

*DE OMZETTING
VAN β -SITOSTEROL IN CHOLESTEROL
BIJ DE KAKKERLAK*

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van Doctor in de Wiskunde en
Natuurwetenschappen aan de Rijksuniversiteit te Leiden,
op gezag van de Rector Magnificus Dr. W. R. O. Goslings,
Hoogleraar in de Faculteit der Geneeskunde, volgens be-
sluit van het College van Dekanen te verdedigen op donder-
dag 25 mei 1972 te klokke 16.15 uur

door

WILHELMUS HENRICUS JOANNES MARIA WIENTJENS

geboren te Den Haag in 1937

PROMOTOR : PROF. Dr. E. HAVINGA

STELLINGEN

I

Uit de door Pichat et al. beschreven experimenten blijkt niet, dat O-bis-trimethylsilyl-5-lithiumuracil niet reageert met CO_2 .

L. Pichat, J. Deschamps, B. Massé, P. Dufay,
Bull. Soc. Chim. France no. 6, 2110 (1971).

II

Bluhm, Weinstein en Sousa tonen niet aan, dat in rook van sigaren of pijptabak meer vrije radicalen voorkomen dan in rook van sigaretten.

A.L. Bluhm, J. Weinstein, J.A. Sousa,
Nature 229, 500 (1971).

III

Een aantal van 250 stations voor een meetnet van de luchtvervuiling in Nederland is voor het gestelde doel onnodig veel.

F.W. van Dijk, O.D. Prins, I. Strausz,
Chem. Weekblad nr. 45, 16 (1971).

IV

De isolatie van gedeeltelijk in de kern gemerkt β -sitosterol- ^{14}C uit de plant *Salvia officinalis* na toediening van L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ zou verklaard kunnen worden door een merking via de acetaatpool.

H.J. Nicholas, S. Moriarty, Fed. Proc. 22, 529 (1963)

E. Caspi, J.G. Ll. Jones, P. Heidel, G.H. Friedell,
A.J. Tiltman, S. Yalciner, Chem. Commun. 1201 (1971).

V

Een routinematige, radioimmunologische bepaling van trijoodthyronine in bloed zou voor het klinisch schildklieronderzoek een belangrijke verbetering betekenen.

VI

Het is onjuist te stellen, dat de Nederlandse oppervlaktewateren toereikend zijn voor een koelwaterbehoefte van elektriciteitscentrales met een opgesteld vermogen van 125.000 MW, zolang de consequenties van een maximale temperatuur van 30°C van het koelwater bij de uitlaat niet bekend zijn.

K.J. Keller, Toekomstbeeld der techniek nr. 7, 17 (1971).

VII

In die gevallen waar adipocirevorming bij begraven lijken mogelijk is, verdient crematie aanbeveling.

Verslagen en mededelingen betreffende de volksgezondheid
nr. 1, 299 (1963).

VIII

Bij de analyse van fosfolipiden met behulp van dunnelaagchromatografie verwaarlozen Turner en Rouser ten onrechte enkele vergelijkingsgegevens.

J.D. Turner, G. Rouser, Anal. Biochem. 38, 423 (1970).

IX

De daling van de slagsterkte in een reeks copolymeren van methylmethacrylaat en cyclohexylmethacrylaat bij een stijgend gehalte aan cyclohexylester kan slechts ten dele verklaard worden door een kleiner worden van het aantal hoofdketenbindingen per oppervlakte-eenheid.

P.I. Vincent, Nature Phys. Sci. 233, 104 (1971)

J. Heijboer, Plastica 9, 288 (1951).

X

Bij de toenemende concentratie van verschillende vormen van voortgezet onderwijs in scholengemeenschappen verdient het aanbeveling ook leerlingen met verschillende geloofsovertuigingen en levensbeschouwingen in samenwerkingsscholen onderwijs te geven.

XI

Een van de algemeen vormende waarden van schaken ligt in het voortdurend beoordelen van steeds nieuwe situaties, zonder hierbij in de eerste plaats aandacht te schenken aan het "historisch gegroeide" van deze situaties.

Schaakles op school, rapport Commissie Mammoet KNSB, 1969.

W.H.J.M. Wientjens

25 mei 1972

Aan mijn ouders

Aan Maria,

Sandra en Richard

Inhoud

	Pagina
Inleiding	7
I Biosynthese van β -sitosterol-28,29- ^{14}C met behulp van kiemende erwten	11
II Synthesis of β -sitosterol-3- ^{14}C	16
III Separation of sterols by vapor-programmed thin-layer chromatography	29
IV De omzetting van β -sitosterol in cholesterol bij drie soorten kakkerlakken	35
V The influence of several sterols on the conversion of β -sitosterol into cholesterol in the cockroach	47
Samenvatting	54
Summary	56

Inleiding

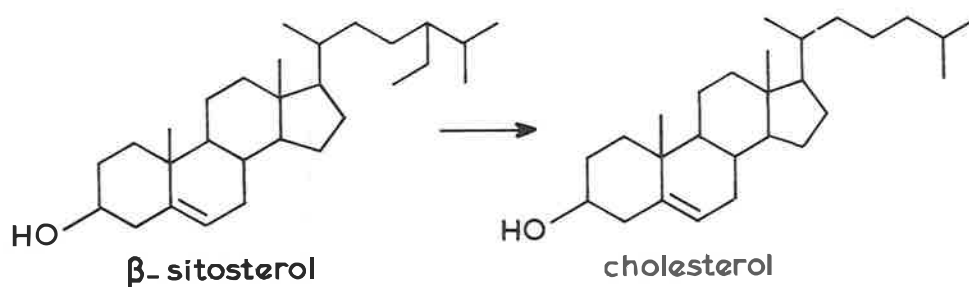
De jaren zestig hebben een toenemende belangstelling te zien gegeven naar bestrijdingswijzen van insekten, waarbij de gevaren voor mensen, dieren en planten zoveel mogelijk geëlimineerd worden.

Een gebied dat mogelijkheden voor selectieve bestrijdingsmiddelen kan bieden is dat van de insektenhormonen. Dit gebied omvat niet alleen de insektenhormonen zelf of synthetische analoga daarvan, maar ook stoffen die de werking van de hormonen tenietdoen. Wat betreft dit laatste is het sterolmetabolisme van insekten interessant ^{1,2}, vooral ook omdat het vervellingshormoon ecdyson een steroid is. Insekten zijn echter niet in staat om zelf sterolen te synthetiseren uit acetaat of mevalonaat. Sterolen zijn daardoor onmisbare componenten in het voedsel van insekten.

In verband met deze sterolbehoefte kunnen de insekten in twee groepen worden ingedeeld: de vlees etende insekten en de planten etende insekten. De vlees etende insekten verkrijgen het C27-sterol cholesterol in hun voedsel en zetten dit om in ecdyson. De planten etende insekten verkrijgen het C29-sterol β -sitosterol in hun voedsel en moeten dit sterol eerst omzetten in cholesterol alvorens de omzetting in ecdyson kan plaatsvinden.

Voor de insekten die uitsluitend planten eten en geen cholesterol in hun voedsel vinden, is de dealkylering van β -sitosterol van vitaal belang. Remming van deze reactie, welke resulteert in een gebrek aan cholesterol en ecdyson, zal de ontwikkeling van

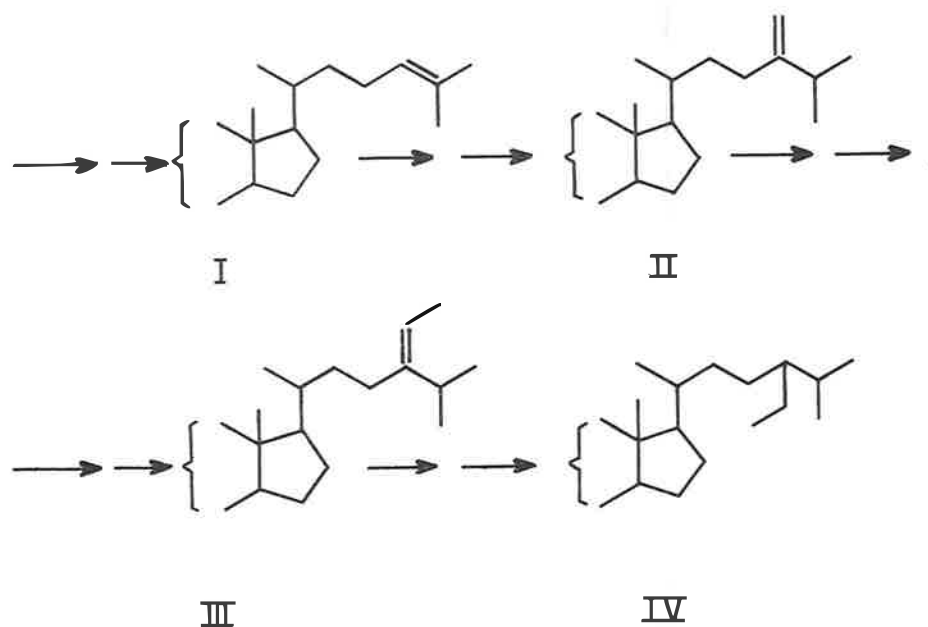
het insect verstoren. Aangezien de omzetting van β -sitosterol in cholesterol alleen bekend is bij planten etende insecten en niet bij andere dieren, planten of mensen, is de selectiviteit van een eventueel bestrijdingsmiddel tegen strikt planten etende insecten, welke gebaseerd is op een verhindering van de dealkylering van β -sitosterol in cholesterol, gewaarborgd.



De verwijdering van koolstofatoom 28 en 29 bij de omzetting van sitosterol in cholesterol kan in principe geschieden door

- a) oxydatie en verwijdering als b.v. CO_2 ,
- b) directe verwijdering als alkylgroep.

In het laatste geval zou de dealkylering van sitosterol in insecten langs de omgekeerde weg van de alkylering bij de biosynthese van sitosterol in planten kunnen verlopen. Bij deze biosynthese van sitosterol (IV) spelen desmosterol (I), 24-methyleencholesterol (II) en $\Delta^{24(28)}$ -sitosterol (III) een rol als intermediairen.



Een overzicht van C-alkyleringsreacties en de biosynthese van plantensterolen wordt gegeven door Heftmann³ en Lederer⁴.

De volgende procedure werd beoogd bij de hier beschreven onderzoeken.

1. β -Sitosterol radioactief merken op de C28- en C29-plaats. Dit radioactieve sterol toedienen aan planten etende insecten en nagaan waar de radioactiviteit blijft.
2. β -Sitosterol radioactief merken in de kern. Dit sterol toedienen aan insecten en nagaan welke radioactieve omzettingsproducten van sitosterol worden gevormd.
3. De remmende invloed op de omzetting van β -sitosterol in cholesterol nagaan van steroiden met een onnatuurlijke zijstaart.

In deel I (pp 11-15) wordt de biosynthese van in de zijstaart gemerkt β -sitosterol met behulp van kiemende erwten beschreven.

Deel II (pp 16-28) beschrijft de synthese van β -sitosterol-3- ^{14}C uit stigmasterol.

In deel III (pp 29-34) wordt nader ingegaan op een van de toegepaste analyse-methoden van β -sitosterol-3- ^{14}C , te weten dampgeprogrammeerde dunnelaagchromatografie.

In deel IV (pp 35-46) worden de experimenten beschreven, waarbij β -sitosterol-3- ^{14}C aan drie verschillende soorten kakkerlakken werd toegediend.

De invloed als potentiële antimetaboliëten van steroiden met een onnatuurlijke zijstaart op de omzetting van β -sitosterol in cholesterol wordt beschreven in deel V (pp 47-53).

Tenslotte wordt een samenvatting gegeven.

Literatuurverwijzingen

1. F.J. Ritter and W.H.J.M. Wientjens
TNO-Nieuws 22, 381 (1967)
2. W.E. Robbins, J.N. Kaplanis, J.A. Svoboda and M.J. Thompson
Ann. Rev. Entomol. 16, 53 (1971)
3. E. Heftmann
Lloydia 31, 293 (1968)
4. E. Lederer
Quart. Rev. 23, 453 (1969)

Biosynthese van β -sitosterol-28, 29-¹⁴C met behulp van kiemende erwten

Inleiding

Teneinde te kunnen nagaan waar tijdens de dealkylering van β -sitosterol tot cholesterol door planten etende insecten de koolstofatomen 28 en 29 blijven, is het nodig te beschikken over β -sitosterol dat op deze plaatsen gemerkt is. Aldus gemerkt β -sitosterol kan verkregen worden uit plantenmateriaal. Planten bouwen hun sterolen namelijk op uit acetaat (C1 t/m C27) en methionine (C28 en C29) ¹⁻⁵. Na toevoeging van radioactief methionine aan diverse soorten plantenmaterialen kan β -sitosterol worden geïsoleerd, dat op de C28- en C29-plaats radioactief gemerkt is ⁶⁻⁹. Hoewel in sommige van deze onderzoeken het weinige radioactieve β -sitosterol slechts werd aangetoond en niet geïsoleerd, en in andere werd opgenomen in een carrier, werd door ons getracht na toevoeging van radioactief methionine aan kiemende erwten β -sitosterol-28,29-¹⁴C zonder verdunning te isoleren.

