Thesis Title	Development of Some Cyproterone Acetate Production Steps by Biotransformation and Chemical Processes from Solasodine Precursor Extracted from Kangaroo Apple (*Solanum laciniatum* Ait.)
Author	Mr. Pattana Sripalakit
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi — Chairperson Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi — Member Assoc. Prof. Dr. Duang Buddhasukh — Member Dr. Roland Maier — Member

ABSTRACT

A simple extraction and isolation process of solasodine, a natural precursor to synthesize steroidal drugs, from fruits and leaves of *Solanum laciniatum* Ait. was developed. The optimum concentration of 2-propanol for the extraction of crude glycosides was 70% (v/v). The suitable hydrolysis condition of solasodine from crude glycosides was by 1 N hydrochloric acid in 2-propanol. Pure solasodine from both fruits and leaves of *S. laciniatum* was obtained without any requirement of column chromatography. The yield of pure solasodine were 0.34±0.04% and 0.44±0.16% of the dry weight from fruits and leaves, respectively. The maximum yield of 37.0% of pure 16-dehydropregnenolone acetate was obtained by using tetrabutylammonium hydrogen sulfate as a phase-transfer catalyst and potassium dichromate as an oxidizing agent. This indicated the novel economic with environmental friendly method of solasodine extraction and synthesis of 16-dehydropregnenolone acetate from solasodine by phase-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

