. M. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1653.
6. Burka, L. T., Kuhnert, L. and Wilson, B. J. (1974) *Tetrahedron Letters* **46**, 4017.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1065–1068. Pergamon Press. Printed in England.

NEUE GERMACROLIDE AUS *CALEA ZACATECHICHI**

FERDINAND BOHLMANN und CHRISTA ZDERO

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin D-1000 Berlin 12, Strasse des 17. Juni 135, Germany

(Received 16 December 1976)

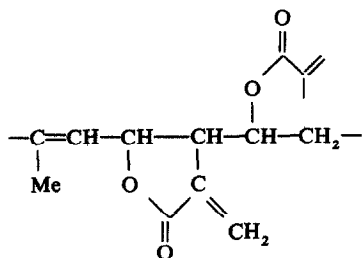
Key Word Index—*Calea zacatechichi*; Compositae; Heliantheae germacrolides.

Abstract—The aerial parts of *Calea zacatechichi* contain in addition to known acetylenes two new germacrolides, their structures being elucidated by spectroscopic methods. *Calea scabra* contains known acetylenes similar to those of other species and of related genera.

Aus der Gattung *Calea* (Subtribus Galinsoginae, Tribus Heliantheae) sind bereits einige Arten untersucht worden [1, 2]. Bisher wurden hier wie in den Nachbargattungen [2] Dehydrofalcarinon (11) und verwandte Verbindungen isoliert. Die in Guatemala heimische *C. zacatechichi* enthält jedoch neben Germacren D (7) und Acetylenverbindungen (8–10) auch zwei Sesquiterpenlactone mit

den Summenformeln $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_8$ und $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_7$. Wie aus dem ^1H NMR-Spektrum zu entnehmen ist (s. Tabelle 1.), handelt es sich in beiden Fällen um Methylenlactone, die noch eine weitere Doppelbindung, eine OH-Gruppe und einen Methylacryloyloxy-Rest enthalten. Bei der etwas unpolaren Substanz ist zusätzlich eine O-Acetat-Gruppe vorhanden. Die Sauerstoffbilanz ergibt, daß noch eine weitere O-Funktion vorhanden sein muß. Das bei 270 MHz voll interpretierbare ^1H NMR-Spektrum der unpolaren Verbindung läßt nach systematischen Entkopplungsexperimenten eindeutig erkennen, daß die Gruppierung A vorliegen muß (s. Tabelle 1.).

* 101. Mitt. in der Serie "Natürlich vorkommende Terpen-Derivate", 100. Mitt. Bohlmann, F., Knoll, K.-H., Zdero, C., Mahanta, P. K., Grenz, M., Suwita, A., Ehlers, D., Le Van, N., Abraham, W.-R. und Natsu, A. A. (1977) *Phytochemistry* **16**, 965.



Die Stellung der Methylacryloyloxy-Gruppe folgt aus dem Ergebnis der partiellen Methanolyse zum Monoester. Um zu prüfen, ob es sich bei der letzten O-Funktion um eine Ketogruppe handelt, haben wir den Naturstoff mit Boranat reduziert. Dabei wird jedoch nur das Methylenlacton angegriffen. Als weitere Möglichkeit kam das Vorliegen eines Halbketals in Betracht. Die Annahme läßt sich durch Überführung in ein Ketal durch Umsetzung mit Methanol und *p*-Toluolsulfonsäure bestätigen. Alle Daten sind somit am besten vereinbar mit dem Vorliegen eines Germacrolids der Konstitution (1). Die Stereochemie an den C-Atomen 5–7 ist am besten vereinbar mit der angegebenen, sie entspricht der des Goyazensolid, bei dem ganz ähnliche Kopplungen beobachtet werden [3]. Die $\delta\beta$ -Stellung des Esterrestes ergibt sich sowohl aus der Lage des Signals für 13-H (δ 5.62) als auch aus dem Fehlen einer geminalen Kopplung, die bei $\delta\alpha$ -konfigurierten Estern beobachtet wird [4]. Dafür spricht auch das Ergebnis der Boranat-Reduktion, bei der, wie das ^1H NMR-Spektrum zeigt, der Angriff nur von unten erfolgt. Die Konfiguration an C-1 und C-10 wird durch die beobachteten Verschiebungen bei Zusatz von $\text{Eu}(\text{fod})_3$ gestützt; die geringe Verschiebung von 14-H ist nur verständlich, wenn die

Methylgruppen und die O-Acetatgruppen trans-ständig angeordnet sind. Gestützt wird diese Annahme weiterhin durch das Vorliegen einer W-Kopplung zwischen 14- und 9 β -H. Demnach dürfte bei der unpolareren Verbindung die Konfiguration (1) vorliegen. Wir möchten 1 1 β -Acetocy-zacatechinolid nennen, es ist strukturell nahe verwandt mit Woodhousin (6).