Materialen en methoden

Gebruikt werden erwten van de Blue Bantam Strain (Burpee Seed Company, Philadelphia). Ter voorkoming van groei van micro-organismen tijdens het kiemen werden de erwten behandeld met Thiram 50 (Ligtermoet Chemie NV, Rotterdam). Hiertoe werd 100 gram erwten gerold in een waterige suspensie van 0,2 gram Thiram 50. De

specifieke activiteit van het gebruikte D,L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ was 0,345 mCi/mM (Centraal Laboratorium TNO, Delft) en van L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ 24,6 mCi/mM (Studie Centrum voor de Kernenergie, Dienst der Radioisotopen, Mol, België). Voor de inactieve proeven en voor de verdunning van het radioactieve methionine werd L-methionine van Hoffmann - La Roche gebruikt. Voorts werd gebruik gemaakt van mevalonzuurlacton (Fluka), desmosterol (Chemed) en β -amyryne (K & K). De homogenisaties van de erwten werden uitgevoerd met een homogenisator van Salm & Kipp.

Het kiemen van de erwten geschiedde door 25 gram erwten te verdelen over twee petrischalen (diameter = 11 cm). Deze schalen werden in twee grotere petrischalen (diameter = 20 cm) geplaatst, waarbij de ruimten tussen de kleine en grote schalen werden opgevuld met vochtige watten. Het geheel werd afgesloten met horlogeglazen. Gedurende de eerste dag werd aan de erwten ongeveer 17 ml water per schaal toegevoegd en gedurende de volgende drie dagen ongeveer 10 ml water per schaal per dag. Het kiemen gebeurde in een geconditioneerde ruimte bij 26 °C.

De incubatie met methionine geschiedde op twee manieren: toevoeging van methionine aan intacte, kiemende erwten of aan homogenisaten van kiemende erwten. In het eerste geval werd aan kiemende erwten op de 5e dag een oplossing van methionine in water toegevoegd door op elke erwt 0,02 ml oplossing te leggen. Het kiemen werd na deze toevoeging nog 24 uur voortgezet, waarna de erwten met water werden afgespoeld, gehomogeniseerd en opgewerkt. In het tweede geval werden kiemende erwten op de 5e dag gehomogeniseerd in een oplossing van natriummevalonaat in 0,01 M fosfaatbuffer (pH = 7,4). Het homogenisaat werd met een oplossing van methionine in buffer bij 26 °C geïncubeerd.

Uitgaande van 25 gram erwten werd in beide gevallen aan het uiteindelijk verkregen gehomogeniseerde extract 40 ml alcohol en 4 ml van een 60%-ige oplossing van kaliumhydroxyde in water toegevoegd.

De oplossing werd onder stikstof gedurende 2 uur onder terugvloeiing gekookt. Na afkoelen werd 200 ml water toegevoegd en werd het geheel met 3 x 75 ml ether geëxtraheerd. De verzamelde etherlagen werden gewassen met water tot neutraal en drooggedampt bij 10^{-3} mm Hg.

Het residu werd onderworpen aan kolomchromatografie over Florisil (60-100 mesh, Goudekot). Geëluëerd werd met benzeen, mengsels van benzeen en ether in diverse verhoudingen en tenslotte ether. De kolomchromatografische fracties werden onderzocht door middel van dunnelaagchromatografie. Adsorbens silicagel H (Merck), loopvloeistof toluen - ethylacetaat (80 + 20), detectie 2 N H_2SO_4 . De sterolfraction werd onderworpen aan gaschromatografie volgens de methode van Clayton¹⁰. Gaschromatograaf Research Specialties RSCo 600, argonionisatiedetectie, stationaire fase 5% DEGS op Chromosorb WAW (60-80 mesh), kolomtemperatuur 193 °C, gassnelheid 80 ml/min.

De radioactiviteitsmetingen werden verricht met een Packard Tri-Carb vloeistofscintillatieteller, model 3375. De samenstelling van de scintillatievloeistof was: 5 gram 2,5-difenyloxazole (PPO), 0,5 gram 1,4-bis-(5-fenyl-2-oxazolyl)-benzeen (POPPOP) en 1000 ml benzeen.

Resultaten

Bij voorbereidende experimenten met niet-radioactief methionine bleek de sterolfraction te bestaan uit 94% β -sitosterol, 5% stigmasterol en 1% campesterol. De hoeveelheden sitosterol welke werden geïsoleerd uit zowel gekiemde als ongekiemde erwten waren in overeenstemming met de literatuur¹¹.

Vervolgens werd een aantal experimenten uitgevoerd met methionine-¹⁴CH₃. Aan 25 gram kiemende erwten werd op de 5e dag 2 ml van

een oplossing van 22 μCi D,L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ (9,5 mg) in water, 600 mg mevalonzuurlacton en 318 mg natriumcarbonaat toegevoegd. De opbrengst bedroeg 4,2 mg β -sitosterol-28,29- ^{14}C met een specifieke activiteit van slechts 30 nCi/mM.

Vervolgens werd geprobeerd of de incorporatie van ^{14}C groter zou zijn indien met erwtenhomogenisaten werd gewerkt in plaats van met intacte erwten. Daartoe werd 25 gram kiemende erwten op de 5e dag gehomogeniseerd in 15 ml van een oplossing van 250 mg mevalonzuurlacton, 130 mg natriumcarbonaat en 2 mg desmosterol, als mogelijke precursor, in fosfaatbuffer. Aan het homogenisaat werd een oplossing van 16,4 μCi L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ (0,1 mg) en 2,9 mg inactief L-methionine in 10 ml fosfaatbuffer toegevoegd. Het geheel werd gedurende 20 uur bij 26 $^{\circ}\text{C}$ geroerd. De opbrengst was 6,3 mg β -sitosterol met een specifieke radioactiviteit van 120 nCi/mM.

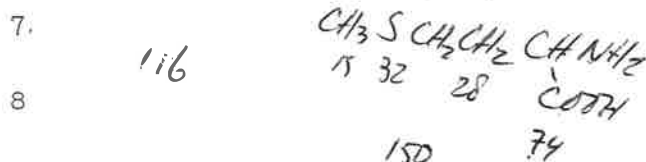
Ook werd 60 gram kiemende erwten op de 5e dag gehomogeniseerd in 60 ml van een oplossing van 1 gram mevalonzuurlacton en 530 mg natriumcarbonaat in fosfaatbuffer. Aan het homogenisaat werd 47,6 μCi L-methionine- $^{14}\text{CH}_3$ (0,29 mg) en 8,7 mg inactief methionine toegevoegd. Na 24, 48 en 72 uur incubatie werden monsters van resp. 69 gram (I), 75 gram (II) en 120 gram (III) incubatiemengsel opgewerkt. De opbrengsten waren resp. I) 3,6 mg β -sitosterol-28,29- ^{14}C , spec. act. 33 nCi/mM, II) 3,2 mg, spec. act. 19 nCi/mM en III) 1,0 mg, spec. act. 24 nCi/mM.

Conclusie

In alle uitgevoerde experimenten bleek de specifieke radioactiviteit te laag om bruikbaar te zijn voor insektenproeven. Allais en Barbier¹² verkregen met een specifieke radioactiviteit van 50 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ nauwelijks interpreteerbare resultaten bij de bestudering van het lot van de koolstofatomen 28 en 29 bij de omzetting van β -sitosterol in cholesterol.

Literatuur

1. E. Heftmann
Lloydia 31, 293 (1968)
2. E. Lederer
Quart. Rev. 23, 453 (1969)
3. P.T. Russel, R.T. van Aller and W.R. Nes
J. Biol. Chem. 242, 5802 (1967)
4. A.R.H. Smith, L.J. Goad and T.W. Goodwin
Biochem. J. 104, 56 C (1967)
5. R.T. van Aller, H. Chikamatsu, N.J. de Souza, J.P. John and W.R. Nes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 842 (1968)
6. M. Castle, G.A. Blondin and W.R. Nes
J. Am. Chem. Soc. 85, 3306 (1963);
Chem 242, 5796 (1967)



8.
$$\frac{150}{3.2} \times \frac{116.000}{60 \times}$$

9.
$$\frac{100.000 \text{ d/s mmol}}{3 \mu\text{C/mmole}} \quad 1966)$$

Synthesis of β -Sitosterol-3- ^{14}C

P. Ph. H. L. OTTO, A. C. BESEMER and W. H. J. M. WIENTJENS

Central Laboratory TNO, Delft, The Netherlands.

Received December 1, 1969.

SUMMARY

The synthesis of β -sitosterol-3- ^{14}C , specific activity 5 mCi/mM, radiochemical purity $\geq 98\%$, is described. Starting from stigmasterol, the complete synthesis consists of eleven reaction steps. It is based on methods described in the literature. For some of the steps, a considerable improvement in yield has been achieved. The actual labelling step is the condensation of 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one with phenyl acetate- ^{14}C in the presence of sodium hydride. β -Sitosterol-3- ^{14}C has been obtained with a chemical yield of 23 %, based on 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one. The radiochemical yield was 10.3 %. Chemical and radiochemical purities of β -sitosterol-3- ^{14}C have been determined by means of thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography and mass spectrometry.

INTRODUCTION.

For work in our institute on sterol metabolism of insects, in particular on the conversion of β -sitosterol into cholesterol and a possible inhibition of this dealkylation, β -sitosterol labelled with ^{14}C in the nucleus was needed. β -Sitosterol is a sterol widely occurring in plants; it differs from the zoosterol cholesterol in having an additional ethyl group attached to carbon atom 24 (Fig. 1). Plant-eating insects are able to remove this ethyl group. For these insects sitosterol is an important source of cholesterol, which in its turn is a precursor of the vital moulting hormone ecdysone.

A general method for labelling steroids with ^{14}C in ring A of the steroid nucleus was developed as early as 1947 by Turner ^(1, 2), who prepared cholestenone-3- ^{14}C from cholestenone. The conversion of cholestenone into cholesterol has also been described ^(3, 4, 5). An alternative route leading to ^{14}C substitution at the 4-position has been developed by Fujimoto ^(6, 7). Though the method of Fujimoto gives higher radiochemical yields, we chose the method of Turner, as we had better access to labelled phenyl acetate and



FIG. 1.

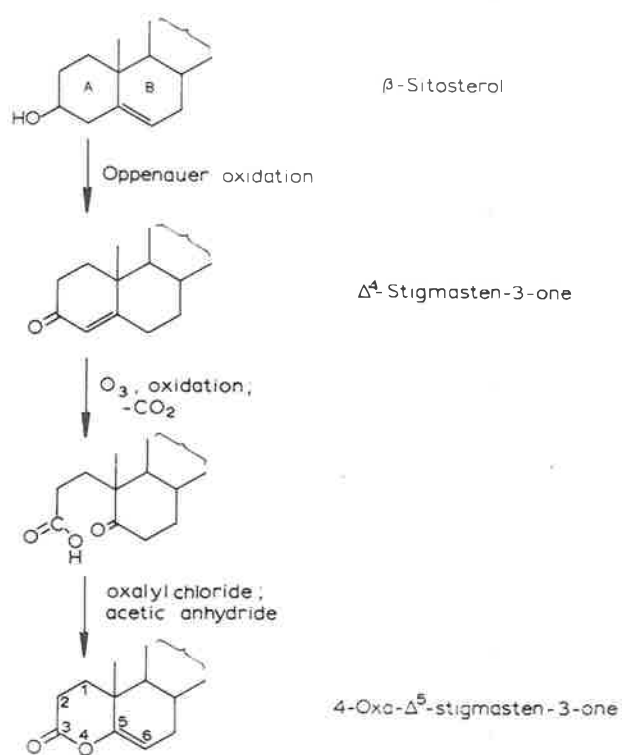


FIG. 2.

preferred carrying out a synthesis with phenyl acetate instead of a Grignard reaction with a small amount of methyl- ^{14}C -iodide.

A scheme of the reactions is given in Figures 2 to 4. Starting from pure β -sitosterol, the synthesis comprises seven steps, the net result being the replacement of carbon atoms 3 and 4 by the carbon atoms of acetic acid, labelled with ^{14}C . Commercial β -sitosterol could not be used as a starting material, since β -sitosterol isolated from plants contains large amounts of campesterol in percentages ranging up to 35 %. This homologue is difficult to separate from β -sitosterol on a preparative scale. Neither is it likely that its derivatives can be separated in the course of the synthesis. We therefore started with pure β -sitosterol prepared from stigmasterol, following the method of Steele and Mosettig⁽⁸⁾, with slight modifications. By an Oppenauer oxidation (Fig. 2), the OH group is oxidized, while the double bond is shifted

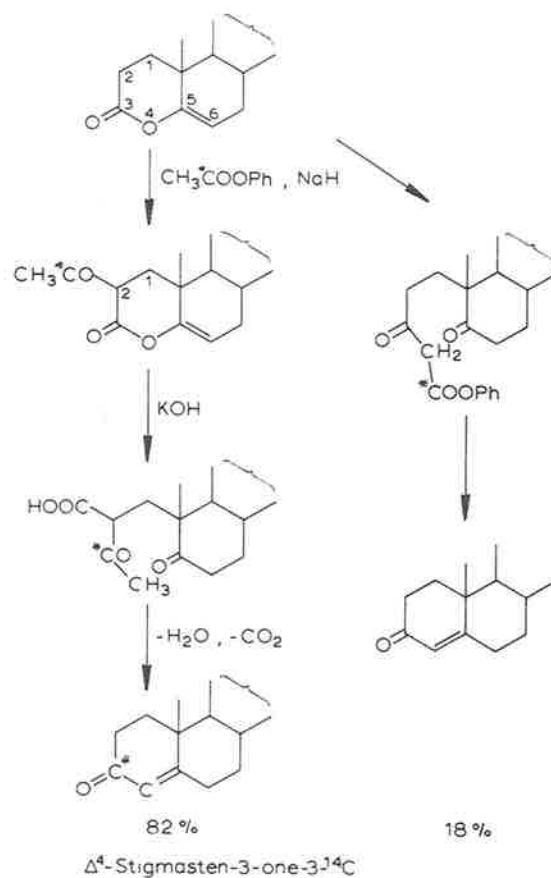


FIG. 3.

from ring B to ring A, in conjugation with the keto function ⁽¹⁶⁾. Then with ozone, the double bond is attacked and the ring is opened. By further oxidation an acid is formed, which loses carbon dioxide and the keto acid shown is obtained. By treatment with oxalyl chloride and acetic anhydride, a method described by Fujimoto and Jacobson ⁽⁷⁾, the carboxyl group forms an anhydride with the enolized keto function. We have been able to raise the yield of the conversion of Δ^4 -stigmasten-3-one into 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one to 55 %. This enol lactone is the actual starting material for the radio-active synthesis (Fig. 3). It is condensed with ¹⁴C-labelled phenyl acetate in the presence of sodium hydride. The $\text{CH}_3^{14}\text{CO}$ group is attached to carbon atom 2. By treatment with potassium hydroxide, the enol lactone is hydrolyzed, the ring is opened and by rotation around the $\text{C}_1\text{-C}_2$ bond as axis, the carbon atoms of the CH_3CO group come to occupy positions 3 and 4 in the steroid skeleton.

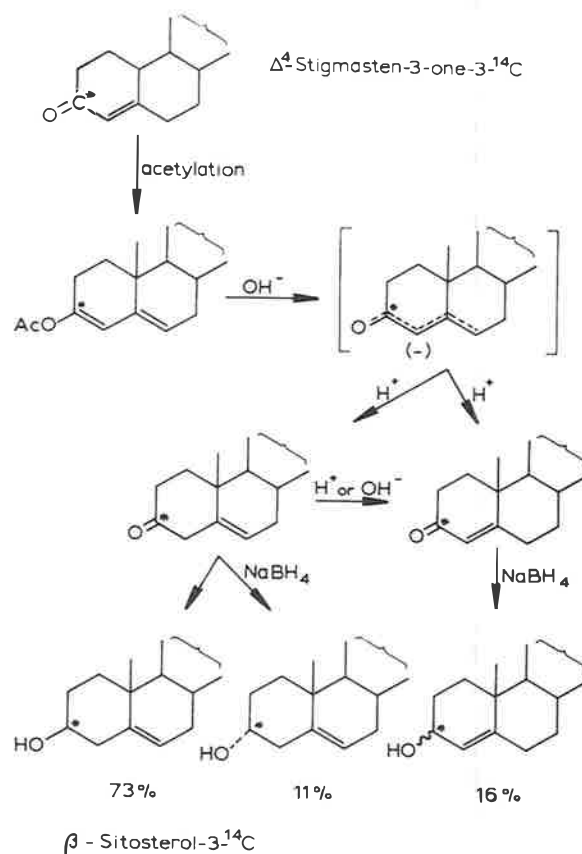


FIG. 4.

Water and carbon dioxide are split off and Δ^4 -stigmasten-3-one-3- ^{14}C is obtained. In a side reaction, the carbonyl function of the enol lactone condenses with the CH_3 group of the phenyl acetate. The resulting condensation product is also hydrolyzed and splits off water and carbon dioxide, thus forming unlabelled stigmastenone. The result is that the stigmastenone obtained has a somewhat lower specific activity than the phenyl acetate- ^{14}C . We found a decrease of 18 %, which means that 82 % of the stigmastenone is formed by route I, and 18 % by route II. The stigmastenone was purified twice by column chromatography. The overall yield was 36 %, based on enol lactone; the radiochemical yield was 16 %.

Two more alterations are required for conversion of the Δ^4 -3-keto steroid into β -sitosterol : shift of the double bond from Δ^4 -position in ring A to Δ^5 -position in ring B and reduction of the carbonyl function to a β -hydroxyl group. By treatment with isopropenyl acetate (Fig. 4), the enolized ketone is acetylated. For enolization a hydrogen atom at C-6 is preferred to a hydrogen atom at C-2. The acetoxyl- $\Delta^{3,5}$ -diene obtained is hydrolyzed; the intermediate anion takes up a proton from the solvent (methanol, ether, water); attachment of the proton to position 4 is kinetically preferred ⁽¹⁰⁾. When the Δ^5 -3-keto steroid formed is reduced, it yields β -sitosterol and the epimer with the hydroxyl group in axial orientation. Some Δ^4 -3-keto steroid is also formed, either by direct attachment of a proton to position 6, or by isomerization of the Δ^5 -keto steroid, which is known to occur very easily under the influence of acid or base. By reduction, two more isomers of β -sitosterol are formed.

The deconjugation of Δ^4 -3-keto steroids has been the subject of a series of investigations ^(9, 10, 11, 12, 13, 14). It is possible to obtain the intermediate anion directly from the Δ^4 -3-ketone, e.g. by reaction with potassium *t*-butoxide ⁽¹¹⁾. However, the indirect route via the enol acetate is to be preferred from a preparative point of view.

The conversion of the enol acetate into β -sitosterol by reaction with sodium borohydride has been described by Fujimoto and Jacobson ⁽⁷⁾. Following their procedure, we obtained predominantly the Δ^4 -isomers of β -sitosterol. We have therefore studied the influence of reaction conditions more extensively and obtained best results when the hydrolysis was carried out at -10°C , at a NaOH-concentration of about $5 \cdot 10^{-3}$ mM/ml, in a solution containing sodium borohydride so that the ketone formed is reduced immediately. Under these conditions, the isomerization of the Δ^5 - into the Δ^4 -ketone is not yet important, while the enol acetate is hydrolyzed at moderate rate; the sodium borohydride is more stable than at a lower pH ⁽¹⁵⁾. Progress of the reaction was followed by means of thin-layer chromatographic analysis. β -Sitosterol is formed in 73 % yield. After purifying the product twice by column chromatography, and by recrystallization, β -sitosterol-3- ^{14}C is obtained in 64 % yield.

EXPERIMENTAL.

β -Sitosterol.

Stigmasterol (Fluka), which, as was found by gas chromatography, contained a trace of campesterol besides about 5 % β -sitosterol, was used for the synthesis of β -sitosterol. We have followed one of the two methods given by Steele and Mosettig⁽⁸⁾, viz. the route via i-stigmasteryl methyl ether, since in this route the amounts are easier to handle than in the route via i-stigmasterol. The intermediates of the synthesis were thoroughly purified. β -Sitosterol, after purification by column chromatography, contained, besides a trace of campesterol, some stigmasterol and stigmastanol. No further attempt was made to remove stigmasterol and stigmastanol, because impurities resulting from these compounds could more easily be separated in some of the subsequent reaction steps. The various reaction steps of the synthesis of β -sitosterol were carried out in several batches. Their best results gave an overall yield of 47 %.

Δ^4 -Stigmasten-3-one.

β -Sitosterol was oxidized by the Oppenauer method as described by Barton and Jones⁽¹⁶⁾. The yield after purification by column chromatography and recrystallization from aqueous methanol was 71 %.

4-Oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one.

The procedure given by Fujimoto and Jacobson⁽⁷⁾ has been slightly modified.

Δ^4 -Stigmasten-3-one (2.4 g, 5.86 mM) was dissolved in ethyl acetate (30 ml) and glacial acetic acid (30 ml), and ozonized at -10°C until the initially formed yellow colour had disappeared. When water (10 ml) and hydrogen peroxide (30 %, 1 ml) were added, a white crystalline precipitate was formed. After the mixture had been standing for 18 hours at 20°C , it was cooled to 0°C . The crystals (A) were then separated from the mother liquor (B), and dissolved in a mixture of hydrogen peroxide (30 %, 1.5 ml), ethyl acetate (65 ml) and acetic acid (5 ml). Efficient stirring for 80 hours was required. The solution was taken to dryness in vacuo; traces of water were removed by azeotropic distillation with benzene (during warming up, a gas was evolved); traces of benzene were removed in vacuo. Then the residue was dissolved in freshly (!) distilled oxalyl chloride (6 ml) by stirring at -2°C , under nitrogen. After the solution had been standing at 0°C for 70 hours, it was taken to dryness in vacuo. The residue was refluxed with acetic anhydride (50 ml) for 2.5 hours, after which the solution was concentrated in vacuo and 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one crystallized. It was dried over sodium

hydroxide and finally sublimed at 150° C and 10⁻³ mm Hg. The yield was 610 mg, m. p. 106.5-107° C (lit. ⁽⁷⁾ m. p. 103-107° C).

The mother liquor (B) was also taken to dryness in vacuo; traces of water were removed by azeotropic distillation with benzene. The colourless only residue was treated with oxalyl chloride and acetic anhydride as described above, yielding a second crop of 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one (730 mg, m. p. 103-105° C). The total yield was 1.34 g (3.23 mM, 55 %). This moisture-sensitive compound was stored in vacuum sealed ampoules.

Δ^4 -Stigmasten-3-one-3-¹⁴C.

A solution of phenyl acetate-¹⁴C (2.8 mM, 380 mg; spec. act. 6.28 mCi/mM) in benzene (2 ml) was stirred with 100 mg sodium hydride for 15 minutes, shortly before use, in order to remove traces of moisture. The clear solution was separated from the sodium hydride by means of a pipette. In a 50 ml flask, provided with a magnetic stirrer and connected to a gas burette, a mixture of 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one (1.5 mM, 620 mg), finely powdered sodium hydride (875 mg), the benzene solution of phenyl acetate-¹⁴C and 10 ml of dry benzene, were stirred very well at room temperature until no more hydrogen was evolved (70 hours). Excess sodium hydride was decomposed by adding 1 ml of concentrated hydrochloric acid. The mixture was extracted with ether, the ether solution washed twice with water, dried over sodium sulphate and evaporated. Volatile components such as phenol, phenyl acetoacetate and phenyl acetate, were removed by heating at 80° C in vacuo (10⁻³ mm Hg). The residue was dissolved in methanol (55 ml) and water (20 ml), containing potassium hydroxide (700 mg). This solution was refluxed for 18 hours by heating in an oil bath at 85-90° C. After addition of acetic acid (2 ml), the solution was concentrated to a volume of 5 ml and extracted with ether. The ether solution was washed with water and evaporated to dryness in vacuo. The residue was dissolved in n-hexane/benzene (1 : 1) and purified by column chromatography on florisil. The column was eluted with n-hexane/benzene mixtures, varying the benzene concentration from 0 to 100 % in steps of 10 % after each 100 ml. The fractions containing Δ^4 -stigmastene-3-one-3-¹⁴C were collected and the purification repeated. The yield was 222 mg = 0.54 mM, i.e. 36 % based on 4-oxa- Δ^5 -stigmasten-3-one.

3-Acetoxy- $\Delta^{3,5}$ -stigmastadiene-3-¹⁴C.

Δ^4 -Stigmasten-3-one-3-¹⁴C, (0.5 mM, 207 mg), was dissolved in isopropenyl acetate (40 ml), and refluxed for 2.5 hours after addition of 0.04 ml of concentrated sulphuric acid (*d* 1.84). The mixture was concentrated to half its volume, isopropenyl acetate (20 ml) was added and it was refluxed for 3 hours. Then once again the mixture was concentrated to half its volume,

isopropenyl acetate (20 ml) added and refluxed for 3 hours. Finally it was taken to dryness in vacuo.

β -Sitosterol-3- ^{14}C .

The 3-acetoxy- $\Delta^{3,5}$ -stigmastadiene-3- ^{14}C was dissolved in a mixture of ether (100 ml) and methanol (75 ml); a solution of sodium hydroxide (90 mg = 2.3 mM; i.e. 0.8 mM in excess of the amount needed for neutralizing the sulphuric acid used in the preparation of the enol-acetate) in water (8 ml) was added. After cooling at -10°C , a total of 630 mg sodium borohydride was added in the course of 100 hours, in portions of 70 mg, each dissolved in 10 ml of methanol/water (60 : 40). The progress of the reaction was followed by thin-layer chromatographic analysis. After 140 hours, conversion was complete. The temperature was raised to 5°C and excess sodium borohydride decomposed by addition of concentrated hydrochloric acid (6 ml; d 1.18). The solution was boiled for 45 minutes, concentrated to 60 ml and extracted with ether (5×20 ml). The ether solution was washed with water (20 ml), dried over sodium sulphate and taken to dryness. The residue was dissolved in benzene (10 ml), n-hexane (30 ml) was added and it was purified by column chromatography on deactivated alumina (15 g; diameter of column 1 cm; for deactivation a mixture of 250 g Al_2O_3 , according to Brockmann, and 14 ml of 10 % acetic acid was agitated for 2 days).