transfer catalysis. Factors affecting the aqueous biotransformation of chlormadinone acetate to delmadinone acetate by freely suspended cells of *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 and *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 were investigated. The effects of exogenous electron carrier (menadione), cosolvent (dimethylformamide), steroid inducer (hydrocortisone), surfactant (Tween 80) and alternative carbon source (D-(+)-glucose), on the production yield of delmadinone acetate were identified. The biotransformations were performed in shaken flasks at 25±2°C for 72 h. The optimal conditions for the biotransformation with *A. simplex* were 0.25 mM chlormadinone acetate, 5% DMF, 0.41 mM hydrocortsione and 0.75% (w/v) Tween 80. With *B. sphaericus*, the optimal conditions were 0.6 mM menadione, 0.12 mM chlormadione acetate, 5% DMF, 0.41 mM hydrocortsione and 0.25 g dm^{-3} D-(+)-glucose. Under optimal conditions, the product yields were 28.7% and 36.9% for *A. simplex and B. sphaericus* biotransformations, respectively. Attempts to microbial transformation of chlormadinone acetate to delmadinone acetate was investigated using free and immobilized cells of *A. simplex* and *B. sphaericus* in liquid-liquid biphasic system and a liposomal medium. For liquid-liquid biphasic system, *n*-decane, *n*-octanol, chloroform and butyl acetate, were used as organic solvents. In liposomal medium, chlormadinone acetate was entrapped in liposomes composed of phosphatidylcholine and cholesterol. For both immobilized and free suspension biocatalysts, yields were higher in the aqueous medium compared to in liquid-liquid biphasic media. In all cases, the highest yields were obtained in the aqueous system. For the aqueous medium, a product yield of ~48% was attained at 3 h using the free suspension *A. simplex* cells. The aqueous medium afforded ~47% product yield at 48 h when freely suspended *B. sphaericus* was used. The process of 16-dehydropregnenolone acetate synthesis from solasodine extracted from *S. laciniatum* using phase-transfer catalysis and the substitution of chemical synthesis by microbial process for transforming chlormadinone acetate to delmadinone acetate can be alternative pathways for production of cyproterone acetate, a potentially anti-androgenic agent which may lead to a high-yield and low-cost product.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาการผลิตไซโพรเทอโรนอะซิเตทบางขั้นตอนโดยกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันและกระบวนการเคมีจาก สารตั้งต้นโซลาโซดีนที่สกัดจาก Kangaroo Apple (*Solanum laciniatum* Ait.)
ผู้เขียน	นายพัฒนา ศรีพลากิจ
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	รศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	กรรมการ
	รศ. ดร. ด้วง พุธศุกร์	กรรมการ
	Dr. Roland Maier	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้พัฒนากระบวนการอย่างง่ายในการสกัดและการแยกโซลาโซดีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นธรรมชาติที่ใช้ในการสังเคราะห์ยาสเตียรอยด์จากผลและใบของพืช *Solanum laciniatum* Ait. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2-โพรพานอลในการสกัดไกลโคไซด์อย่างหยาบคือ 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์โซลาโซดีนจากไกลโคไซด์อย่างหยาบคือกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ใน 2-โพรพานอล จะได้โซลาโซดีนบริสุทธิ์จากทั้งผลและใบของพืช *S. laciniatum* โดยไม่จำเป็นต้องใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ปริมาณโซลาโซดีนบริสุทธิ์ที่ได้คือ 0.34 ±0.04 และ 0.44±0.16 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักผลและใบแห้งตามลำดับ ปริมาณสูงสุดของ 16-ดีไฮโดรเพรกนิโนโลนอะซิเตทบริสุทธิ์คือ 37 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เตตราบิวทิลแอมโมเนียมไฮโดรเจนซัลเฟท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และโปแตสเซียมไดโครเมทเป็นสารออกซิไดซ์ จากผลการทดลองจะได้กระบวนการใหม่ในการสกัดโซลาโซดีนและการสังเคราะห์ 16-ดีไฮโดรเพรกนิโนโลนอะซิเตทจากโซลาโซดีน โดยใช้เทคนิคตัวเร่งปฏิกิริยาเฟสทรานส์เฟอร์ที่ประหยัดซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของคลอร์มาไดโนนอะซิเตทไปเป็นเดลมาไดโนนอะซิเตทในน้ำโดยใช้เซลล์แขวนลอยอิสระของ *Arthrobacter simplex*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ATCC 6946 และ *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 โดยศึกษาผลของตัวนำส่งอิเล็คตรอน (มีนาไดโอน) ตัวทำละลายร่วม (ไดเมทิลฟอร์มาไมด์) ตัวเหนี่ยวนำสเตียรอยด์ (ไฮโดรคอร์ติโซน) เซอร์แฟกแตนท์ (ทวีน 80) และแหล่งคาร์บอน (D-(+)-กลูโคส) ต่อการผลิตเดลมาไดโนนอะซิเตท ทำการทดลองไบโอทรานส์ฟอร์เมชันในขวดฟลาส์กเขย่าที่ 25±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ *A. simplex* คือ คลอร์มาไดโนนอะซิเตท 0.25 มิลลิโมล ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรคอร์ติโซน 0.41 มิลลิโมล และ ทวีน 80 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สำหรับ *B. sphaericus* สภาวะที่เหมาะสมคือ มีนาไดโอน 0.6 มิลลิโมล คลอร์มาไดโนนอะซิเตท 0.12 มิลลิโมล ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรคอร์ติโซน 0.41 มิลลิโมล และ D-(+)-กลูโคส 0.25 กรัมต่อลิตร จะได้ผลิตภัณฑ์ 28.7 และ 36.9 เปอร์เซ็นต์ ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ *A. simplex* และ *B. sphaericus* ตามลำดับ ในการศึกษาการเปลี่ยนของคลอร์มาไดโนนอะซิเตทไปเป็นเดลมาไดโนนอะซิเตทด้วยแบคทีเรีย โดยการใช้เซลล์อิสระและตรึงของ *A. simplex* และ *B. sphaericus* ในระบบของเหลวสองวัฏภาคและไลโปโซม สำหรับระบบของเหลวสองวัฏภาคใช้ เอ็น-ดีแคน เอ็น-ออกทานอล คลอโรฟอร์ม และบิวทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับไลโปโซม คลอร์มาไดโนนอะซิเตทจะถูกกักในไลโปโซมที่ประกอบด้วยฟอสฟาทิดิลโคลีนและคลอเลสเตอรอล เมื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพบว่าในระบบน้ำจะให้ผลิตภัณฑ์มากกว่าในระบบของเหลวสองวัฏภาคทั้งตัวเร่งปฏิริยาที่เป็นเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ ในทุกการทดลองปริมาณผลิตภัณฑ์มีค่าสูงสุดในระบบน้ำ โดยปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มีประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 3 ชั่วโมง และ 47 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระ *A. simplex* และ *B. sphaericus* ตามลำดับ กระบวนการสังเคราะห์ 16-ดีไฮโดรเพรกนิโนโลนอะซิเตท จากโซลาโซดีนที่สกัดจาก *S. laciniatum* โดยตัวเร่งปฏิกิริยาเฟสทรานส์เฟอร์ และการแทนที่การสังเคราะห์ทางเคมีด้วยกระบวนการของแบคทีเรียสำหรับการเปลี่ยนคลอร์มาไดโนนอะซิเตทไปเป็นเดลมาไดโนนอะซิเตท สามารถเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตไซโปรเทอโรนอะซิเตทซึ่งเป็นสารต้านแอนโดรเจนที่มีประสิทธิภาพสูง อาจนำไปสู่การได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณสูงและราคาต้นทุนถูกลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved