

TÜBİTAK

2007-537

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

94745

**Development of a method for
glycoalkaloid analysis of eggplant
(Patlıcanda, glycoalkaloid analizi için
metot geliştirilmesi)**

PROJE NO: TBAG-2364 (103T139)

**Yrd. Doç. Dr. Ritchie EANES
Filiz PARLAYAN
Neslihan TEK
Yrd. Doç. Yurdanur AKGÜL**

**Eylül 2007
İZMİR**

Önsöz

Glycoalkaloidler Solanum türlerinde bulunurlar, ve biyologların, kimyagerlerin, ilaç endüstrinin ve tıp alanında çalışan araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Geleneksel olarak glycoalkaloidler zehirli kimyasallar olarak düşünülmesine rağmen, son zamanlarda araştırmacılar glycoalkaloidlerin tıbbi ve sentez uygulamaları üzerinde çalışmalar yapmaktadır. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde etkin analitik ayırma ve ölçüm metodu geliştirme amacı nedeniyle ve üniversite içindeki kimya ve biyoloji bölümleri arasında gelecekteki ortak çalışmaları desteklemek için bu araştırma yapılmıştır. Patlıcan ekstraktları ile kullanılmak üzere katı hal mikroekstraksiyon olarak bilinen numune ve önderiştirme metodunun üzerinde çalışıldı.

Teşekkür

Yabancı patlıcan örneklerini sağlayan INRA Unite de Genetique & Amelioration des Fruits et Legumes (Montfavet cedex, France)'da çalışan Marie-Christine DAUNAY 'a ve solamargine standardı sağlayan Prof. Dr. Adelia Emila de Almeida (Faculdade de Ciencias Farmaceuticas-UNESP, Brazil)'ya yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Solamargine'nin sağlanamaması halinde bu standardı hazırlayıp saflandıracak olan Yrd. Doç. Yurdanur Akgülün (EGE Üniversitesi) hem bu sorumluluğu bekleyip kabul ettiği için, hem de ince tabaka kromatografideki işleri ve tavsiyeleri için teşekkür ederim. Çalışmamız sırasında bize tüm laboratuvar olanaklarını sunan ve çalışma sırasında yardımları ve cesaretlendirici tutumları ayrıca proje raporunun türkçeye çevrilmesindeki (özellikle fen fakültesindeki) yardımcı olan herkese çok teşekkür ederim. Bu projede çalışan yüksek lisans öğrencilerim Neslihan Tek, Filiz Parlayan, ve Öyküm Kırsoya çalışmaları için çok teşekkür ederim ve mevcut işlerinde başarılılar dilerim.

Son olarak, projenin yürütülmesi için gerekli olan maddi desteği sağladığı için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

R. Eanes

İçindekiler:

Özet	2
Abstract	3
1.0. Giriş	4
2.0 Patlıcanda Glycoalkaloid tayini için Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisine dayanan bir Metotun Geliştirilmesi	7
3.0 Katı Hal Mikroekstraksiyon Metoduyla Glycoalkaloid'lerin lif üzerinde türevlendirilmesi ve ekstraksiyonunun Araştırılması	15
4.0 Sonuçlar	21
5.0. Yararlanılan kaynak	22
Proje özet bilgi formu	29

Özet:

Bu çalışmada, α -solanine, α -chaconine, α -solasonine ve α -solamargine steroid glycoalkaloidleri (SGAs) ile solanidine, solasodine steroid aglikonlarının (SGAAs) ayırım ve tayininde kullanılan mevcut yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemlerinde değişiklikler yapılmıştır. Gradient elüsyon metodu ile istenilen ayırım elde edilememiş ve incelenen glycoalkaloidler ya da aglikonlar için farklı HPLC metotları geliştirilmesinin daha pratik olduğu görülmüştür. Solamargine ve chaconine maddelerinin tayini için mobil faza literatürde bulunan metotlardan farklı olarak metanol eklenmiştir. Diğer tampon çözelti türlerine kıyasla amonyum dihidrojen fosfat tampon çözeltisi daha verimli ve kullanımı ekonomiktir. Progesterone internal standard olarak kullanılmıştır. Glycoalkaloidler için en iyi ayırım 50°C kolon sıcaklığında, isokratik elüsyonla elde edilmiştir. Aglikonların ayırımı ise 50°C ya da 26°C kolon sıcaklıklarında, isokratik elüsyonla sağlanmıştır. Ayrıca pH'nın ayırma etkisi incelenmiştir. Tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve ölçüm aralığı tanımlanmıştır. Son olarak, aglikon ekstraksiyonu ve tayini için fiber üzerinde türevleme yapılarak katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve GC-MS yöntemleri incelenmiştir. Ekstraksiyon için carbowax-divinylbenzene (CW-DVB) kaplı fiber uygun bulunmuştur. Solanidine doğrudan SPME/GC-MS metodu ile tayin edilebilmesine rağmen solasodine türevleme uygunlandıktan sonra gözlenebilmiştir. Yapılan ilk nitel analizler tekrarlanabilir olmasına rağmen fiberin bozunması tam bir çalışma yapılmasına engel olmuştur. Ayrıca kolesterolün internal standard olarak kullanımı araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler:

glycoalkaloidler, solasonine, solamargine, solanine, chaconine, solasodine, solanidine, SPME, Katı Hal Mikroekstraksiyon, patlıcan, Solanum linnaeanum, Solanum melongena

Abstract:

Novel modifications were applied to high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the separation and quantitation of the steroidal glycoalkaloids (SGAs) solanine, chaconine, solamargine, and solasonine as well as the steroidal glycoalkaloid aglycones (SGAAs) solasodine and solanidine. Because attempts to develop a gradient elution HPLC method were only marginally successful and non-robust, it was deemed more practical to develop separate HPLC methods for both the SGAs and SGAAs of interest. Furthermore, a novel approach using methanol as a mobile phase modifier was still required to successfully separate solamargine and chaconine. Comparing potential mobile phase buffers, ammonium dihydrogen phosphate was chosen as the most efficient, stable, and economical. Separations were best realized isocratically at a column temperature of 50 °C for the SGAs and either 26 °C or 50 °C for the SGAAs. Progesterone was applied as an internal standard. Effects of pH were also tested. Figures of merit such as limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), and linear dynamic range are described herein. Lastly, solid-phase microextraction (SPME) using on-fiber derivatization coupled with GC-MS was investigated for extraction and analysis of these SGAAs. A carbowax divinylbenzene (CW-DVB) coated SPME fiber was the most suitable. Solanidine could be extracted and identified directly using our SPME/GC-MS method while solasodine required a derivatization step involving trimethylsilylimidazole (TMSI). Although initial attempts were qualitatively reproducible, eventual degradation to fibers precluded complete study. Cholesterol as an internal standard was investigated.

Keywords:

glycoalkaloids, solasonine, solamargine, solanine, chaconine, solasodine, solanidine, SPME, solid phase microextraction, eggplant, *Solanum linnaeanum*, *Solanum melongena*

Patlıcanda, Glycoalkaloid Analizi için Metot Geliştirilmesi

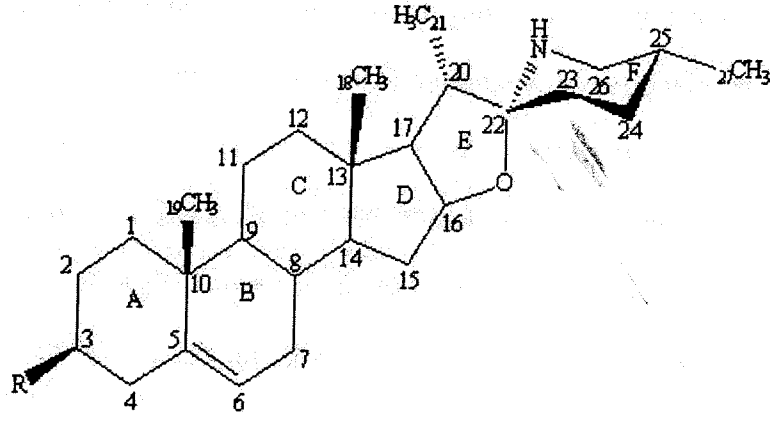
1. Giriş

Bu projenin amacı, ileride İYTE Biyoloji Bölümü ile ortaklaşa yapılacak doğal patlıcan türlerindeki glycoalkaloidlerin analizi için uygulanabilir ve etkili bir metod geliştirmektir. Literatürde, patlıcanda ilgilendiğimiz 6 glycoalkaloidin analiziyle ilgili bilgi oldukça sınırlıdır (Aubert 1989a, Aubert 1989b, Cipollini 2004).

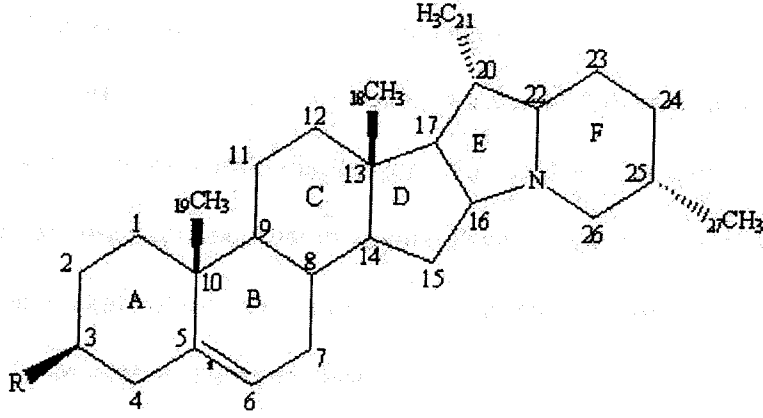
Steroid glycoalkaloidler (SGA) ve onların aglikonları (SGAA), özellikle gıda bilimi, toksikoloji, eczacılık ve temel kimya alanlarında ilgi uyandırmışlardır (Blankemeyer et al. 1998, Friedman 2004, Mensinga et al. 2005, Stobiecki et al. 2003, Weissenberg 2001). Bu alkaloid bileşikler, taze meyvenin kilosunda 200 mg'nin üzerindeki seviyelerde sindirildiği takdirde toksik olarak nitelendirilirler ve yemek pişirme işleminden etkilenmezler (Bacigalupo et al. 2004 ve içindeki referanslar, Friedman 2003a ve içindeki referanslar). Ayrıca, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında ölüme sebebiyet verdikleri rapor edilmiştir (Harborne 1998). Son yıllarda araştırmacılar, bu bileşiklerin anti-kanser (Cham et al. 1987, Cham et al. 1990, Chang et al. 1998, Kuo et al. 2000) ve anti-fungal (Cipollini et al. 1997a) gibi varsayılan özellikleri ve başka ilaç bileşiklerinin sentezinde ham madde olarak kullanılabilirliği (Weissenberg 2001 ve içindeki referanslar) üzerindeki çalışmalarla ilgilenir ilgilenmektedir.

Bu çalışmayla alakalı SGAA'ların (solasodine ve solanidine) temel kimyasal yapısı şekil 1.0 da gösterilmiştir (Chen & Miller 2001). A'dan D'ye kadar olan halkalar bu bileşiklerin steroidal iskelet yapısını oluştururlar (Voet 1995). Basit bir hidroksit grubu karbon 3'e (yani, C-3, A olan halka) bağlandığında solasodine ve solanine ayrımı E ve F halkalarındaki farklı bakarak yapılabilir. Burada E ve F halkalarında oksijen veya azot olması iki bileşiği ayırt etmekte kullanılır (Chen ve Miller 2001,

Friedman 2004, Weissenberg 2001). Her bir aglikon için, C-3 pozisyonundaki hidroksil grubun bir, iki veya üç-şekerli karbohidrat grubuyla yer değişimi, steroidal glycoalkaloid (SGA) yapısının oluşmasına neden olur. Bu araştırmada, iki ayrı genel karbohidrat grubunun (solastriose ve chacotriose) bağlanması önem taşımaktadır. Solatriose, galaktoz, glukoz ve ramnoze şekerlerinden meydana gelmiştir ve yer değişim noktası galaktoz grubu vasıtasıyla oluşur. Benzer bir şekilde, chacotriose da aglikondaki C-3 hidroksil grubunun glukoz grubuyla yer değiştirmesiyle, bir glukoz ve iki ramnoz'dan meydana gelmiştir. Burada sunulan çalışmada kullanılan SGA'ların yapıları şöyle sıralanmıştır: *solanine* (solanidine backbone + solatriose), *chaconine* (solanidine backbone + chacotriose), *solasonine* (solasodine backbone + solatriose), ve *solamargine* (solasodine backbone + chacotriose) (Weissenberg, 2001; Chen ve Miller, 2001). Kuronen ve arkadaşlarının da bahsettiği gibi, yapısal olarak yakın benzerlik gösteren bu bileşiklerin ayrıştırılması ve tayini oldukça zordur (Kuronen 1999). Tüm bu bileşiklerin ayrıştırılabilmesindeki zorluklardan dolayı, bazen bu alandaki araştırmacılar analizlerini gerçek glycoalkaloidler (SGA'lar) yerine sadece hidroliz ürünlerine dayandırarak yapma yoluna gitmektedir. (Kittipongpatana et al. 1999).



(a)



(b)

Şekil 1.0 a) Solasodine iskelet yapısı ve (b) Glycoalkaloidlerin solanidine iskelet yapısı. Çeşitli glycoalkaloidler C-3 (R-grup olarak gösterilen)'e şeker gruplarının bağlanmasıyla veya tek bir alkol grubunun (-OH) bağlanmasıyla, sırasıyla solasodine ve solanidine aglikonları oluşturulur. (Kaynak: Chen and Miller 2001).

2. Patlıcanda Glycoalkaloid Tayini İçin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisine dayanan bir Metotun Geliştirilmesi

Glikoalkaloidlerin analizine yönelik olarak yapılan literatür araştırmasından ortaya çıkan, bu tür araştırmaların genellikle patates üzerine odaklandırılmıştır (örneğin: Saito et al. 1990 Friedman & Levin 1992, Carman et al. 1986, Bushway et al. 1986, Dao 1996, Edwards & Cobb 1996; Kozukue et al. 1999, Sotelo & Serrano 2000, Vaananen et al. 2000, Laurila et al. 2001; Friedman et al. 2003b, Turakainen et al. 2004, Abreu 2007). Burada anlatılan çalışma için kullanılan metod, literatürdeki başka araştırmacıların patates dışındaki çeşitli Solanum kaynaklarından glycoalkaloidlerin ekstraksiyonu denemelerinin detaylarını öğrenmek ve kişisel iletişim sayesinde oluşturulmuştur (Wanyoni et al. 2002; Ripperger & Porzel 1997; Kuhn & Löw 1961; Fukuhara & Kubo 2004; Usubillaga et al. 1997; Eltayeb et al. 1997; Coelho et al. 1998; Aubert et al. 1989ab, Cipollini 2004). Glycoalkaloidler ultraviyole (UV) ışığını sınırlı olarak absorpsyona karşın, HPLC ayrıştırmasından sonra UV ile yapılan tespit, bu ekipmanın yaygın olarak bulunması ve potansiyel olarak tüm ilgili glikoalkaloidlerin uzun süren türevleştirme basamağı olmadan tespit edebildiği için hala en uygun alternatif olarak görülebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, projenin bu kısmı iki ana fikir üzerine yoğunlaşmıştır: pratik bir ekstraksiyon metodunun oluşturulması ve patlıcandaki glikoalkaloidlerin analizi için kullanılan mevcut HPLC metodlarının daha uygun hale getirilmesi.

2.1.0 Deneysel

2.1.1 Ekstraksiyon

Patlıcan materyallerinden glikoalkaloidlerin ekstraksiyonu için geliştirilen son metod, literatürdeki bazı prosedürlerin (Friedman ve Levin 1992, Saito 1990, Dao ve

Friedman 1996, Sotelo ve Serrano 2000, Friedman et al. 2003b, ve Kuronen et al. 1999) modifikasyonuna dayanmaktadır.

Bu deneylerde, ticari patlıcan (*Solanum melongena*), bilinen miktardaki glikoalkaloidlerce standart katımlı (spiked) ticari patlıcan ve yabani patlıcan (*Solanum linnaeanum*) örnekleri kullanılmıştır. Yabani patlıcan türleri dondurularak kurutulmuş (freeze-dried) ve vakumlu paketler halinde Dr. Marie-Christine DAUNAY (INRA Unite de Genetique & Amelioration des Fruits et Legumes, Montfavet cedex, Fransa) tarafından sağlanmıştır. Patlıcandaki beklenen glikoalkaloid içeriğine dayanarak, 0.25 gramdan birkaç grama kadar değişen materyal kullanılmıştır. Ekstraksiyon için genelde 1.0 gram toz kaynak maddesinden kullanılmıştır.

2.1.2 Yüksek Performans Sıvı Kromatografik Ayrıştırım

Fotodiod array tespit özelliğine sahip tek pistonlu Shimadzu Class-VP yüksek basınçlı sıvı kromatograf kullanılıp, ultraviyole (UV) saptama için 205 ve 208 nm seçilmiştir. Hem izokratik hem de değişim hızı (gradient) elusyon metodları kullanılmıştır. Bütün çalışma için ikili mobil faz sistemi kurulup, "B" olarak işaretlenen çözelti (solüsyon) sağlayıcı şişelerden biri organik çözücü (ACN) diğeri ise tampon çözeltisi (Tris-HCl, TEAP veya amonyum dihidrojen fosfat) içermektedir.

SGAA'ların tayininde, alıkonma zamanı ve sinyal yoğunluğu ölçümlerindeki hassasiyeti arttırmak için progesteron iç standard olarak kullanılmıştır. Progesteron, aglikonlarla yapısal benzerlikler göstermektedir ve ucuz bir kimyasaldır. Ayrıca, deneylerdeki tekrarlanabilirliği sağlamak amacıyla hazırlanan her ekstrakt çözeltisi için en az iki HPLC enjeksiyonu yapılmıştır.

2.2.0 Sonuç ve Tartışma

2.2.1 Gradient elüsyonla ilgili problemler

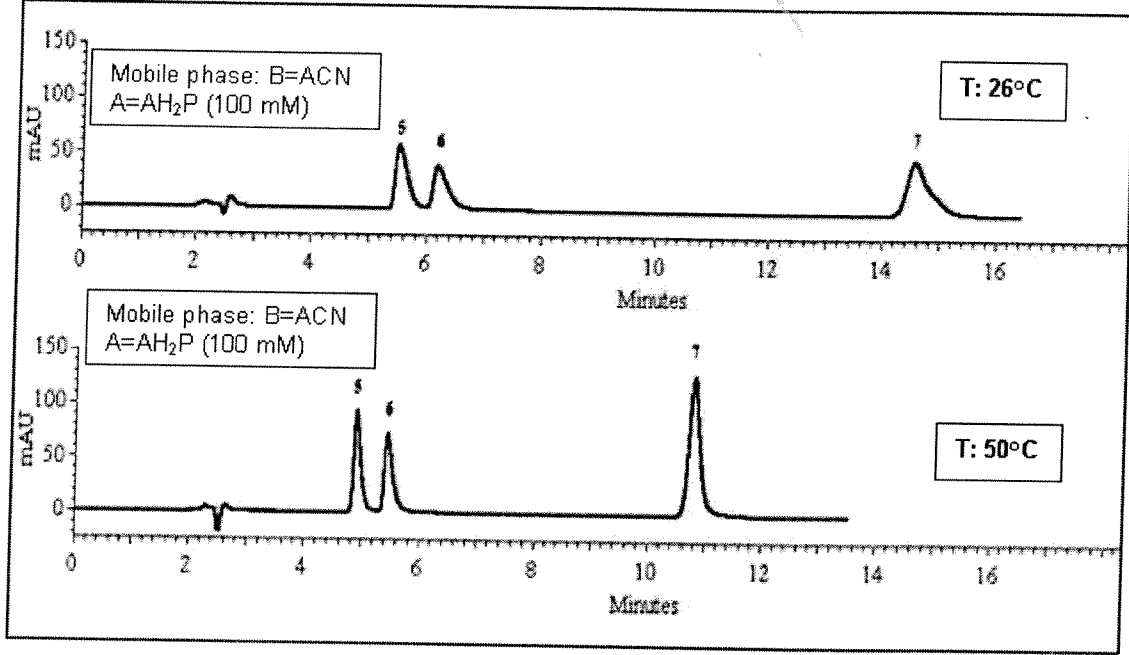
Vaananen ve araştırmacıların işine mukayesede (Vaananen et al. 2000), bu iş için gerekli eğitim metodu, oldukça karmaşıktı, ve patlıcanın sağlam ve kabul edilebilir ilgilendiğimiz SGA ayrışmasını birkaç ayın boyunca uğraşmamıza rağmen sağlamadı. Bundan sonraki çalışmalar aksi söylenmedikçe 3 farklı izokratik metottan (biçimden) biri kullanılarak yapılmıştır.

2.2.2 Pratik HPLC koşulları

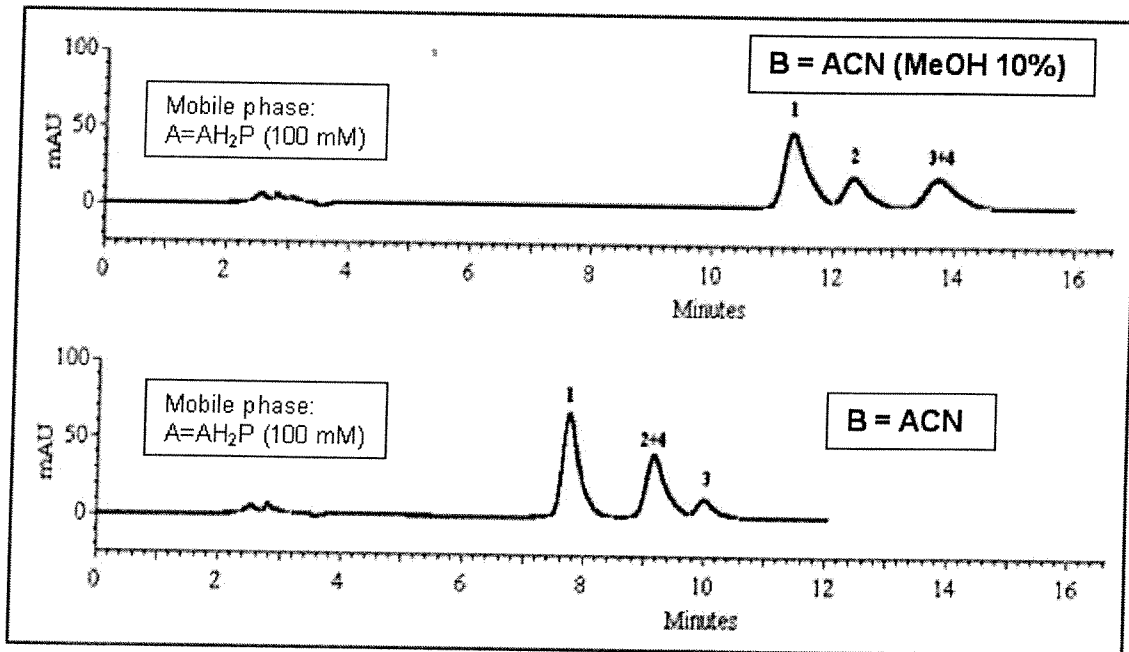
Tampon tipi, kolon sıcaklığı, pH, mobil faz modifikasyonu için asetonitril metanol eklenmesi gibi değişik koşullar karşılaştırılarak isokratik metod değerlendirilmektedir. Bazı örnek kromatogramlar şekil 2.0-2.2 de gösterilmiştir. Ayırma hızını optime etmek ve muhtemel spesifik SGA ya da SGAA'lar gruplara göre (glykoalkaloid; solamargine ve chaconine, solanine ve solasodine, aglikonlar; solasodine ve solanidine çiftlerine) örtüşmesi/ayrılması için 3 farklı izokratik metod geliştirilmiştir. Solamargine ve chaconine ayrımı için en iyi şartlar şöyle bulunmuştur: ACN (10%MeOH)/amonyum fosfat tamponu (30/70), pH:2.5, kolon ısı 50°C (1.metod). Solanine ve solasodine aynı koşullarda ayrıştırılabilir ancak kolon sıcaklığının 26°C olması ya da kolon sıcaklığı 50°C olması durumunda metanol iyileştirme maddesi olarak kullanılması gerekmektedir (2. metod). Ancak düşük sıcaklık ve metanolün eklenmesi (iyileştirme maddesi olarak kullanılması) bütün SGA'ların alikonma zamanını ve pik kuyruklanmasını artırmaktadır.

ACN konsantrasyonunun %70'e yaklaşarak analiz zamanını düşürmüş olmasına rağmen amonyum dihidrojen fosfat tamponu HPLC pompası ve kanallarında çökelme riski taşımaktadır. Bu nedenle aglikonların (solasodine ve solanidine) ayrışması için en uygun koşullar şu şekilde bulunmuştur: ACN/amonyum fosfat tamponu (60/40

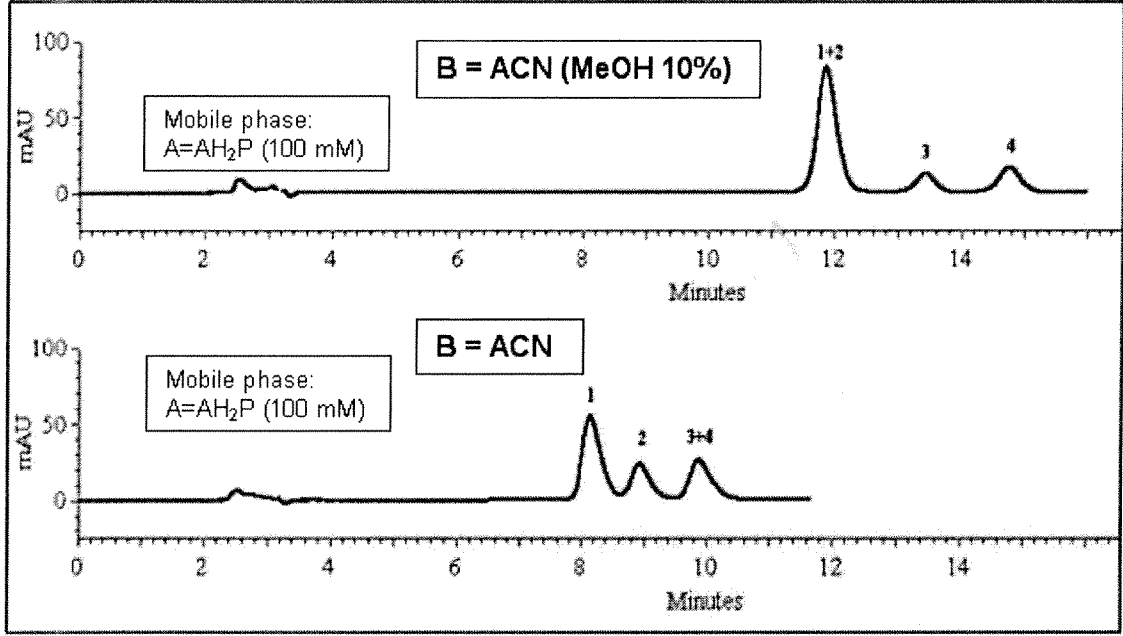
oranı), pH:2.5, ve kolon sıcaklığı 26°C (3.metod). Aynı koşullarda ancak 50°C kolon sıcaklığında daha keskin pikler elde edilmiştir. Yüzde 10'luk metanol modifier olarak ACN mobil fazına eklendiği zaman aglikonların ayrışması önemli derecede artmıştır.



Şekil 2.0 SGAAs'in ayrıştırılmasında sıcaklığın etkisi. pH: 2.5
Akış oranı: 1.0 mL/dk 5: solanidine 6: solasonine 7: progesteron (iç standardı).



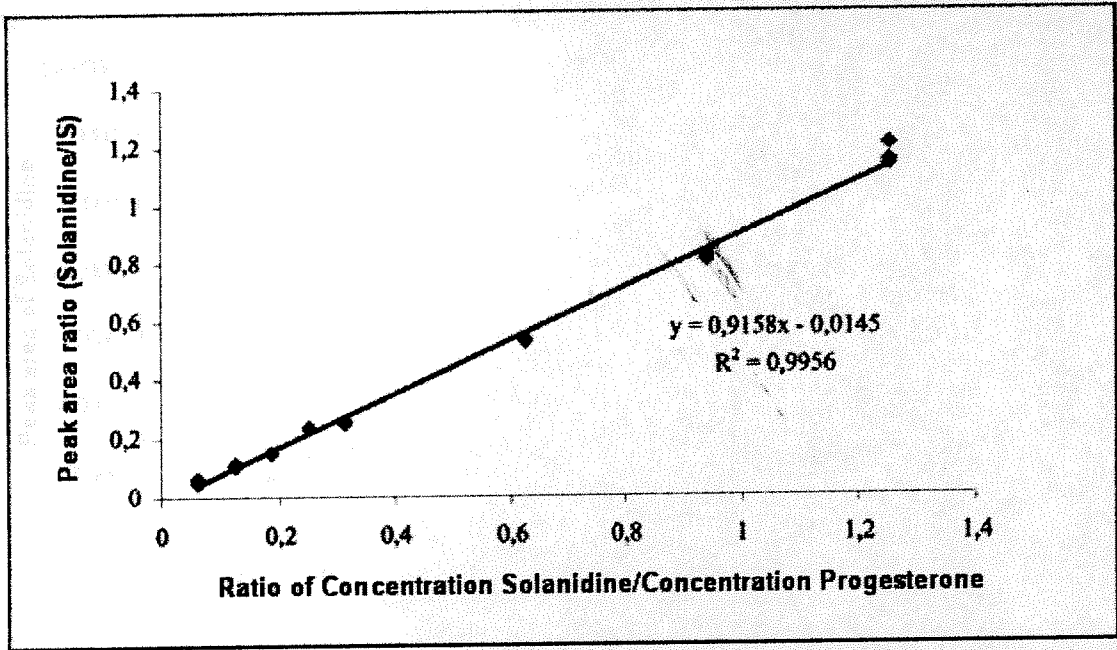
Şekil 2.1 SGAs'in ayrıştırılmasında metanol kullanımının etkisi. Sıcaklık: 26 °C, pH: 2.5 Akış oranı: 1.0mL/dk 1: solasonine 2: a-solanine 3: a-chaconine 4: solamargine.



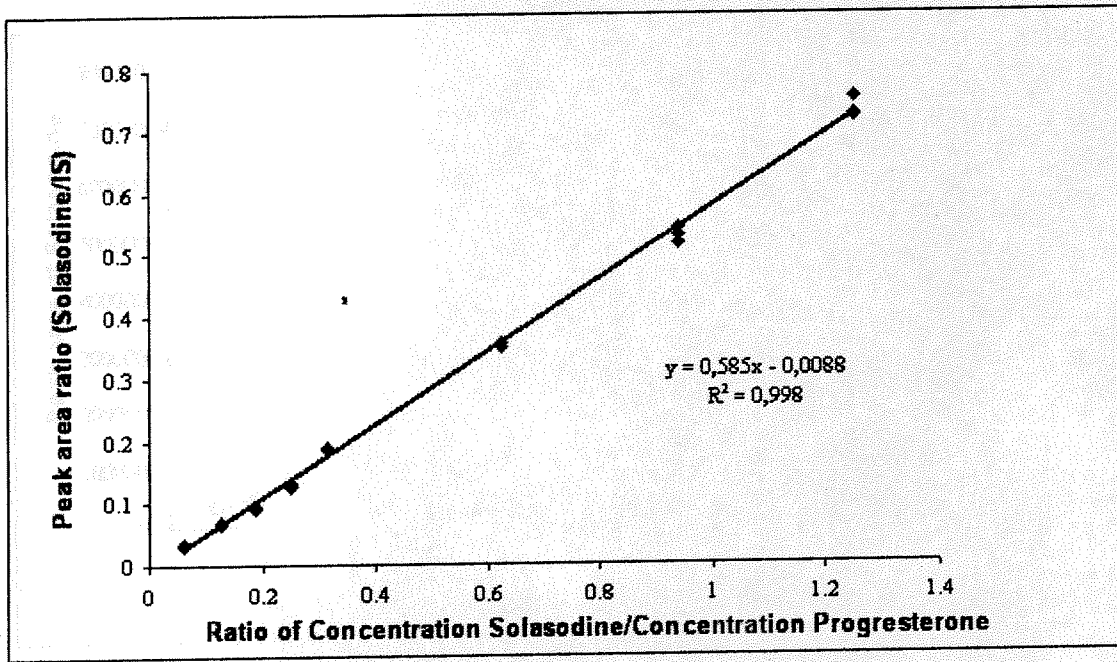
Şekil 2.2 SGAs'in ayrıştırılmasında iyileştirme maddesi olmak metanol kullanımının etkisi. Sıcaklık: 50 °C, pH 2.5 Akış oranı: 1.0 mL/dk 1: solasonine 2: a-solanine 3: a-chaconine 4: solamargine.

2.2.7 Kalibrasyon Sonuçları

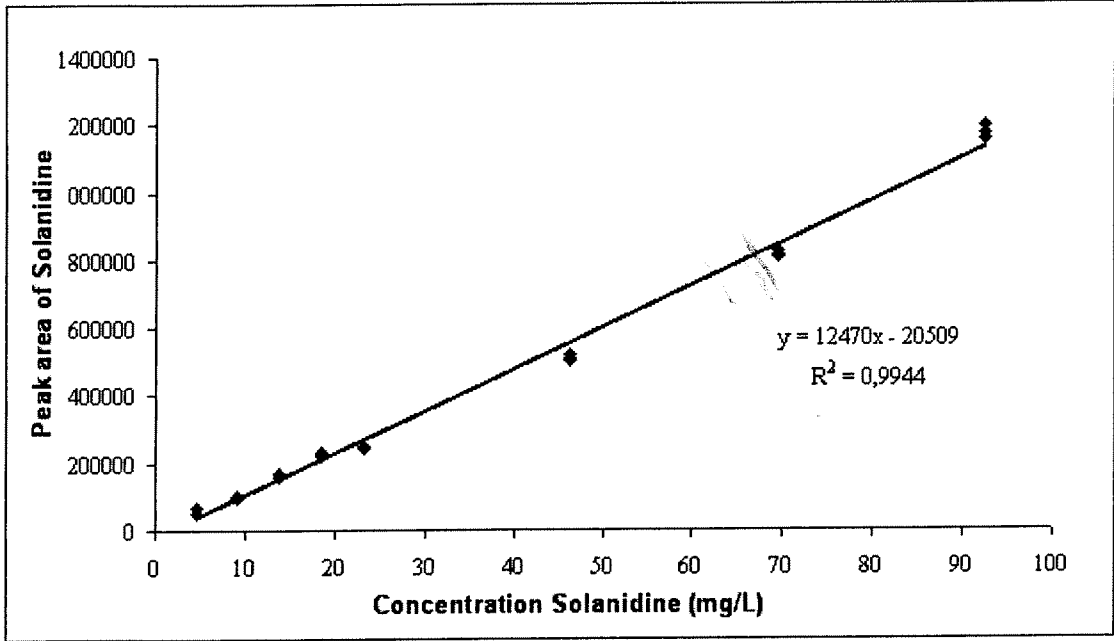
Solanidine ve solasodine için progesteronun iç standard olarak kullanıldığı kalibrasyon eğrisi şekil 2.3 ve 2.4 de verilmiştir. Hayvan hormonu progesteron patlıcan özütlerinde bulunmadığından iç standard olarak kullanılması düşünülmüştür. Literatürde kolesterol (Simons ve ark. 2006) ve nikotin (Eldridge ve Hockridge 1983) de iç standard olarak kullanılmıştır. Ancak bitkiler bu maddeleri düşük seviyede de olsa içerebilirler (Behrman ve Gopalan 2005). Şekil 2.5 ve 2.6'daki kalibrasyon eğrisi için iç standard kullanılmamıştır. Solanidine ve solasodine için hem iç standartlı hem de iç standartsız iyi bir doğrusallık elde edilmiştir.



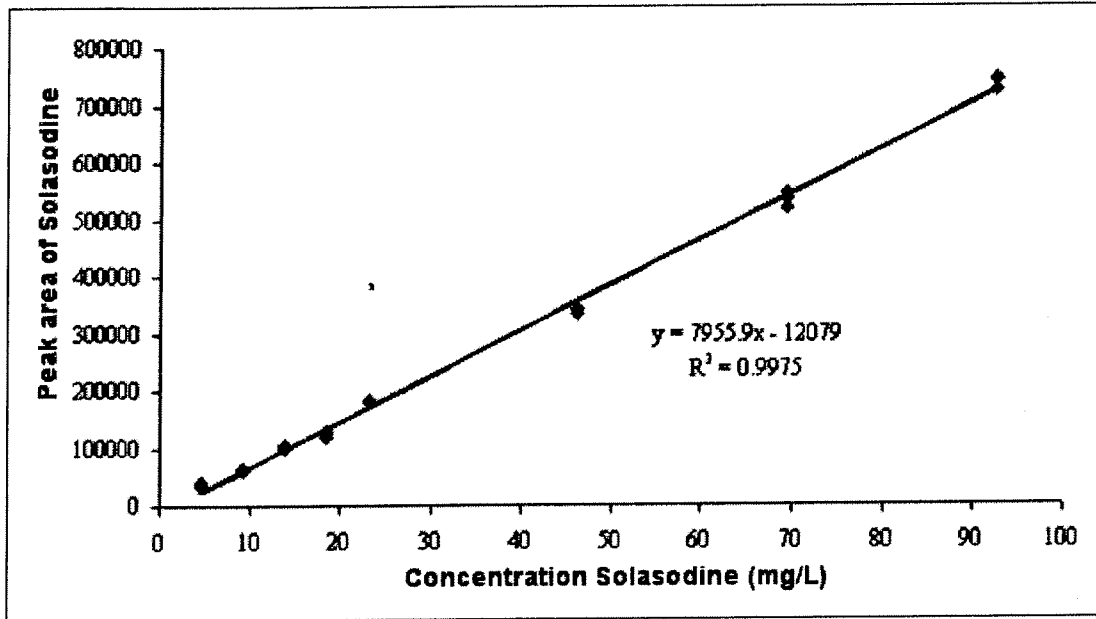
Şekil 2.3 Progesteron iç standardı kullanarak 4-100 mg/L'lık konsantrasyon aralığındaki solandine için kalibrasyon eğrisi (IS = iç standard, progesteron)



Şekil 2.4 Progesteron iç standardı kullanarak 4-100 mg/L'lık konsantrasyon aralığında solasodine için kalibrasyon eğrisi (IS = iç standardı, progesteron)



Şekil 2.5 İç standart olmadan 4-100 mg/ mg/L'lık konsantrasyon aralığında solanidine için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 2.6 5 İç standart olmadan 4-100 mg/ mg/L'lık konsantrasyon aralığında solasodine için kalibrasyon eğrisi.

Progesteronun iç standard olarak kullanımı kesinliği (precison) biraz arttırmıştır. Ticari olarak elde edilen S. Melongena örneğinde SGA ve SGAA

gözlenemediği için reaksiyonun tüm adımlarında (ekstraksiyon, çözgen uçurularak yoğunlaştırma, analiz) beklenen geri kazanımı en güvenilir şekilde tahmin etmek için solasodine standart olarak kullanılmıştır. Bu anlamda, yaklaşık % 125 solasodine geri kazanım yüzdesiyle, sırasıyla S. Melongena ve solasodine ideal matriks ve iç standard olduğu gösterildi. '3 σ /m' denklemi (' σ ' kalibrasyon eğrisindeki hatası ve 'm' ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir) kullanarak tayin sınırı (limit of detection, LOD) solanidine için 9 mg/L ve solasodine için 1.6 mg/L bulunur.

Solamargine patlıcan örneklerindeki başlıca SGA'dır. Solanum linnaeanum örneğindeki analizlerde solamargine için beklenen ölçüm limiti (LOQ) 10 ile 20 ppm arasında belirlenmiştir (dondurulmuş patlıcan örneklerindeki 0.1 ile 0.2 mg solamargine karşılık gelmektedir).

3.0 Katı Hal Mikroekstraksiyon Metoduyla Glycoalkaloid'lerin fiber (lif) üzerinde Türevlendirilmesi ve Ekstraksiyonunun Araştırılması

Doğrudan enjeksiyon gaz kromatografi metodu patates kaynaklarındaki steroidal glycoalkaloid aglikonunun (SGAAs) saptanmasında kullanıldı. Ancak gaz kromatografisi enjeksiyon kanalında uygulanan glycoalkaloidlerin buharlaşması için gerekli sıcaklık bu malzemelerin bozulmasına sebep olabilmektedir (Laurila et al. 1999 ve içindeki referanslar). Bu problemin üstesinden gelmek için araştırmacılar GC metodunu kullanarak SGAA'nın önce türevlendirilmesi ve başarılı bir şekilde saptanmasının nasıl yapılacağını gösterdiler (Laurila et al. 1999 ve içindeki referanslar).

Katı hal mikroekstraksiyon (SPME) metodu genellikle uçucu maddelere uygulanabilirliğiyle bilinmesine rağmen, uçucu olmayan analitlerin ekstraksiyonu için, çeşitli araştırmalarda analit ekstraksiyonunun yapılabilirliği ve türevlendirme işleminin direk olarak fiber (lif) üzerinde uygulanabilirliği gösterilmiştir (Carpinteiro 2004, Sampdro 2000, Stashenko et al. 2004). Bildiğimiz kadarıyla SPME metodu patlıcan ve patates aglikonlarının analizinde kullanılması henüz gerçekleştirilmedi/uygulanmamıştır. Bu metod da öncelikle analit bir SPME fiberinin üzerine ekstrakte edilir daha sonra 1-(trimethylsilyl)imidazole (TMSI) kullanarak türevlendirilir. SPME tekniği bu tür maddelerin rutin analizleri için potansiyel bir teknik olabilir ve kromatografik metodlara tamamlayıcı olarak kullanılması incelenebilir.

3.1.0 Deney

3.1.1 Fiber (lif) üzerine türevlendirme ile direk SPME

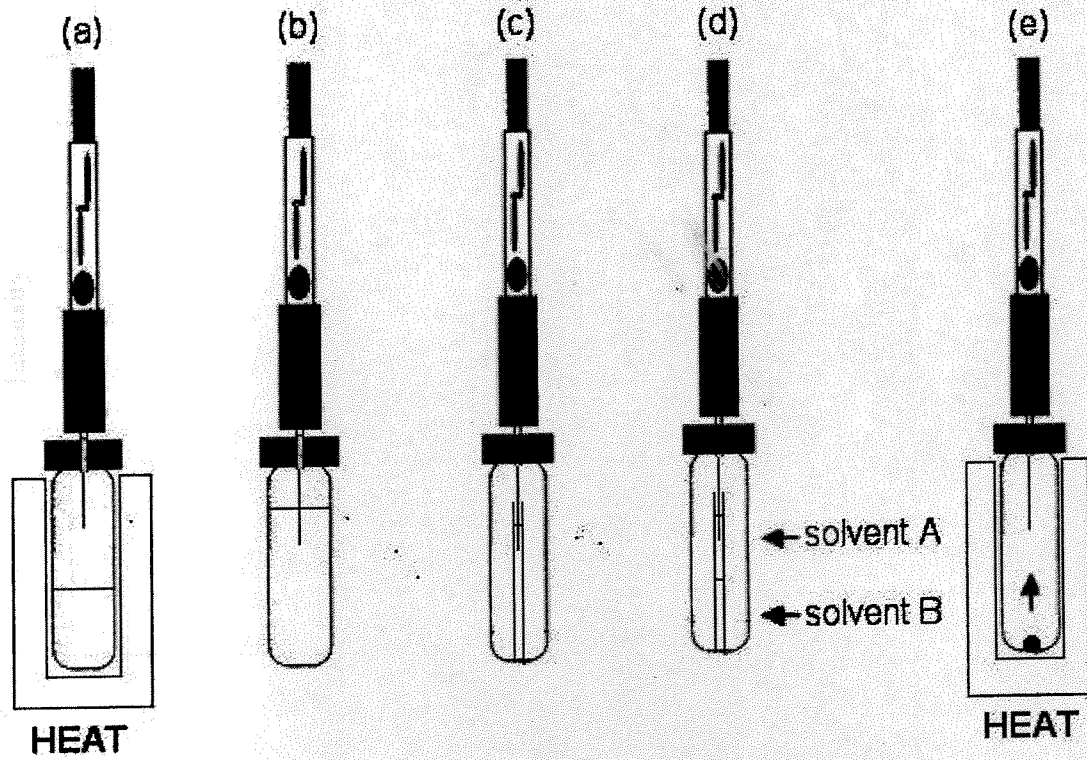
Elle kullanılan SPME kabı ve farklı kaplamalı fiberler: Polydimethylsiloxane/ Divinylbenzene (PDMS-DVB, polar analitlerin ekstraksiyonu için, 65 micrometre film

kalınlığı), Carboxen/Polydimethyl siloxane (CAR-PDMS, uçucu analitlerin ekstraksiyonu için, 75 micrometre film kalınlığı) ve Carbowax/Divinylbenzene (CW-DVB, polar analitlerin ekstraksiyonu için, 65 micrometre ve 70 micrometre film kalınlığı, Stable-Flex) Supelco firmasından temin edildi (Bellefonte, PA, USA).

Ekstraksiyonlar şekil 3'de görüldüğü gibi yapılmıştır. Fiber üzerinde SPME çalışmaları için aglikonun polar olması sebebiyle başlangıç denemeleri polar CW-DVB fazları kullanılarak yapılmıştır. SPME kullanılmayan çalışmalarda, solasodine'nin GC-MS analizinden önce türevlendirilmesi gerekmektedir buna karşılık solanidine ve kolesterol analizinde buna gerek duyulmamaktadır. %5'lik asetik asit içeren metanol içinde solanidine ve kolesterol karışımı 20 mikrolitrelik standard olarak hazırlanır ve bu karışımı içeren cam kapiler içerisine fiber direk olarak batırılır. Başlangıçta 30 dakikalık ekstraksiyon zamanı seçilmiştir. Ekstraksiyon adımı tamamlandıktan sonra, fiber içinde türevlendirme maddesi bulunan 4 mL'lik vialin üst kısmına daldırılır ve vial alüminyum blok üzerinde 70°C'de bir saat ısıtılır. Seçilen ekstraksiyon metoduna bakılmaksızın, SPME fiberleri ya direk olarak ya da şekil 3.0 e'deki gibi türevlendirildikten daha sonra GCMS'de analiz edilir.

3.1.2 GC-MS Analizi

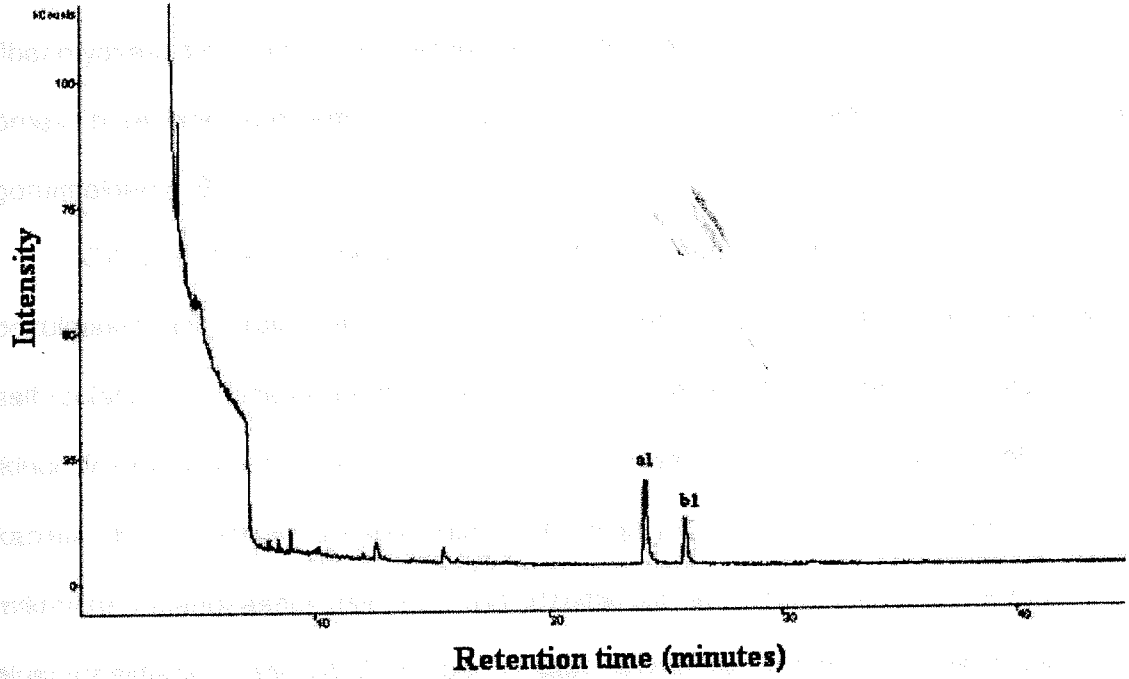
Varian Star 3400Cx Gaz-Kromatografisi ile Varian iyon trap kütle spektrometresi kullanıldı (Walnut Creek, California, USA). Bunun yanı sıra 'split-splitless' programlanabilir ısı enjektörü (SPI.1078, 314 mm iç çap, cam astarlı) ve SAC-5 tipi kapiler kolon (30 m x 0.25 mm iç çap, film kalınlığı 0.25 micrometre) GC-MS ile kullanılmıştır.



Şekil 3.0 Ekstraksiyon tiplerinin karşılaştırılması ve SPME ile fiber üzerinde türevleme a. Üst bölüm (Headspace) ekstraksiyon, b.) direk fiberin çözügene daldırılmasıyla yapılan ekstraksiyon c.) kapiler tüp kullanılarak fiberin direk çözügene doldurulmasıyla yapılan ekstraksiyon, d.) kapiler tüpteki çözügen A'dan SPME ile takip edilen sıvı-sıvı ekstraksiyonu, e.) SPME fiberi üzerine emilmiş ekstrat analitin türevlendirilmesi (a,b,ve e Pawliszyn 1999 ve Stashenko 2004'un çalışmalarından adapte edilmiştir.

3.2 Sonuç ve Tartışma

TMSI miktarının 40 mikrolitreye yükseltilmesi ve solandine ve kolesterol (her biri 30 mg/L) derişiminin düşürülmesiyle türevlendirilmiş ürünün derecesi türevlendirilmemiş formunun artık görünmediği noktaya yükselmiştir (Şekil 3.1). Solanidine ve kolesterol mono-TMS türevlerini vermektendirler, moleküller iyon sinyalleri sırasıyla 469 m/z ve 458 m/z'de görölmektedirler.



Şekil 3.1 SPME ekstraksiyonunda (CW-DVB fiber) sonra türevlendirilmiş standart solanine çözeltisinin (30 mg/L) Toplam iyon GC-MS kromatogramı; a1=kolesterol; b1=solanidine