The column was eluted subsequently with 150 ml of n-hexane, 150 ml of n-hexane/ether (97 : 3), 100 ml of n-hexane/ether (94 : 6), 100 ml of n-hexane/ether (91 : 9) and 100 ml of n-hexane/ether (88 : 12). The eluent was collected in fractions of 50 ml. Each fraction was analyzed by thin-layer chromatography. The fractions containing β -sitosterol-3- ^{14}C were combined and purification by column chromatography repeated. Finally, the β -sitosterol-3- ^{14}C was recrystallized from methanol/water (9 : 1). The yield was 130.6 mg, 0.32 mM, i.e. 64 % based on Δ^4 -stigmasten-3-one-3- ^{14}C . The product was dissolved in benzene/toluene (13 : 1) and stored in vacuum-sealed ampoules.

Specific activity.

A sample of the β -sitosterol-3- ^{14}C benzene/toluene solution was taken to dryness and the residue sublimed in high vacuum, in order to remove traces of solvent. A solution of an accurately known β -sitosterol-3- ^{14}C concentration was prepared in a liquid scintillator, to which carrier β -sitosterol was added (about 0.5 mg/ml). The composition of the liquid scintillator was 5 g PPO and 0.5 g POPOP in 1 l toluene. Activity measurements were carried out with 15 ml solution in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer, model 3375. The specific activity found was : 5.17 ± 0.03 mCi/mM.

Thin-layer chromatography.

Analyses were carried out on silica gel (silica gel H, Merck, layer thickness 0.25 mm; activation of layer by heating for one hour at 110° C) in toluene/ethyl acetate (3 : 1). Detection under UV light ($\lambda = 366$ nm) after spraying with 10 % H_2SO_4 and heating at 150° C for 15 min. The following R_f values were found : β -sitosterol 0.36; Δ^5 -stigmasten-3 α -ol 0.45; Δ^4 -stigmasten-3 β -ol 0.42; Δ^4 -stigmasten-3 α -ol 0.49; campesterol 0.36. In toluene/ethyl acetate (4 : 1), the following R_f values were found : β -sitosterol 0.26; Δ^4 -stigmasten-3 β -ol 0.34; $\Delta^{3,5}$ -stigmastadiene 0.7-0.8; Δ^4 -stigmasten-3-one 0.50; campesterol 0.26. Autoradiograms on Kodak no screen X-ray film and a radioscan of β -sitosterol-3- ^{14}C are shown in Figure 5. Judging from the densities on the film,

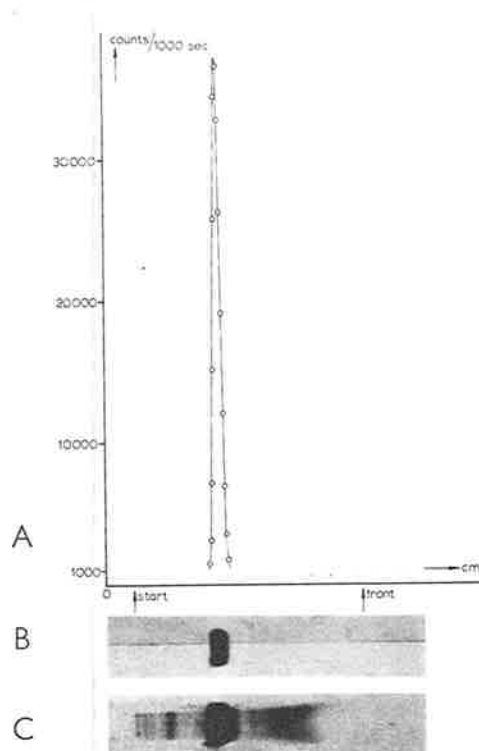


FIG. 5. Thin layer chromatogram of β -sitosterol-3- ^{14}C silicagel H, toluene/ethyl acetate 3 : 1.

A. scan of chromatogram, in steps of 1 mm,

B. autoradiogram, exposure time 0.7 h,

C. autoradiogram, exposure time 70 h.

The main impurities are estimated at < 0.1 %.

even the main impurities are present in amounts much less than 1 %, probably about 0.1 %. This is confirmed by the radio-scan : one sharp peak at the R_f for β -sitosterol, and virtually no activity elsewhere.

Gas chromatography.

A gas chromatographic analysis of β -sitosterol-3- ^{14}C methyl ether, according to the method described by Clayton ⁽¹⁷⁾, was carried out. Fractions were collected in glass tubes by cooling the gas stream emerging from the column. The radioactivity of each fraction was determined after the glass tubes had been washed with 15 ml scintillation liquid, containing 10 mg cholesterol, 5 g PPO and 0.5 g POPOP per 1 l toluene. The radio-histogram together with the mass peaks are shown in Figure 6. Campesterol is present in about 0.5 %.

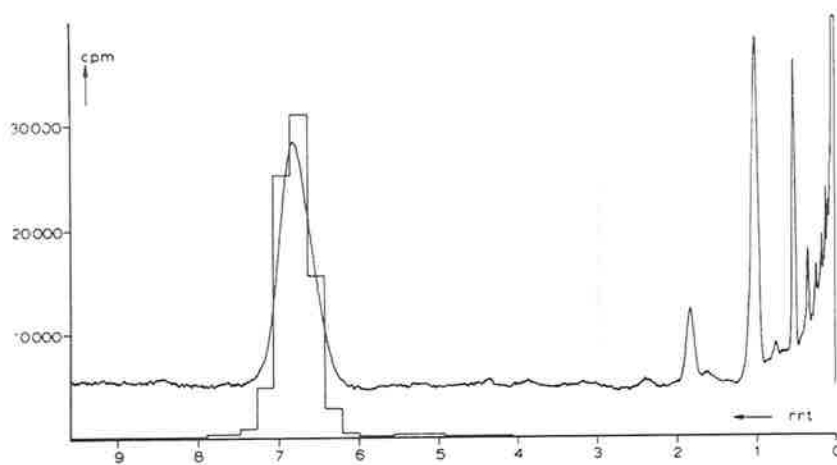


FIG. 6. Gaschromatogram of β -sitosterol-3- ^{14}C methyl ether.

The mass peaks with r.r.t. < 2 are artefacts of the methylation. The histogram shows the activities of separate fractions. Radiochemical impurity at r.r.t. 5.3 : < 0.5 % (campesterol methyl ether).

Mass spectrometry.

A mass spectrum was run on a Hitachi-Perkin Elmer RMU-6E, with an electron energy of 70 eV. Part of the spectrum and the interpretation are shown in Table 1. Campesterol might be present in circa 0.7 %; the presence of about 1 % of other molecules with M.W. 416 cannot be excluded.

TABLE I. Mass spectrum of β -sitosterol-3- ^{14}C .

M/e	Relative peak-height $\pm$ S.D. (1)	Molecular ion peaks of β -sitosterol $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}$ $^{14}\text{C} \text{ C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}$ (2)		Fragment ion peaks (β -sitosterol- H_2O) (3)	Fragment ion peaks (β -sitosterol- CH_3) (4)	Molecular ion peaks of campesterol (5)
418	0.5 ± 0.1		$\text{P}(\text{M}' + 2)$ 0.5			
417	3.7 ± 0.2	$\text{P}(\text{M} + 3)$ 0.6	$\text{P}(\text{M}' + 1)$ 3.2			
416	15.5 ± 0.2	$\text{P}(\text{M} + 2)$ 5.2	$\text{P}(\text{M}')$ 10.3			
415	31.9 ± 0.5	$\text{P}(\text{M} + 1)$ 32.2				
414	100	$\text{P}(\text{M})$ 100				
413	2.0 ± 0.1					
412	1.8 ± 0.1					
402	1.0 ± 0.1				$\text{P}(\text{M}''' + 3)$ 0.9	
401	4.0 ± 0.1				$\text{P}(\text{M}''' + 2)$ 3.8	$\text{P}(\text{M}^{\text{IV}} + 1)$ 0.2
400	8.6 ± 0.2			$\text{P}(\text{M}'' + 4)$ 0.2	$\text{P}(\text{M}''' + 1)$ 7.7	$\text{P}(\text{M}^{\text{IV}} + 1)$ 0.7
399	25.5 ± 1.0			$\text{P}(\text{M}'' + 3)$ 1.2	$\text{P}(\text{M}''')$ 24.3	
398	5.6 ± 0.2			$\text{P}(\text{M}'' + 2)$ 5.2		
397	11.1 ± 0.4			$\text{P}(\text{M}'' + 1)$ 10.8		
396	33.6 ± 1.4			$\text{P}(\text{M}'')$ 33.6		
395	1.5 ± 0.1					

(1) Mean of 5 spectra, electron energy 70 eV.

(2) $\text{P}(\text{M}') = \text{P}(416) - \text{P}(\text{M} + 2) = 10.3$. Calculated contribution of ^{14}C , based on spec. act. 5.17 mCi/mmmole and theoretical max. spec. act. 62.2 mCi/mmmole : $\text{C}/100\text{-C} = 9.2\%$. Conclusion : presence of other molecules with M.W. 416 can not be excluded (stigmastanol?).(3) $\text{P}(\text{M}'') = \text{P}(396)$; for calculation of the contribution to peaks 397 to 400, the ratios found in the group of peaks 414 to 418 were used.(4) $\text{P}(\text{M}''') = \text{P}(399) - \text{P}(\text{M}'' + 3)$; $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{O}$.(5) $\text{P}(\text{M}^{\text{IV}}) = \text{P}(400) - \text{P}(\text{M}''' + 1) - \text{P}(\text{M}'' + 4)$; campesterol circa 0.7 %.

DISCUSSION.

Chemical and radiochemical purities have been determined by means of thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Thin-layer radio-chromatography showed that a few minor, unidentified impurities are present in amounts of about 0.1 %. By gas-liquid radio-chromatography the presence of 0.5 % campesterol was shown. The mass spectrum shows two values of interest :

- (1) the contribution of campesterol is about 0.7 %, which is in excellent agreement with the value obtained from the radio gas-chromatogram;
- (2) the peak intensity at $M/e = 416$ indicates the presence of about 1 % of an impurity of molecular weight 416, which is not present in pure β -sitosterol *.

We have not been able to identify this impurity, but vapour-programmed thin-layer chromatography ⁽¹⁸⁾ and TLC on argentated silica gel showed that, if β -sitosterol-3-¹⁴C contains any 5 α -stigmastanol, it must be less than 1 %.

From these analytical results we may conclude that the β -sitosterol-3-¹⁴C obtained, has a radiochemical purity of ≥ 98 %. Though we have paid much attention to the purification of intermediates, a trace of campesterol present in the starting material, could not be removed in the course of the synthesis; it therefore appears in the final product.

ACKNOWLEDGEMENT.

The authors wish to thank Dr. E. Talman for running mass spectra and assisting with their interpretation, as well as Mrs. E. L. Besemer-Blok and Mr W. 't Jong for their valuable technical assistance.

REFERENCES

1. TURNER, R. B. — Radioactive Cholestenone, *J. Am. Chem. Soc.*, **69** : 726 (1947).
2. TURNER, R. B. — Steroids Labeled with Isotopic Carbon : Cholestenone and Testosterone, *J. Am. Chem. Soc.*, **72** : 579 (1950).
3. DAUBEN, W. G. and EASTHAM, J. F. — The Reduction of Cholestenone Enol Acetate by Sodium Borohydride, *J. Am. Chem. Soc.*, **73** : 4463 (1951).
4. BELLEAU, B. and GALLAGHER, T. F. — The Conversion of Δ^4 -Cholestene-3-one to Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.*, **73** : 4458 (1951).
5. SCHWENK, E., GUT, M. and BELISLE, J. — Preparation of ¹⁴C-Cholesterol from ¹⁴C-Cholestenone, *Arch. Biochem. Biophys.*, **31** : 456 (1951).
6. FUJIMOTO, G. I. — Labeling of Steroids in the 4-Position, *J. Am. Chem. Soc.*, **73** : 1856 (1951).

* We are indebted to Dr M. Barbier, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, France, for kindly providing a sample of a few mg of absolutely pure β -sitosterol.

7. FUJIMOTO, G. I. and JACOBSON, A. E. — A Preparation of β -Sitosterol, *J. Org. Chem.*, **29** : 3377 (1964).
8. STEELE, J. A. and MOSETTIG, E. — The Solvolysis of Stigmasteryl Tosylate, *J. Org. Chem.*, **28** : 571 (1963).
9. BIRCH, A. J. — Reduction by Dissolving Metals, Part VII. The Reactivity of Mesomeric Anions in Relation to the Reduction of Benzene Rings, *J. Chem. Soc.*, 1551 (1950).
10. BIRCH, A. J. — A Conversion of Cholest-4-en-3-one into Cholesterol, *J. Chem. Soc.*, 2325 (1950).
11. RINGOLD, H. J. and MALHOTRA, S. K. — Deconjugation of α,β -unsaturated Ketones, *Tetrahedron Letters*, N-15, 669-672 (1962).
12. SHAPIRO, E. L., c.s. — Deconjugation of $\Delta^1,4$ -3-ketosteroids, *Steroids*, **3** : 183 (1964).
13. SHAPIRO, E. L., c.s. — 3β -Hydroxy-1,5-bisdehydrosteroids, *Steroids*, **8** : 461 (1966).
14. KELLY, R. W., McCLENAGHAN, I. and SYKES, P. J. — Synthetic Steroids, Part II. The Deconjugation of Δ^4 -3-oxo-steroids, *J. Chem. Soc. (C)*, 2375 (1967).
15. JENSEN, E. H. — A study on Sodium Borohydride, p. 38, Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, Copenhagen (1954).
16. BARTON, D. H. R. and JONES, E. R. H. — Studies in the Sterol Group. Part XLV. Investigation of the Homogeneity of Sitosterol by Oxidation with the Oppenauer Reagent, *J. Chem. Soc.*, 599 (1943).
17. CLAYTON, R. B. — Gas-Liquid Chromatography of Sterol Methyl Ethers and some Correlations between Molecular Structure and Retention Data, *Biochemistry*, **1** : 357 (1962).
18. WIJNTJENS, W. H. J. M., DE ZEEUW, R. A. and WIJSBEEK, J. — Separation of Sterols by Vapour-Programmed Thin-Layer Chromatography, to be published.

**Separation of sterols by vapor-programmed
thin-layer chromatography**

W.H.J.M. WIENTJENS, R.A. DE ZEEUW, AND J. WIJSBEEK

Central Laboratory TNO, Delft, The Netherlands; and Laboratory for
Pharmaceutical and Analytical Chemistry, State University, Groningen,
The Netherlands

SUMMARY By vapor-programmed thin-layer chromatography on silica gel, it was possible to separate cholestanol from cholesterol and stigmastanol from β -sitosterol. The method was applied for the analysis of β -sitosterol-3-¹⁴C.

SUPPLEMENTARY KEY WORDS cholestanol . cholesterol .
stigmastanol . β -sitosterol . β -sitosterol-3-¹⁴C

By ordinary thin-layer chromatography, sterols containing one double bond are difficult to separate from the corresponding saturated sterols. Special chromatographic techniques are necessary, such as the use of silica gel or alumina impregnated with silver nitrate (1), continuous development (2), or partition chromatography with a reversed-phase system (3). We wish to report here the separation of cholestanol and cholesterol, and of stigmastanol and β -sitosterol by vapor-programmed thin-layer chromatography on silica gel.

The sterols used were the following: cholestanol (Fluka A.G., Buchs, Switzerland), cholesterol (kindly supplied by Wed. D.S. van Schuppen, Veenendaal, The Netherlands) purified by recrystallization, β -sitosterol (kindly supplied by The Upjohn Co., Kalamazoo, Mich.)

of about 80% purity as shown by gas-liquid chromatography with stigmastanol and campesterol as the most probable main impurities, and stigmastanol¹ synthesized by reduction of β -sitosterol and purified by recrystallization. Solvents used were of reagent grade (E. Merck A.G., Darmstadt, Germany). The compositions of solvent mixtures are given in volume parts. Silica Gel GF 254 (Merck A.G.) was used as adsorbent, in 0.25 mm layers on glass plates, 20 x 20 cm. After spreading (Desaga apparatus), the plates were air dried for 15 min, heated for 30 min at 110 °C in an oven with a fan, then cooled and stored in a dessiccator. The sterols were dissolved in benzene (0.1% w/v), and 5- μ l portions were applied with a 10 μ l micropipette (Desaga, Heidelberg, Germany), 2.5 cm from the bottom edge of the plate. Small bands of adsorbent, approximately 0.5 cm wide, were scraped off the side edges and the bottom edges. We used normal chambers (Desaga) and the 20 x 20 cm vapor-programming chamber (Desaga). In the latter chamber, the troughs were filled with about 5 ml each of the appropriate solvent mixtures, the plate was fixed in position, and, after allowing 10 min for equilibration, the solvent reservoir was filled with 25 ml of running solvent. Small strips, 0.5 mm thick were used as spacers to prevent the adsorbent from touching the trough walls. These strips were placed on the side walls of the chamber and fitted on to the side edges of the plate from which the adsorbent had been removed. After development the plate was sprayed with 2 N H₂SO₄ solution and heated at 110 °C in an oven. Detection was carried out under UV-light, 350 nm (Camag Universal lamp), and photographs were made in daylight on Agfacolor CT 18 Diapositive film.

Fig. 1A shows that, with the best system in our hands, toluene-ethyl acetate (80 + 20) in an unsaturated chamber, cholestanol and cholesterol, and also stigmastanol and β -sitosterol, are not

¹A sample of stigmastanol was prepared by Mr. A.C. Besemer, Central Laboratory TNO, Delft, The Netherlands.

separated by ordinary thin-layer chromatography. However, by using a vapor-programming chamber, as described by de Zeeuw (4), and different mixtures of carbon tetrachloride and ether in the troughs, a separation can be achieved between the saturated and unsaturated sterols, which is shown in Fig. 1B. Vapor-programmed TLC is based on the principle that the migration of the solute spots is highly dependent on the adsorption of solvent vapors by the dry adsorbent. To obtain optimum vapor influence, a vapor-programming chamber has been designed in which the plate is developed in a horizontal position. During development the adsorbent faces a number of troughs that can be filled with liquids of different compositions, while the distance between the adsorbent and the trough walls is kept very small to prevent vapor diffusions. Thus, optimum vapor conditions can be established all over the plate. For the separation of closely related substances an accelerating vapor program should be used, i.e. the polarity of the solvent mixtures in the troughs increase from bottom to top. However, in order to prevent tailing of the spots, interspersing troughs with liquids of low polarity (retarding troughs) have to be used between the accelerating troughs. Details are described in the legend of Fig. 1B. Increased proportions of ether are used in the accelerating troughs from bottom to top, whereas carbon tetrachloride is used as retarding liquid. Benzene instead of carbon tetrachloride is used in the solvent reservoir and in the first trough to give the substances a suitable starting migration. The R_f values for cholestanol and stigmastanol are about 0.59, and those for cholesterol and β -sitosterol about 0.66. A similar separation was obtained by Bennett and Heftmann (2) for cholestanol and cholesterol with continuous development, but their developing time was 6 hr, whereas ours was 3.

We have applied this method of vapor-programmed thin-layer

A

1

2

3

4

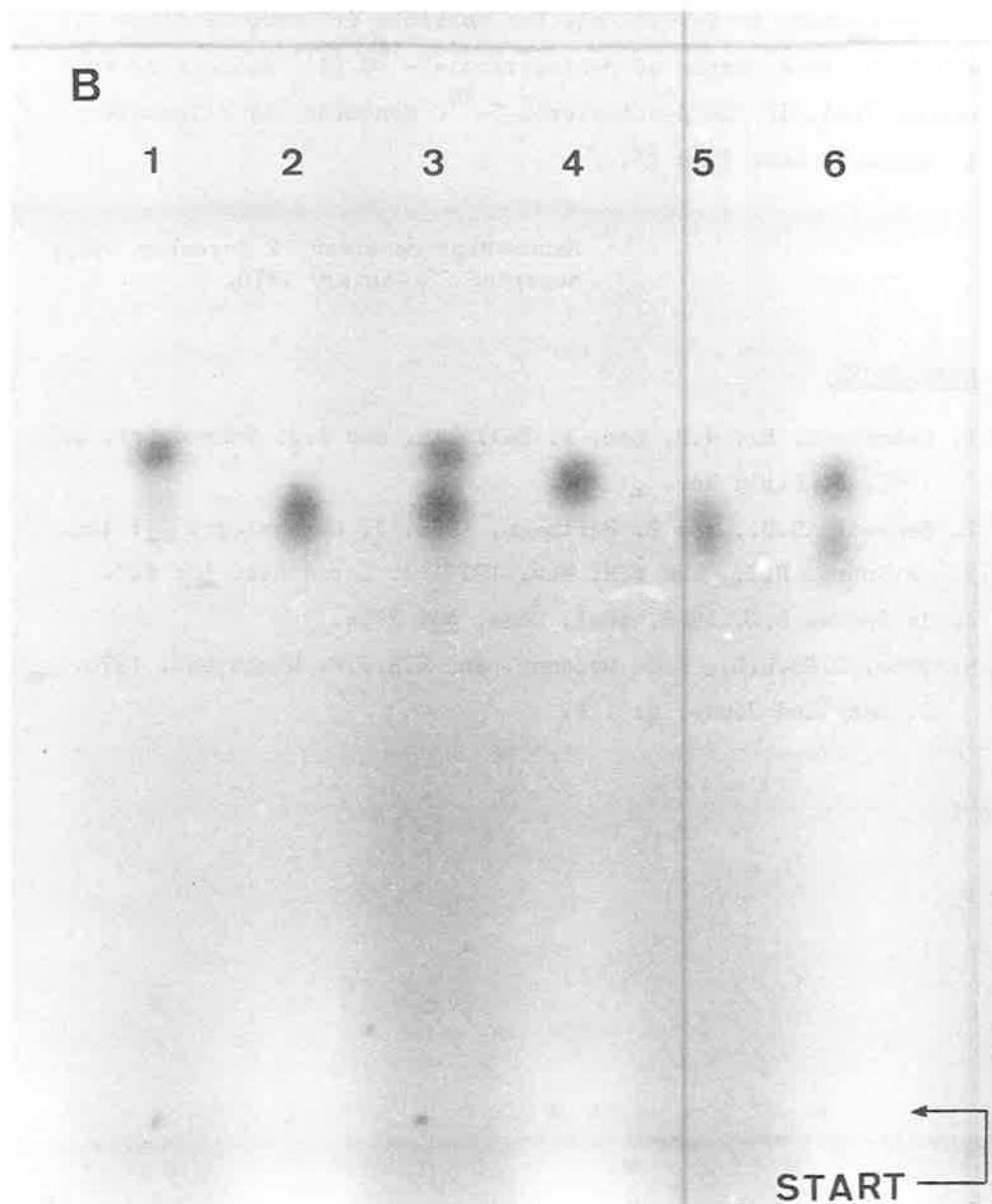
5

6

START

Fig. 1. Thin-layer chromatography of sterols. Temperature 20 °C, relative humidity 40%. 1, β -sitosterol; 2, stigmasterol; 3, mixture of β -sitosterol and stigmasterol; 4, cholesterol; 5, cholestanol; and 6, mixture of cholesterol and cholestanol.

A: Unsaturated chamber (Desaga), solvent system toluene-ethyl acetate (80+20), development 1 hr.



B: Vapor-programmed chamber (Desaga), solvent system benzene-ether (90+10), saturation 10 min, development 3hr, strips 0.5 mm thick, cooling 19 °C. Troughs: 1,benzene-ether (90+10); 2,carbon tetrachloride-ether (80+20); 3 and 4,carbon tetrachloride; 5,carbon tetrachloride-ether (60+40); 6 and 7,carbon tetrachloride; 8,carbon tetrachloride-ether (60+40); 9 and 10,carbon tetrachloride; 11,carbon tetrachloride-ether (40+60); 12-21, carbon tetrachloride.

chromatography to investigate the possible presence of stigmastanol in a sample of β -sitosterol-3- ^{14}C (5). Radioautography showed that, if the β -sitosterol-3- ^{14}C contains any stigmastanol, it would be less than 1%.

Manuscript received 12 November 1969;
accepted 26 January 1970.

REFERENCES

1. Kammereck, R., W.H. Lee, A. Paliokas, and G.J. Schroepfer, Jr. 1967. J. Lipid Res. 8: 282.
2. Bennett, R.D., and E. Heftmann. 1966. J. Chromatogr. 21: 488.
3. de Souza, N.J., and W.R. Nes. 1969. J. Lipid Res. 10: 240.
4. de Zeeuw, R.A. 1968. Anal. Chem. 40: 2134.
5. Otto, P.Ph.H.L., A.C. Besemer, and W.H.J.M. Wientjens. 1970. J. Labelled Comds. 6: 111.

De omzetting van β -sitosterol in cholesterol bij drie soorten kakkerlakken

Inleiding

De omzetting van β -sitosterol in cholesterol werd onderzocht door toevoeging van β -sitosterol-3- ^{14}C aan het sterolvrij dieet van drie verschillende soorten kakkerlakken. Hoewel de kakkerlak een alleseter is, en niet een strikte planteneter, kan de omzetting van sitosterol in cholesterol goed bestudeerd worden in dit ook in andere opzichten geschikte laboratoriumdier. Teneinde de invloed van symbionten te vermijden werd gewerkt met aseptische kakkerlakken.

Materialen en methoden

Insektenkweken

De kakkerlakken *Blattella germanica* L., *Periplaneta americana* L. en *Eurycotis floridana* Walker werden in massacultures gekweekt op hondebrood (Bonzo Puppy) bij 30 °C. Eikapsels uit deze kweken werden verzameld en gesteriliseerd ¹ door achtereenvolgens wassen gedurende 1 minuut met 70%-ige alcohol, gedurende 2 minuten met een 0,2%-ige oplossing van HgCl_2 (May & Baker) in 50%-ige alcohol, gedurende 1 minuut met 70%-ige alcohol en tweemaal gedurende 1 minuut met gesteriliseerd water. De eikapsels van *Eurycotis floridana* werden gedurende 2 minuten in plaats van 1 minuut gewassen met alcohol en water. Voor een controle op steriliteit werden de eikapsels

per stuk overgebracht in een klein buisje, dat geplaatst was in een aseptische cultuurbuis, waarin ongeveer 4 ml van een medium, bestaande uit 2,4 gram thioglycolaat medium (Difco) en 2 gram agar (Oxoid) per 100 ml gedestilleerd water. Nadat de insekten uit het eikapsel waren gekomen, bleven ze nog 4 à 6 dagen in de buizen, waarbij ze ook op het thioglycolaatmedium rondliepen. Indien op dit medium geen infectie ontstond, werden de insekten overgebracht in aseptische kweekflessen. Hierin bevond zich 2% agar als waterbron en een buis met sterolvrij dieet. De samenstelling van het dieet is als volgt ^{2,3}:

31 gram fructose	(Merck)
30 gram casein, vitamin free, C grade	(California Corporation for Biochemical Research)
30 gram corn starch	(NBC)
4 gram salt mixture, USP XIV	(NBC)
3 gram sodium oleate, Lab grade	(Baker)
1 gram vitamine-mengsel	

De samenstelling van het vitamine-mengsel is:

5 mg folic acid, USP, C grade	(Calbiochem)
0,6 mg biotin, USP	(Calbiochem)
16 mg pyridoxinehydrochloride (vit B6), USP, C grade	(Calbiochem)
40 mg d-pantothenic acid calcium salt, USP	(Sigma)
100 mg niacin (nicotinic acid), USP, C grade	(Calbiochem)
18 mg riboflavin (vit B2), USP, C grade	(Calbiochem)
12 mg thiaminehydrochloride (vit B1), USP, B grade	(Calbiochem)
2 g i-inositol, USP	(Sigma)
4 g cholinechloride, pharmaceutical	(Calbiochem)

Voor langdurende proeven met *Blattella germanica* werd aan dit dieet 0,1% β -sitosterol-3-¹⁴C toegevoegd. Voor *Periplaneta americana* en *Eurycotis floridana* werd aan het sterolvrij dieet 0,1% niet-radioactief cholesterol toegevoegd, en werden na verloop van tijd nimfen of volwassen insekten uit deze aseptische massakweken gebruikt voor kortdurende proeven met β -sitosterol-3-¹⁴C. De kweekflessen met dieet werden gesteriliseerd bij 120 °C gedurende 20 minuten.

Sterolen

Naast het gesynthetiseerde β -sitosterol-3- ^{14}C waren de gebruikte sterolen cholesterol (Wed. D.S. van Schuppen, Veenendaal) en fucosterol (geïsoleerd uit zeewier *Fucus vesiculosus* door Dr. F.J. Ritter).

Extractie en verzeeping

Exemplaren van *Blattella germanica* werden in zijn geheel opgewerkt, terwijl van de grotere *Periplaneta americana* en *Eurycotis floridana* het maagdarmkanaal en de voortplantingsorganen apart werden geïsoleerd. Na beëindiging van de proeven werden de kakkerlakken met CO_2 verdoofd. De intacte *Blattella germanica* en de organen van *Periplaneta americana* en *Eurycotis floridana* werden bewaard in ethanol bij 4 °C. Bij opwerking werden de eerstgenoemde insecten in stukjes geknipt, terwijl de organen van laatstgenoemde insecten werden gehomogeniseerd. Van beide werden extracties uitgevoerd, met kokende ethanol en kokende aceton. De extracten werden verzameld door centrifugeren. Na verwijdering van het oplosmiddel werd het residu gedurende de nacht verzeept met 10 ml van een 10%-ige oplossing van kaliumhydroxyde in 80%-ige alcohol. Het reactiemengsel werd verdund met 25 ml water en geëxtraheerd met 3 x 20 ml ether. De verzamelde etherlagen werden gewassen met water en gedroogd met natriumsulfaat. Na filtratie van het droogmiddel en verwijdering van het oplosmiddel, werd het residu onderworpen aan kolomchromatografie en vervolgens gaschromatografie.

Chromatografie

Het residu werd opgenomen in 1 ml benzeen en gechromatografeerd over 2 gram gedesactiveerd Al_2O_3 (Merck) in petroleumether (60 - 80 °C). De Al_2O_3 was gedesactiveerd door 500 g te mengen met 35 ml 10% azijnzuur en onder verminderde druk droog te dampen. Er werd geëluëerd met 50 ml fracties van petroleumether, petroleumether -

benzeen (95 + 5), petroleumether - benzeen (90 + 10), petroleum-
ether - benzeen (70 + 30), petroleumether - benzeen (50 + 50),
benzeen en ether-methanol (95 + 5). De sterolen bevonden zich in
fractie 3 en 4.

Deze sterolfractionen werden gaschromatografisch onderzocht,
enerzijds als methyletherderivaten op DEGS volgens de methode zo-
als beschreven in deel I, anderzijds als vrije sterolen op 3% OV-
17 op chromosorb GAW (80-100 mesh) bij 250 °C. Voor de detectie van
de radioactiviteit werden twee methoden toegepast. De stoffen die
de gaschromatograaf verlieten werden door een glazen buisje geleid,
dat gekoeld werd door verdamping van dichloormethaan. Het gecon-
denseerde materiaal werd uit het buisje gespoeld met 15 ml scintil-
latievloeistof. De samenstelling van de scintillatievloeistof was
5 g PPO, 0,5 g POPOP, 10 mg cholesterol en 1 l toluen. De radio-
activiteitsmetingen werden gedaan met een Packard Tri-Carb vloeis-
tofscintillatieteller, model 3380. Bij de andere methode werden
de stoffen uit de gaschromatograaf geleid door een Berthold (Perkin
Elmer) doorstroomreactor RGC-170, welke gevuld was met CuO, bij
680 °C. Het gevormde water werd in een buisje magnesiumperchloraat
opgevangen, terwijl het gevormde $^{14}\text{CO}_2$ in een proportionele tel-
buis van 80 ml bij kamertemperatuur continu werd geteld.

Resultaten

Blattella germanica

Aseptische *Blattella germanica* werden vanaf het eikapsel gedu-
rende 6 weken in twee verschillende kweken gekweekt. Als voedsel
werd 3 gram sterolvrij dieet met 0,1% β -sitosterol-3- ^{14}C (36 μCi)
toegediend. Alvorens de insecten werden gedood, werden ze 2 dagen
te hongeren gezet in aseptische kweken, waarin zich alleen agar
bevond. De kweken werden gescheiden in nimfen, vrouwtjes en man-

netjes (resp. B 1 en 4, B 2 en 5 en B 3 en 6). Als blanco werd in een derde kweekfles gedurende dezelfde tijdsperiode van 6 weken 0,5 gram sterolvrij dieet plus 0,3 mg sitosterol-3-¹⁴C bewaard, doch zonder kakkerlakken. Dit dieet werd eveneens op radioactieve sterolinhoud geanalyseerd (B 7). De resultaten van de gaschromatografie zijn weergegeven in Tabel 1. De linkerkolommen geven de relatieve retentietijden t.o.v. cholestaan aan. De rechterkolommen geven de verhoudingen van de gevonden radioactieve pieken, waarbij de grootste piek gesteld wordt op 100. Bij langdurende proeven is dat de piek van cholesterol.

In soortgelijke langdurende proeven met *Blattella germanica* werd nagegaan wat de invloed van fucosterol en cholesterol is op de vorming van de omzettingsproducten van sitosterol. Daartoe werd *Blattella germanica* gekweekt op diëten met verschillende sterolsamenstellingen, nl. 1 kweek met 0,1% sitosterol-3-¹⁴C (B 8-10), 2 weken met 0,1% sitosterol-3-¹⁴C en 0,1% fucosterol (B 11-13) en 2 weken met 0,1% sitosterol-3-¹⁴C en 0,1% cholesterol (B 14-16). Ook hier werd als blanco een kweek ingezet met 0,1% sitosterol-3-¹⁴C, doch zonder kakkerlakken (B 17). Na 6-7 weken werden de insecten te hongeren gezet en gescheiden naar nimfen, vrouwtjes en mannetjes. De sterfte onder de insecten was tijdens de proef hoog. In een enkel geval werden ook dode insecten opgewerkt (B 13 en 16). De resultaten van B 8-17 zijn opgenomen in Tabel 2 en zijn tot stand gekomen door middel van radiogaschromatografie met de Berthold reactor. In tegenstelling tot de andere tabellen zijn van cholesterol en sitosterol de percentages vermeld. Percentages kleiner dan 1%, die met deze automatische meetopstelling moeilijk te schatten zijn, werden buiten beschouwing gelaten.

Periplaneta americana

Van aseptische *Periplaneta americana* werden 5 nimfen en 1 vrouwtje gedurende 3 dagen te hongeren gezet, waarna ze elk 25 mg sterolvrij dieet plus 0,3% sitosterol-3-¹⁴C (0,9 μ Ci) kregen toegediend.

Nadat dit radioactief voedsel was opgegeten, kregen de kakkerlakken nog gelegenheid om van sterolvrij dieet te eten. Van deze insecten werden de maagdarmkanalen onderzocht. Het resultaat is weergegeven in Tabel 3. Bij deze kortdurende proeven is de grootste piek die van sitosterol.

Eurycotis floridana

Van aseptische *Eurycotis floridana* werden nimfen en vrouwtjes gedurende 3 dagen te hongeren gezet, waarna ze elk 25 mg sterolvrij dieet plus 0,1% β -sitosterol-3- ^{14}C (0,3 μCi) kregen toegediend. De meeste insecten aten dit radioactief dieet binnen 1 dag op. Enkele nimfen vervelden echter tijdens de proef tot volwassenen en aten dit dieet op in 2 tot 10 dagen. Nadat het radioactief dieet op was, kregen de insecten tenslotte sterolvrij dieet, waarvoor ze 2 dagen de gelegenheid kregen om van te eten. Van de kakkerlakken werden maagdarmkanaal en voortplantingsorganen ontleed. De resultaten van de analyse zijn samengevat in Tabel 4.

	B1 n		B2 v		B3 m		B4 n		B5 v		B6 m		B7 bl.	
	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm
1														
2														
	2,29	0,7												
3									2,92	0,2				
4		C	H	O	L	E	S	T	E	R	O	L		
	3,92	100	3,96	100	3,96	100	3,91	100	3,94	100	3,93	100	3,91	0,3
5														
	5,24	0,3			5,21	0,2	5,50	0,4	5,57	0,4			5,3	0,5
6					5,78	0,2								
7			S	I	T	O	S	T	E	R	O	L		
	6,64	3,6	6,73	5,0	6,73	3,3	6,67	3,8	6,72	3,4	6,70	3,8	6,74	100
8														
	7,91	0,3	7,82	0,5	8,00	0,2	7,90	0,2	7,93	0,2	7,95	0,3		
9														
10														
	10,39	0,2												
11														

TABEL 1 Radioactieve sterolinhoud van *Blattella germanica* r
toediening van β -sitosterol-3- ^{14}C (n=nimfen,
v=vrouwjes, m=mannetjes, rrt=relatieve retentietijd
cpm=counts per minute).

B	sitosterol- ¹⁴ C			sitosterol- ¹⁴ C + fucosterol			sitosterol- ¹⁴ C + cholesterol			blanco
	8 n	9 v	10 m	11 v	12 n	13 r	14 v	15 m	16 r	17 bl
cholesterol	95	98	96	86	95	88	96	92	72	-
sitosterol	5	2	4	14	5	12	4	8	28	100

TABEL 2 Radioactieve sterolinhoud van *Blattella germanica* na toediening van β -sitosterol-3-¹⁴C en fucosterol of cholesterol (n=nimfen, v=vrouwtjes, m=mannetjes, r=rest).

	P1 n MDK		P2 n MDK		P3 n MDK		P4 n MDK		P5 v MDK		P6 n MDK	
	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm
1											1,0	0,1
2												
3												
4	C	H	O	L	E	S	T	E	R	O	L	
	3,81	100	3,81	312	3,87	40,9	3,85	17,8	3,84	68,7	3,85	17,7
5												
	5,19	2,6			5,29	2,6	5,14	1,3	5,18	2,0	5,45	2,7
6		S	I	T	O	S	T	E	R	O	L	
	6,46	100	6,54	100	6,53	100	6,53	100	6,50	100	6,81	100
7												
8	7,57	2,4			7,93	1,2	7,74	2,1	7,68	2,3	7,82	1,3
9					8,93	1,0						
10					10,25	1,1	10,06	0,6				
11											10,77	0,3

TABEL 3 Radioactieve sterolinhoud van *Periplaneta americana* na toediening van β -sitosterol-3- ^{14}C (n=nimfen, v=vrouwjes, rrt=relatieve retentietijd, cpm=counts per minute, MDK=maagdarmkanaal).