Bei der polaren Verbindung handelt es sich offenbar um das Keton 4, das mit Methanol säurekatalysiert ebenfalls ein Ketal liefert, dem die Konstitution 5 zukommen dürfte.

Germacrolide sind bisher nicht aus Vertretern der Subtribus Galinsoginae isoliert worden, sie kommen jedoch in vielen Gattungen der Tribus Heliantheae sowie auch in Gattungen aus anderen Tribus [4] vor, so daß ihre chemotaxonomische Bedeutung wahrscheinlich nicht sehr gross ist. Die Verbindungen 8–15 sind hingegen auch charakteristisch für die Gattungen *Galinsoga* und *Tridax*, die zu der gleichen Subtribus gehören. 11 kommt jedoch auch bei *Helianthus* vor [2], einer Gattung, die ebenfalls Germacrolide enthält [5]. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Differenzierung der Tribus Heliantheae aufgrund der Inhaltsstoffe möglich ist.

EXPERIMENTELLES

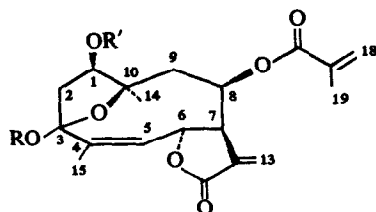
IR. Beckman IR 9, CHCl_3 , ^1H NMR. Bruker WH 270, δ -Werte, TMS als innerer Standard. MS. Varian MAT 711, 70 eV, Direkteinlaß, optische Rotation Perkin Ellmer-Polarimeter, CHCl_3 . Die luftgetrockneten Pflanzenteile extrahierte man nach Zerkleinern mit Et_2O -petrol 1:2 und trennte die erhaltenen Extrakte zunächst grob durch SC (Si gel, Akt.-St. II) und weiter durch DC (Si gel, GF 254). Also Laufmittel dienten Et_2O -petrol (=E-P)-Gemische. Bereits bekannte Substanzen identifizierte man durch Vergleich der IR-, UV- und NMR-Spektren.

Calea zacatechichi Schlecht. (Herkunft Dr. R. King, in

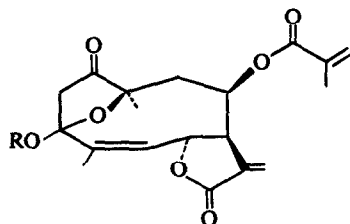
Tabelle 1. ^1H NMR-Signale von 1–6 (270 MHz, δ -Werte, TMS als innerer Standard)

	1 (C_6D_6)	CDCl_3	Δ^*	2 (CDCl_3)	3 (CDCl_3)	4 (CDCl_3)	5 (CDCl_3)	6 (CDCl_3)
1 α -H	dd 5.34	dd 5.40	1.56	d(br) 4.33	d 5.37	—	—	dd 5.40
2 α -H	dd 1.95	dd 2.48	0.39	dd 2.31	dd 2.36	d 3.11	d 2.95	dd 2.47
2 β -H	dd 1.57	dd 2.20	0.82	d 2.09	d 2.03	d 2.77	d 2.66	dd 2.25
5-H	dq 5.60	dq 5.75	0.82	dq 5.94	dq 5.87	dq 5.69	dq 5.78	dq 5.78
6 β -H	ddq 5.67	ddq 5.62	1.51	ddq 5.64	ddq 5.60	ddq 5.13	ddq 5.20	ddq 5.65
7 α -H	dddd 3.92	dddd 4.07	1.13	dddd 4.17	dddd 4.14	ddd(br) 3.65	ddd 3.85	d(br) 3.57
8 α -H	ddd 5.62	ddd 5.58	2.01	ddd 5.57	ddd 5.63	dd(br) 5.30	ddd 5.37	ddd 5.28
9 α -H	dd 1.79	dd 2.07	0.98	dd 1.98	dd 2.07	dd 2.30	dd 2.28	dd 2.22
9 β -H	dd(br) 2.32	dd(br) 2.48	1.05	dd(br) 2.69	dd(br) 2.47	dd(br) 2.38	dd(br) 2.35	dd(br) 2.34
11-H	—	—	—	—	—	—	—	dq 2.83
13-H	d 6.27	d 6.28	1.75	d 6.25	d 6.27	d 6.35	d 6.34	—
13'-H	d 5.18	d 5.62	1.05	d 5.58	d 5.63	d 5.78	d 5.73	d 1.12
14-H	s(br) 1.09	s(br) 1.53	0.07	s(br) 1.50	s(br) 1.51	s(br) 1.52	s(br) 1.52	s(br) 1.47
15-H	dd 1.66	dd 1.79	0.64	dd 1.86	dd 1.70	—	dd 1.93	dd 1.79
18-H	dq 6.13	dq 5.97	1.29	dq 5.94	dq 5.97	dq 6.03	dq 6.01	dq 6.05
18'-H	dq 5.17	dq 5.54	0.48	dq 5.50	dq 5.54	dq 5.61	dq 5.61	dq 5.61
19-H	dd 1.80	dd 1.85	0.80	dd 1.82	dd 1.85	dd 1.88	dd 1.88	dd 1.91
OAc	s 1.63	s 2.17	0.93	—	s 2.11	—	—	s 2.10
OMe	—	—	—	—	s 3.15	—	s 3.32	—
OH	s 1.96	s 2.51	1.08	s(br) 1.62	—	s 3.03	—	s 1.61

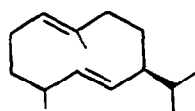
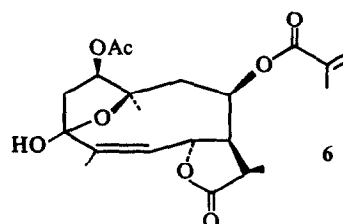
* Δ -Werte nach Zusatz von ca 0.2 Äquivalent $\text{Eu}(\text{fod})_3$ bezogen auf 1. J(Hz). 1 α , 2 α = 6; 1 α , 2 β = 1; 2 α , 2 β = 14; 5, 6 = 3.5; 5, 15 = 1.5; 6, 7 = 3.5; 6, 15 = 1.5; 7, 8 = 5; 7, 13 = 2.5; 7, 13' = 2.5; 8, 9 α = 10; 8, 9 β = 5; 9 α , 9 β = 14; 18, 18' = 1; 18, 19 = 1; 18', 19 = 2. Abweichende Werte bei 2: 1 α , 2 α = 5; bei 4: 2 α , 2 β = 19; 5, 6 = 6; 6, 7 = 2.5; 7, 8 < 1; 8, 9 α = 3; 8, 9 β = 3; bei 6: 2 α , 3 β = 2.5; 5, 6 = 5; 6, 7 = 2; 7, 8 = 2; 7, 11 = 10.



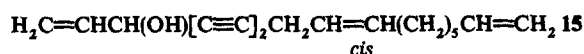
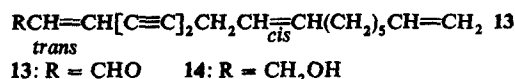
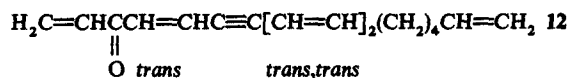
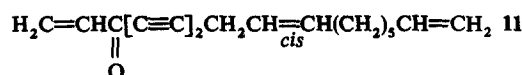
- 1: R = H, R' = Ac
 2: R = R' = H
 3: R = Me, R' = Ac



- 4: R = H
 5: R = Me



- RCH=CH[C≡C]₂[CH=CH]₂(CH₂)₄CH=CH₂
trans *trans,trans*
 8: R = Me, 9: R = CH₂OH 10: R = CH₂OAc



Guatemala gesammelt, Herbar-Nr. 7099); 230 g oberirdische Teile ergaben 100 mg 7, 1 mg 8, 4 mg 9, 7 mg 10, 50 mg 1 (E-P 1:1) und 30 mg 4 (E-P 1:1).

1α-Acetoxy-zacatechinolid (1). Farblose Kristalle aus Et₂O, Schmp. 199°. IR. OH 3600; Butenolid 1760, 1665; OAc 1760; C=CCO₂R 1720, 1640 cm⁻¹. MS. M⁺ m/e 406.163 (2%) (ber. für C₂₁H₂₆O₈ 406.163); -H₂O 388 (1); -H₂C=C=O 364(1); -AcOH 346(2); -C₃H₅CO₂H 320(5); 320 -H₂C=C=O 278 (22); 278 -H₂O 260(37); 260 -CO 232 (20); C₃H₅CO⁺ 69 (100); MeCO⁺ 43 (65).

$$[\alpha]_{24}^{25} = \frac{589}{-222} \frac{578}{-226} \frac{546}{-255} \frac{436}{-448} \frac{365 \text{ nm}}{-733^\circ} (c = 1.35)$$

20 mg 1 in 1 ml MeOH versetzte man bei RT mit 0.5 ml 0.2N NaOMe-Lösung. Nach 15 min wurde mit verdünnter H₂SO₄ neutralisiert und das Reaktionsgemisch in Et₂O aufgenommen. Den Eindampfdruckstand trennte man durch DC (E-P 2:1). Man erhielt 4 mg 2, farbloses zähes Öl. IR. OH 3600; Butenolid 1760, 1665; C=CCO₂R 1720, 1640 cm⁻¹. MS. M⁺ m/e -; -H₂O 346(0.5%); 346 -C₃H₅CO₂H 260 (10); C₃H₅CO⁺ 69(100). 10 mg 1 in 3 ml MeOH erwärmte man 15 min mit 50 mg *p*-Toluolsulfonsäure zum Sieden. Nach DC (E-P 1:1) erhielt man 5 mg 3, farbloses Öl. IR. Butenolid 1774, 1663; OAc 1760; C=CCO₂R 1720, 1635 cm⁻¹. MS. M⁺ m/e 420.178 (1%) (ber.

für C₂₂H₂₈O₈ 420.178); -OMe 389 (0.5); -H₂C=C=O 378 (0.5); -C₃H₅CO₂H 334(2); 378 -CO 350(3); 378 -C₃H₅CO₂H 292(14); C₃H₅CO⁺ 69 (100). 5 mg 1 in 1 ml MeOH reduzierte man mit 15 mg NaBH₄. Nach DC(E-P 1:1) erhielt man 2 mg 6, farbloses Öl. IR. OH 3600; Lacton 1780; OAc 1760; C=CCO₂R 1720, 1640 cm⁻¹.

1-Oxo-zacatechinolid (4). Farblose Kristalle aus Et₂O, Schmp. 167°. IR. OH 3580; Butenolid 1763, 1665; >C=O 1740; C=CCO₂R 1720, 1640 cm⁻¹. MS. M⁺ m/e 362.1365 (1%) (ber. für C₁₉H₂₂O₇ 362.1365); -H₂O 344 (2); -C₃H₅CO₂H 276(7); 278 -H₂O 258 (8); C₃H₅CO⁺ 69 (100).

$$[\alpha]_{24}^{25} = \frac{589}{-263} \frac{578}{-275} \frac{546}{-318} \frac{436}{-620} \frac{365 \text{ nm}}{-132.5^\circ} (c = 1.68)$$

5 mg 4 in 2 ml MeOH erwärmte man 15 min mit 20 mg *p*-Toluolsulfonsäure zum Sieden. Nach DC (E-P 1:1) erhielt man 2 mg 5, farbloses Öl. IR. Butenolid 1775, 1665; >C=O 1740; C=CCO₂R 1720, 1640 cm⁻¹. MS. M⁺ m/e 376.152 (0.5%) (ber. für C₂₀H₂₄O₇ 376.152); -CO 348 (1); 348 -C₃H₅CO₂H 262(3); 262 -MeOH 230(3); C₃H₅CO⁺ 69 (100).

Calea scabra (Lag.) B. L. Robinson. (Herkunft Dr. R. King, in Guatemala gesammelt, Herbar-Nr. 7113). 300 g Wurzeln ergaben 50 mg 9, 10 mg 10 und 20 mg 11, 230 g oberirdische Teile 20 mg 9, 40 mg 13, 5 mg 10 und 5 mg 12.

Anerkennung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Dr. R. King, Smithsonian Institute, Washington, für die Beschaffung des Pflanzenmaterials.

LITERATUR

1. Bohlmann, F. und Zdero, C. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1177.
2. Bohlmann, F., Burkhardt, T. und Zdero, C. (1973) *Naturally Occurring Acetylenes*. Academic Press, London.
3. Vichnewski, W., Sarti, S. S., Gilbert, B. und Herz, W. (1976) *Phytochemistry* **15**, 191; Lopes, J. N. C., Dos Santos Filho, D. und Herz, W. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1775.
4. Yoshioka, H., Mabry, T. J. und Timmermann, B. (1973) *Sesquiterpene Lactones*. University of Tokyo Press, S. 73, dort weitere Literatur.
5. Ortega, A. und Romo de Vivar, A. (1970) *Rev. Latinoamer. Quim.* **1**, 81; Morimoto, H., Sanno, Y. und Oshio, H. (1966) *Tetrahedron* **22**, 3173.
6. Herz, W. und Bhat, S. V. (1972) *J. Org. Chem.* **37**, 906.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1068–1070. Pergamon Press. Printed in England.

STRUCTURE AND STEREOCHEMISTRY OF EUPAFORMOSANIN, A NEW ANTILEUKEMIC AND ANTISARCOMA GERMACRANOLIDE FROM *EUPATORIUM FORMOSANUM**

KUO-HSIUNG LEE,†† TAKEATSU KIMURA,‡ MITSUMASA HARUNA,‡ ANDREW T. MCPHAIL,†§ KAY D. ONAN§ and HUAN-CHANG HUANG||

†Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27514; §Paul M. Gross Chemical Laboratory, Duke University, Durham, North Carolina 27706; ||School of Pharmacy, Kaohsiung Medical College, Kaohsiung, Taiwan, Republic of China

(Received 2 December 1976)

Key Word Index—*Eupatorium formosanum*; Compositae; eupaformosanin; antitumor sesquiterpene lactone; stereochemistry.

We reported recently [1,2] on the isolation and structure determination of two new cytotoxic agents, eupatolide (1) and eupafomonin (2), from *Eupatorium formosanum* Hay gathered in early spring 1973 in Wootai, Pingtung, Taiwan. Further investigations on those ethanolic fractions of this same plant which showed *in vivo* activity against Walker 256 carcinosarcoma as well as P-388 lymphocytic leukemia [3] have now led to the isolation and characterization of a new potent antileukemic antitumor principle, eupaformosanin (3).

Eupaformosanin [(3), colourless needles, mp 91° (from MeOH–H₂O 1:3 or benzene), *m/e* 420.1781(M⁺), [α]_D²¹ – 99.50° (*c* = 2.193, CHCl₃)] has molecular formula C₂₂H₂₈O₈. The presence of an α -methylene- γ -lactone moiety was indicated by the appearance of IR bands (CHCl₃) at 1755 and 1658 cm.^{–1}, and was substantiated by the presence in the ¹H- and ¹³C-NMR spectra of a characteristic pair of low field doublets at δ 5.81 (1H, *J* = 2.0 Hz, H_a-13) and 6.38 (1H, *J* = 2.0 Hz,

H_b-13), in addition to a triplet at δ 125.2 (C-13). The identity of the H-7 signal as a broad singlet at δ 3.01 was established by spin decoupling at the frequencies of H_a and H_b. Irradiation at the frequency of H-7 collapsed H_a and H_b into singlets and also sharpened the broad singlet at δ 5.30 (3H, H-6, H-5, and H-1) as well as the multiplet at δ 5.21 (1H, H-8). Further irradiation at the frequency of H-8 (δ 5.21) sharpened the broad singlet at δ 3.01 (H-7) and collapsed two well-separated doublets of doublets at δ 2.39 (1H, *J* = 3, 14 Hz, partially overlapped) and 2.73 (1H, *J* = 3, 14 Hz, partially overlapped) into two doublets (*J* = 14 Hz), thereby demonstrating that H-8 was adjacent to two protons at C-9 which in turn was adjacent to a fully substituted C-10. The foregoing observations were further confirmed by ¹H noise-decoupled ¹³C FT NMR of (3) which showed C-6, C-7, C-8, and C-9 at 74.6 (*d*), 48.8 (*d*), 70.8 (*d*), and 43.3 (*t*), respectively. Irradiation of the broad singlet at δ 5.30 (3H, H-6, H-5, and H-1) not only caused a sharpening of the one-proton singlet at δ 3.01 (H-7), but also resulted in a sharpening of two three-proton broad singlets at δ 1.79 and 1.90, which could thus be assigned as two vinyl methyls at C-4 and C-10 [7], respectively.

* Antitumor Agents. 26. † Address correspondence to any of these authors.