	E 1 v MDK		E 2 v MDK		E 3 n MDK		E 4 n MDK		E 5 n MDK		E 6 n → v MDK		E 7 n → m MDK		E 8 n → m MDK		E 9 v VPO		E 10 m VPO	
	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm	rrt	cpm
1																				
2																				
3							2,41	0,3			2,37	0,7							2,85	0,4
4	3,84	23,7	3,93	30,6	3,85	64,8	3,87	34,6	3,86	37,5	3,94	34,1	3,86	53,8	3,84	49,9	3,85	78,4	3,84	68,9
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				

TABEL 4 Radioactieve sterolinhoud van *Eurycotis floridana* na toediening van β -sitosterol-3- ^{14}C (n=nimfen, v=vrouwjes, m=mannetjes, MDK=maagdarmkanaal, VPO=voortplantingsorgaan, rrt=relatieve retentietijd, cpm=counts per minute).

Discussie

Bij de langdurende proeven met *Blattella germanica* wordt in de eerste plaats radioactief cholesterol gevonden en slechts weinig onomgezet sitosterol. Daarnaast vinden we meerdere andere radioactieve omzettingsproducten van sitosterol in de orde van grootte van 0,2 - 0,7%. Vooral de aanwezigheid in alle insekten van een stof met dezelfde relatieve retentietijd (7,90) als die van $\Delta^{24(28)}$ -sitosterol is duidelijk. Deze metaboliet van sitosterol-3- ^{14}C werd door ons ook gevonden bij de proeven met *Periplaneta americana* en *Eurycotis floridana*. Deze resultaten vullen die van Ritter ⁴ met *Eurycotis floridana* aan, waarbij aanwijzingen werden gevonden voor de omzetting van sitosterol in fucosterol, en die van Svoboda en zijn medewerkers ⁵ en van Allais en Barbier ⁶, die onlangs fucosterol als omzettingsproduct van β -sitosterol vonden in resp. de tabakspijlstaart *Manduca sexta* Johansson en de sprinkhaan *Locusta migratoria* L. $\Delta^{24(28)}$ -sitosterol wordt verondersteld intermediair te zijn bij de biosynthese van sitosterol in planten ⁷. Dit is ook het geval met het in deel V beschreven desmosterol. De gevonden omzettingsproducten suggereren daardoor, dat de dealkylering van sitosterol in insekten, althans gedeeltelijk, zou kunnen verlopen langs de omgekeerde weg van de alkylering bij de biosynthese van sitosterol in planten. Het piekje in de blanco B 7 bij rrt = 5,3 is dat van campesterol, dat als geringe onzuiverheid in het gebruikte sitosterol-3- ^{14}C voorkomt, terwijl het piekje bij rrt = 3,9 zeer waarschijnlijk cholesterol is, dat nog van de gaschromatografiekolom kwam na de relatief grote hoeveelheden cholesterol, die op de kolom waren geweest. Aangezien insekten in het algemeen in staat zijn om C28- en C29-sterolen te dealkyleren ⁴, is het niet verbazingwekkend het campesterolpiekje minder of niet meer terug te vinden in de sterolinhoud van de insekten. Uit de resultaten van B 8-17 blijkt dat de invloed van fucosterol en cholesterol

op de dealkylering van sitosterol van geen betekenis is. Er worden geen intermediären op deze wijze opgehoopt. Interessant is, dat zelfs de aanwezigheid van cholesterol de omzetting van sitosterol in cholesterol niet minder doet zijn. B 16 bevatte nog slechts dode insekten, hetgeen de reden kan zijn van de relatief grote hoeveelheid onomgezet sitosterol.

Bij de kortdurende proeven met *Periplaneta americana* en *Eurycotis floridana* is sitosterol het meest voorkomende sterol in de insekten. Naast cholesterol komen ook hier weer meerdere radioactieve omzettingsproducten voor en wel in hoeveelheden van ongeveer 2%. Deze hoeveelheden zijn echter veel te gering voor structuuridentificatie.

Literatuurverwijzingen

1. R.B. Clayton
Nature 184, 1166 (1959)
2. J.L. Noland
Arch. Biochem. Biophys. 48, 370 (1954)
3. A.J. Clark
Thesis Harvard, p. 5 (1958)
4. F.J. Ritter and W.H.J.M. Wientjens
TNO-Nieuws 22, 381 (1967)
5. J.A. Svoboda, M.J. Thompson and W.E. Robbins
Nature New Biology 230, 57 (1971)
6. J.P. Allais et M. Barbier
Experientia 27, 506 (1971)
7. E. Lederer
Quart. Rev. 23, 453 (1969)

The Influence of Several Sterols on the Conversion of β -Sitosterol into Cholesterol in the Cockroach

Although sterols are important for them, insects do not possess the enzymic system necessary for the synthesis of sterols from acetate or mevalonate. Therefore, sterols are indispensable components in the insects' food. Carnivorous insects obtain cholesterol from their food and they are able to convert it into the moulting hormones α - and β -ecdysone. Plant-eating insects obtain β -sitosterol from their food and they can convert it into cholesterol, which implies a dealkylation of the ethyl group containing C-28 and C-29.

For strictly phytophagous insects, whose natural source of nutrition does not contain cholesterol, this ability to dealkylate is of vital importance. Inhibition of this reaction, resulting in a depletion of cholesterol, will disturb their development¹⁻³. Since knowledge in this field may help in developing selective ways of insect control, we decided to try to learn more about this dealkylation⁴.

We administered β -sitosterol-3-¹⁴C⁵, added to a sterolfree diet^{6,7}, to 3 species of aseptic⁸ cockroaches, viz. *Blattella germanica* L., *Periplaneta americana* L. and *Eurycotis floridana* Walker. Although the cockroach is not a strictly phytophagous insect, the said dealkylation can also be studied in this omnivorous test animal. Besides cholesterol, several radioactive minor metabolites were found. One of these had the same gas-chromatographic behaviour as $\Delta^{24(28)}$ -sitosterol. However, the amounts of the metabolites were too small for elucidation of their structures.

Verondersteld wordt, dat een kakerlak op een sterol vrij dieet wel van wat betreft de dealkylering niet met zo ver bedragen als een fytophaag insect. Op welke gevonden. Deze dealkylering is immers van kakerlakken niet van vitaal belang.

The present paper reports on the influence of a variety of sterols with unnatural side-chains on the conversion of sitosterol into cholesterol. 10 mg of sterol-free diet^{6,7}, to which 10 µg of β-sitosterol-3-¹⁴C (0.12 µCi; spec. act. 5 mCi/mM)⁵ and 1, 10 or 100 µg of the potential antimetabolite⁹ had been added, was administered to 6 nymphs of *Blattella germanica* per test, after they had been starved for 3 days. This radioactive diet was eaten within 1 or 2 days. Next, the insects obtained 200 mg of sterol-free diet, were killed after 2 days and extracted with hot ethanol and acetone. The extract was saponified with 10% (w/v) KOH in 80% (v/v) ethanol at room temperature overnight. The reaction mixture was separated by means of centrifugal column chromatography¹⁰. Sorbent: Al₂O₃H (for thin-layer chromatography, Merck); speed: 1900 g; fraction 1:25 ml benzene, fraction 2:25 ml ethyl acetate-benzene (10 + 90) and fraction 3: ethyl acetate-benzene (30 + 70).

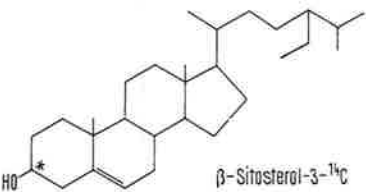
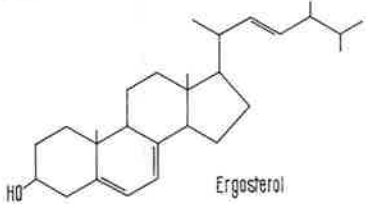
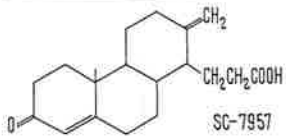
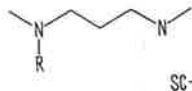
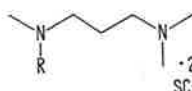
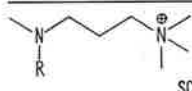
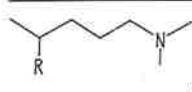
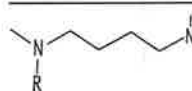
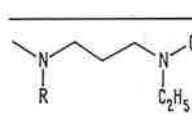
Radioactivity measurements were carried out by means of a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer, model 3380. Fractions 2 which contained the free sterols, were analyzed by means of radio gaschromatography¹¹ with a flow reactor RGC 170 (Laboratory Prof. Dr. Berthold, Wildbad, Germany, and Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen, Germany). Stationary phase 3% OV-17 on Chromosorb G.AW.DMCS; argon ionization detection; column temperature 250 °C; reactor filling CuO; reactor temperature 680 °C; flow-proportional counter 80 ml. In some cases also 5% DEGS on Chromosorb W.AW was used with discontinuous radioactivity measurements of methyl ether derivatives¹².

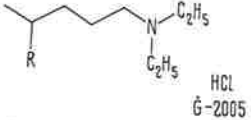
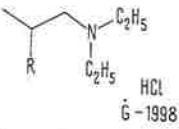
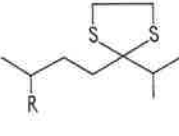
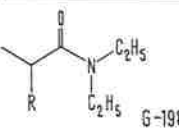
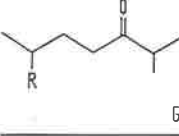
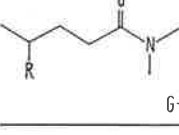
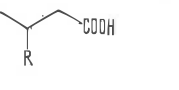
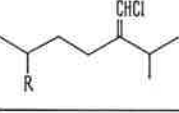
The results are summarized in the Table. The sum of these values was put at 100. Values of radioactive metabolites of less than 3% were not taken into account. The figures in the second column show the ratio of radioactive sitosterol to sterol under investigation, as administered.

Administration of sitosterol alone gave an average ratio of 94 to 6 for cholesterol to sitosterol in the insects. SC-7957 and ergosterol were used as a sort of blank in the same concentrations as those of the potential antimetabolites, and only ergosterol with the highest concentration gave a slight decrease of cholesterol and a slight increase of sitosterol. With use of SC-13775, the cholesterol over sitosterol ratio was not only somewhat smaller, but, moreover, 8% of a radioactive compound, A, was found. SC-12937 had no influence, but when, as in G-1997, carbon atom 20 was not replaced by a nitrogen atom, there was an evident influence: a decrease of cholesterol, an increase of sitosterol and the presence of radioactive A, also with the middle concentration. Also SC-13817, with a side-chain which is one C-atom longer than those of the previous sterols, did have an evident influence. With SC-13058 in the highest concentration a trace of A was found. Again, when carbon atom 20 was not replaced by nitrogen (G-2005), an accumulation of A occurred. The same results were obtained with the free nitrogen compound. Of the 3 anti-metabolites with a keto function in the side-chain, only G-1996 caused accumulation of A in the cockroaches.

The gas chromatographic behaviour of compound A is the same as that of desmosterol. Svoboda et al.^{2,13} found desmosterol as an intermediate of the conversion of β -sitosterol into cholesterol in the tobacco hornworm under influence of triparanol and 22,25-diazacholesterol. Desmosterol was also found by Svoboda et al.³ as a conversion product of several phytosterols in the tobacco hornworm under influence of 20,25-diazacholesterol and as conversion product of sitosterol under influence of 3 β -hydroxy-24-norchol-5-en-23-oic acid and 3 β -hydroxy-23,24-dinorchol-5-en-22-oic acid¹⁴. We also tested these 2 compounds with the cockroaches, but, performing the usual tests, did not find other

Relative composition of the sterols in the cockroaches, to which β -sitosterol-3- ^{14}C plus several sterols with unnatural side-chains in different concentrations were administered

	C	S	A	B
 β -Sitosterol-3- ^{14}C	94	6		
 Ergosterol	10:1 1:1 1:10	97 96 84	3 4 16	
 SC-7957	10:1 1:1 1:10	95 92 93	5 8 7	
 SC-13775	10:1 1:1 1:10	90 93 75	10 7 17	8
 • 2 HCl SC-12937	10:1 1:1 1:10	91 91 91	9 9 9	
 J ⁻ SC-13102	10:1 1:1 1:10	90 86 83	10 14 17	
 G-1997	10:1 1:1 1:10	96 68 64	4 23 31	9 5
 SC-13817	10:1 1:1 1:10	94 76 85	6 16 9	8 6
 2 HCl SC-13058	10:1 1:1 1:10	93 90 92	7 10 8	

	C	S	A	B
	10:1 1:1 1:10	89 83 71	11 14 22	 3 7
	10:1 1:1 1:10	95 96 94	5 4 6	
	10:1 1:1 1:10	94 84 79	6 16 21	
	10:1 1:1 1:10	92 92 90	8 8 10	
	10:1 1:1 1:10	93 96 85	7 4 15	
	10:1 1:1 1:10	90 84 75	10 16 15	10
	100:1 10:1 1:1 1:10 1:100	95 96 92 95 93	5 4 8 5 7	
	100:1 10:1 1:1 1:10 1:100	95 90 95 97 93	5 10 5 3 7	
	10:1 1:1 1:10	89 91 67	11 9 26	7

R = cholesterol nucleus. C, S, A and B are respectively: radioactive cholesterol, sitosterol and 2 conversion products of β -sitosterol-3- ^{14}C , as found in the insects. The figures in the second column show the ratio of radioactive sitosterol to sterol under vestigation, as administered.

conversion products of sitosterol than cholesterol. Only when we worked with some hundreds of cockroaches, about 2 or 3% of compound A could be detected.

Administration of 28-chloro- $\Delta^{5,24(28)}$ -ergostadienol in the highest concentration resulted not only in a change of the cholesterol over sitosterol ratio, but also in the presence of 7% of radioactive metabolite B, which has another gas-chromatographic behaviour on OV-17 and DEGS than metabolite A. This would suggest a possibility to inhibit, in a more selective way, the dealkylation. Inhibition of the dealkylation by a method which involves an inhibition of the conversion of desmosterol into cholesterol is not selective, since this conversion is also important in vertebrates. However, continuous administration of the chloro compound in long-term experiments did not cause any disturbance in the development of the cockroaches¹⁵.

Zusammenfassung. Die Umwandlung von β -Sitosterol in Cholesterol in der Schabe *Blattella germanica* L. wird durch bestimmte Sterine mit unnatürlichen Seitenketten gehemmt. Anhäufung von zwei verschiedenen Metaboliten wurde festgestellt.

1. N.W. EARLE, E.N. LAMBREMONT, M.L. BURKS, B.H. SLATTEN and A.F. BENNETT, J. econ. Ent. 60, 291 (1967).
2. J.A. SVOBODA and W.E. ROBBINS, Science 156, 1637 (1967).
3. J.A. SVOBODA and W.E. ROBBINS, Experientia 24, 1131 (1968).
4. F.J. RITTER and W.H.J.M. WIENTJENS, T.N.O.-Nieuws 22, 381 (1967).
5. P.Ph.H.L. OTTO, A.C. BESEMER and W.H.J.M. WIENTJENS, J. Labelled Comds 6, 111 (1970).
6. J.L. NOLAND, Arch. Biochem. Biophys. 48, 370 (1954).
7. A.J. CLARK, Thesis Harvard (1958), p. 5.
8. R.B. CLAYTON, Nature 184, 1166 (1959).
9. 3 β -Hydroxy-24-norchol-5-en-23-oic acid was a gift of Dr. J.A. SVOBODA, Insect Physiology Laboratory, Entomology Research Division, ARS, USDA, Beltsville, Maryland, USA. The sterols encoded with SC were kindly supplied by G.D. Searle & Co., Chicago, Illinois, USA, and those encoded with G by Laboratory

of Organic Chemistry, State University Groningen, Netherlands. 28-Chloro- $\Delta^{5,24(28)}$ -ergostadienol was synthesized by Dr. P.Ph. H.L. OTTO, Mr. A.C. BESEMER AND Mr. Th.J. VAN VEEN (Central Laboratory T.N.O., Delft, Netherlands) from 24-keto cholesterol, which was a gift of Dr. B. Riegel, G.D. Searle & Co., 3 β -Hydroxy-23,24-dinorchol-5-en-22-oic acid was from Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, USA, and ergosterol from Chemed Inc., Odenton, Maryland, USA.

10. J.W.A. MEYER, H.I.A. EID and P.A. VERDUIN, *Analyt. Chem.* 236, 426 (1968).
11. R. TYKVA and H. SIMON, *Chromatographia* 2, 5 (1969).
12. R.B. CLAYTON, *Biochemistry* 1, 357 (1962).
13. J.A. SVOBODA, M.J. THOMPSON and W.E. ROBBINS, *Life Sci.* 6, 395 (1967).
14. J.A. SVOBODA, M.J. THOMPSON and W.E. ROBBINS, *Steroids* 12, 559 (1968).
15. This work was supported by a grant from the National Council for Agricultural Research T.N.O.

W.H.J.M. WIENTJENS, T. VAN DER MAREL
and E.P. BENNETT

Central Laboratory T.N.O., P.O.B. 217,
Delft (Netherlands), 22 October 1970.

SAMENVATTING

Er bestaat een toenemende behoefte aan selectieve bestrijdingsmiddelen van insecten. Een gebied dat mogelijkheden hiertoe zou kunnen bieden is dat van het sterolmetabolisme. Met name de omzetting van β -sitosterol in cholesterol is voor strikt planten etende insecten, die geen cholesterol in hun voedsel vinden, van vitaal belang en een blokkering van deze reactie zal de ontwikkeling van deze insecten verstoren. Het doel van het beschreven onderzoek is een bestudering van deze dealkyleringsreactie. β -Sitosterol, dat op de 3-plaats radioactief gemerkt is met ^{14}C , werd gesynthetiseerd. Aangezien commercieel β -sitosterol door de grote hoeveelheden campesterol als onzuiverheid niet geschikt is als uitgangsstof, werd stigmasterol als uitgangsstof van deze synthese gebruikt. Bij de analyse van β -sitosterol-3- ^{14}C werd o.a. gebruik gemaakt van gaschromatografie, massaspectrometrie en dampgeprogrammeerde dunnelaagchromatografie. Het in de kern gemerkte sitosterol werd via het dieet toegediend aan drie verschillende soorten kakkerlakken. Naast radioactief cholesterol kon de aanwezigheid van meerdere omzettingsproducten in uiterst kleine hoeveelheden worden aangetoond. Bij zowel *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* als *Eurycotis floridana* kwam een radioactief omzettingsproduct voor met hetzelfde gaschromatografische gedrag als dat van $\Delta^{24(28)}$ -sitosterol. Zowel deze stof als het hieronder genoemde desmosterol

zijn tussenproducten bij de biosynthese van β -sitosterol in planten. Dit suggereert, dat de dealkylering van sitosterol in insecten, althans gedeeltelijk, zou kunnen verlopen langs de omgekeerde weg van de alkylering bij de biosynthese van sitosterol in planten, zoals deze beschreven is in de inleiding. Een andere mogelijkheid van omzetting van sitosterol in cholesterol is een oxydatieve dealkylering. Om deze mogelijkheid te onderzoeken werd getracht met behulp van kiemende erwten β -sitosterol-28,29- ^{14}C te synthetiseren. De specifieke radioactiviteit van het verkregen sitosterol bleek echter te laag om bruikbaar te zijn voor insectenproeven. Van steroiden met een onnatuurlijke zijstaart werd de invloed als potentiële antimetaboliëten op de omzetting van β -sitosterol in cholesterol nagegaan. Steroiden, welke stikstof-, zuurstof-, chloor- of zwavelatomen in de zijstaart bevatten, werden tezamen met sitosterol-3- ^{14}C toegediend aan *Blattella germanica*. Verschillende van de sterolanaloga bleken de omzetting van β -sitosterol in cholesterol te remmen. Bij toepassing van stikstofanaloga werd naast afname van de vorming van cholesterol tevens ophoping gevonden van een radioactief omzettingsproduct, dat zich gaschromatografisch gedroeg als desmosterol. Bij toediening van 28-Cl- $\Delta^{5,24(28)}$ -ergostadienol werd ophoping gevonden van een ander radioactief omzettingsproduct van sitosterol. De remming van de omzetting van β -sitosterol in cholesterol was echter in geen van de gevallen zodanig, dat de ontwikkeling van de insecten kon worden verstoord.

SUMMARY

There is a growing interest with regard to selective insecticides and, in this context, results may be expected from investigations on the sterol metabolism. Especially for strictly phytophagous insects, whose sources of nutrition do not contain cholesterol, the conversion of β -sitosterol into cholesterol is of vital importance. Blocking of this reaction will disturb their development. The aim of the investigations described in this thesis is a study of this dealkylation reaction.

β -Sitosterol, which is labelled with ^{14}C , was synthesized. Since commercial β -sitosterol contains large quantities of campesterol, stigmasterol was used as a starting material. The chemical as well as the radiochemical purity of the β -sitosterol-3- ^{14}C thus synthesized was determined, inter alia by means of gas-liquid chromatography, mass spectrometry and vapour-programmed thin-layer chromatography. The sitosterol-3- ^{14}C was added to a sterol-free diet and administered to three species of cockroach. Besides radioactive cholesterol, small amounts of several other metabolites were found. *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, as well as *Eurycotis floridana*, were noted to contain a radioactive conversion product with the same gas-chromatographic behaviour as Δ^{24} (28)-sitosterol. Both this compound and desmosterol, which will be mentioned below, are intermediates of the biosynthesis of β -sitosterol in plants, which is shown on page 9. This suggests

that, at least partially, the dealkylation of sitosterol in insects could be the reverse of the alkylation during the biosynthesis of sitosterol in plants.

Another way of conversion of sitosterol into cholesterol, in insects, may consist of an oxidative dealkylation. To investigate this latter possibility we tried to obtain β -sitosterol-28,29- ^{14}C using germinating peas. However, the specific radioactivity of the sitosterol thus obtained was too low for being useful in experiments with insects.

We next investigated the influence of a variety of steroids with unnatural side-chains, as potential antimetabolites, on the conversion of β -sitosterol into cholesterol. A number of steroids whose side-chains contain nitrogen, oxygen, chlorine or sulphur atoms, were administered to *Blattella germanica*, together with sitosterol-3- ^{14}C . Several of these sterol analogs were found to inhibit the conversion of β -sitosterol into cholesterol in this cockroach. Using nitrogen compounds, we found, besides a decrease of cholesterol, an accumulation of a radioactive conversion product with the same gas-chromatographic behaviour as that of desmosterol. Administration of 28-Cl- $\Delta^{5,24(28)}$ -ergostadienol caused an accumulation of another radioactive metabolite of sitosterol. However, the inhibition of the conversion of β -sitosterol into cholesterol was never observed to such an extent that the development of the insects was disturbed.

Dit proefschrift werd bewerkt op het Centraal Laboratorium TNO te Delft.

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan allen die aan de totstandkoming van dit proefschrift hebben bijgedragen.

Mijn erkentelijkheid wil ik betuigen aan de Nijverheidsorganisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek en in het bijzonder aan Dr. A. Schors, directeur van het Centraal Laboratorium TNO, voor de faciliteiten die mij verleend zijn bij de voorbereiding van dit proefschrift.

Mijn dank gaat uit naar Dr. J.H. Parmentier, hoofd van de Afdeling Organische Chemie, voor zijn stimulerende belangstelling en aanmoediging. Ik dank Dr. F.J. Ritter, leider van de Werkgroep Biochemie van de Afdeling Organische Chemie, voor de waardevolle adviezen en discussies.

Ook op deze plaats wil ik mijn dank betuigen aan de mede-auteurs van de in dit proefschrift opgenomen artikelen en de aldaar vermelde medewerkers voor hun belangrijke bijdragen en de prettige samenwerking.

Speciaal wil ik hier Mej. T. van der Marel en de Heer E.P. Bennett danken voor hun bekwame assistentie bij de in deel IV beschreven experimenten en Mevr. A.M. van Loon-de Liema bij de in deel I beschreven experimenten.

De leden van de Werkgroep Biochemie van de Afdeling Organische Chemie wil ik gaarne bedanken voor de prettige werksfeer en samenwerking.

De Heer J.B.A. Nijssen heeft de Engelse teksten gecorrigeerd. Mej. A.A.M. Post heeft het manuscript getypt.

Dit onderzoek werd gedeeltelijk gesteund door de Werkgroep Geïntegreerde Bestrijding van Plagen van de Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek TNO.

De directies van de desbetreffende tijdschriften ben ik erkentelijk voor de verleende toestemming de artikelen hier opnieuw af te drukken.

Op verzoek van de faculteit der Wis- en Natuurkunde volgt hier een kort overzicht van mijn academische studie.

Na het behalen van het eindexamen gymnasium β aan het St.-Aloysiuscollege te Den Haag in juni 1955, werd in september van dat jaar een begin gemaakt met de studie in de scheikunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden. In december 1960 werd het kandidaats-examen afgelegd. De studie werd voortgezet onder leiding van de hoogleraren Dr. E. Havinga (Organische Chemie), Dr. H. Veldstra (Biochemie) en Dr. C.J.F. Böttcher (Fysische Chemie). Het doctoraal examen werd in januari 1964 afgelegd. Vanaf 1960 vervulde ik een assistentschap op het Laboratorium voor Organische Chemie, terwijl in 1964 een steroidenonderzoek werd verricht met steun van de N.V. Organon. Tevens was ik voor een beperkt aantal uren als leraar verbonden aan het Edith-Steinlyceum te Den Haag. In januari 1965 trad ik in dienst van de Nijverheidsorganisatie TNO, waar ik thans werkzaam ben bij de Afdeling Organische Chemie van het Centraal Laboratorium TNO.