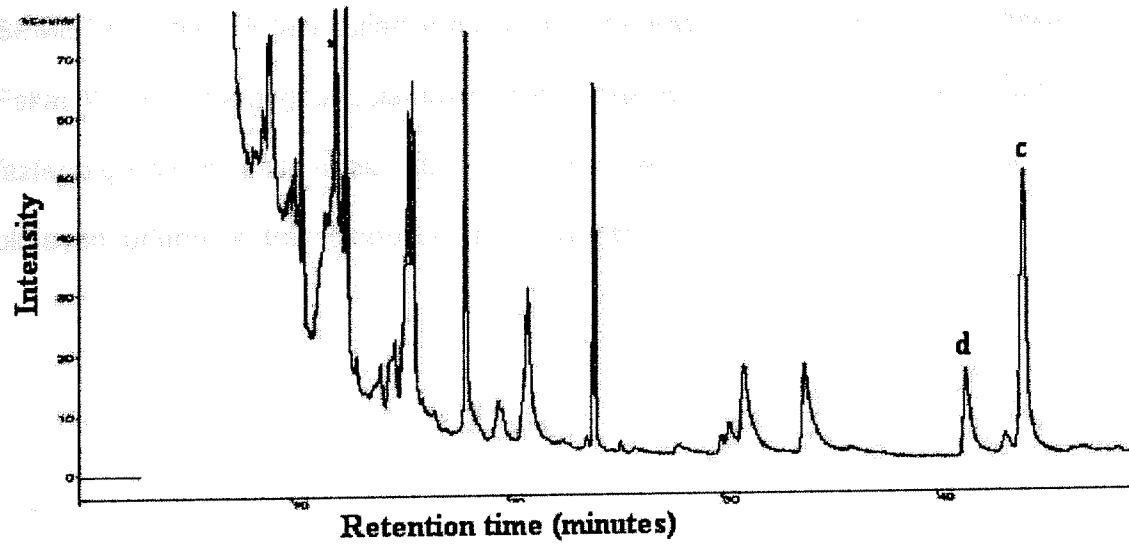
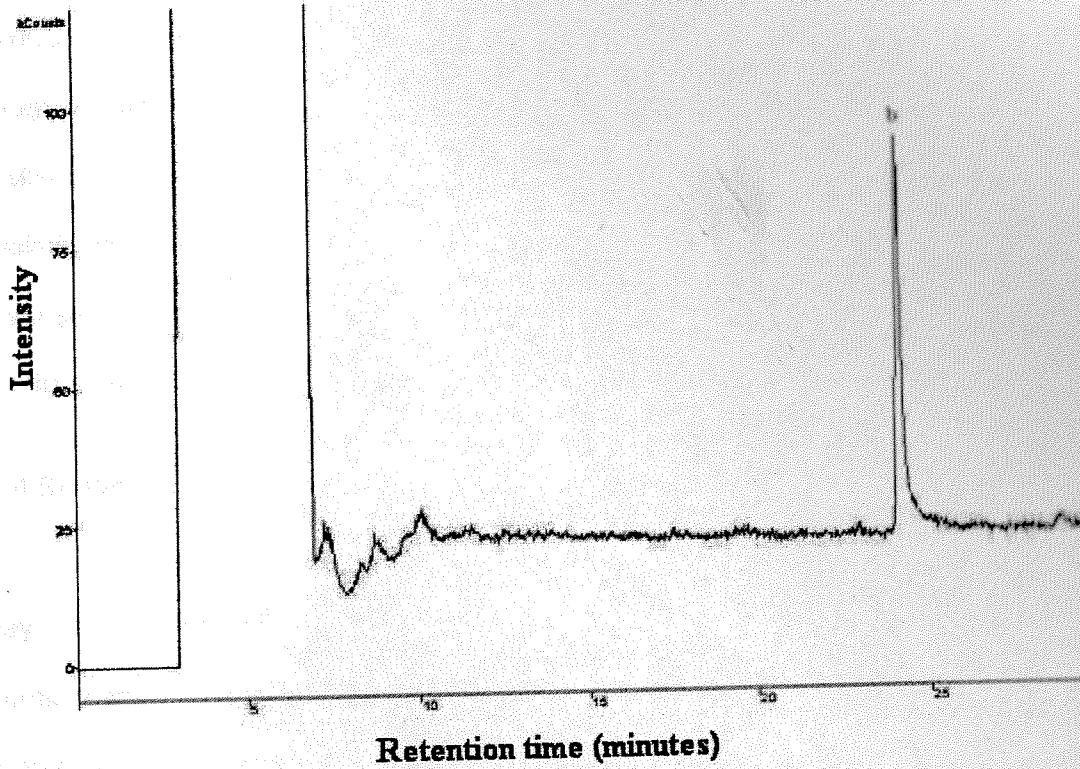


Fig. 3.2 Solasodine'nin çözeltisinin (300 mg/L) SPME ekstraksiyonu ve fiber (CW-DVB fiber) üzerinde türevlendirilmesinden sonraki GC-MS kromatogramı. C ve d olarak gösterilen pikleri kütle spektrasında solasodine'nin varlığını göstermektedir.

Fiberden kaynaklanan sinyallerin alıkonma zamanınının 20 dakikadan az olması fiberin yavaşça bozulduğunu göstermektedir. Herhangi bir muamele yapılmayan örnek fibere ikinci türevleme adımı uygulandığında, türevlendirilmiş solasodine açıkça görülmektedir (Şekil 3.2).

CW-DVB fiber ekstraksiyonu daha başarılı olduğu için fiberin yavaşça bozulmasını azaltarak kullanılması üzerinde yoğunlaştı. Polar fazın metanol-asetik asit (polar) çözüneğine doğrudan maruz kalmasını önlemek için, non-polar çözüneğinde ikinci bir ekstraksiyon yapıldı (Şekil 3.0d). Bu çalışmalarda vial içine yerleştirilen kapiler tübün içinde alt fazı solanidine (1000 mg/L) standard çözeltisi içeren 20 mikrolitre metanol-asetik asit (95:5 v/v) çözeltisi üst fazı ise 20 mikrolitre hekzan oluşturmaktadır. Yeni CW-DVB fiber bir saat hekzan fazına batırıldı böylece daha aşağıda bulunan polar fazla etkileşimi engellendi. Daha sonra bu fiber türevleme işlemine tabi tutulmadan GC enjektöründe fiberden ayrıldı. Ancak ekstraksiyonun tekrarı sırasında (türevlemeden önce), fiber üzerindeki kaplama tamamıyla çözülmüş ve kullanılamaz hale gelmiştir. Bu çalışmadan anlaşılacağı üzere doğrudan batırma SPME için CW-DVB fazı kullanılması solanidine ekstraksiyonu ile sonuçlanmaktadır. Fakat fiberin sağlamlığı uygulamasını limitlemektedir. Belki daha sağlam sabit fazların geliştirilmesiyle direk batırma SPME yöntemi glycoalkaloid ve diğer uçucu olmayan türlerin ekstraksiyonu için daha elverişli olacaktır.



Şekil 3.3 Türevlendirilmemiş solanidine (1000mg/L) GC-MS kromatogramı. Şekli 3d'de gösterilen metod kullanılarak CW-DVB SPME fiberi üzerine ekstraksiyonundan sonra çözügen A hekzan çözügen B = metanol asetik asit; b = solanidine.

Steroid al glycoalkaloid aglikon analizinde uygulanan SPME metodunun uygulanabilirliği konusunda yapılan ilk denemeler bir nebze cesaret kırıcı olmasına rağmen bazı başarılar elde edilmiştir ve sonuçların belirtilmesi gerekmektedir. Aslına bakılırsa SPME metodunun büyük miktarlarda, pahalı (bazı durumlarda zararlı) çözügen gerektirmemesi, ekstraksiyon ve tanımlama işlemlerinin basit olması bu tekniği oldukça çekici hale getirmektedir. Uçuculuğu az olan örneklerin tanımlanmasında SPME ile fiber üzerinde türevleme alternatif bir örnek hazırlama tekniğidir. Katı faz olarak kullanılan fiber (kuru destek) özellikle suya hassas türevleme reaktifleri ile kullanım için uygun olmaktadır. Polar CW-DVB fazı polar fonksiyonel grup içeren aglikonların ekstraksiyonu için uygundur. Bu çalışmalarda; solanum örneklerinde glikoalkaloid başlangıç ekstraksiyonu için kullanılan en yaygın

çözgen sistemi olmasından dolayı metanol-asetik asit karışımı kullanılmıştır. Zhu (2003) tarafından gösterildiği gibi SPME kapiler tüp kullanımı üzerine olan araştırmalar devam etmelidir. CW-DVB fazı metanol çözeltisinde kararsızdır ve/veya TMSI buharı ile bozunmaktadır. Buna karşılık SPME için yeni fazların geliştirilmesiyle, bu ekstraksiyon metodları üzerinde tekrar çalışması gerekmektedir. Aynı şekilde, son zamanlarda HPLC'ye adapte edilen SPME (Lord 2006) metodunun bu tip analizler için ilgi çekici bir metod olduğu kanıtlanabilir.

4.0 Sonuçlar

Bu çalışmada patlıcandaki glycoalkaloid içeriğinin belirlenmesinde kullanılan yayınlanmış metodların geliştirilmesinde uygulanan pratik ve orijinal metodlar sunulmuştur. Özellikle HPLC için hareketli fazda katkı maddesi olarak kullanılan metanolün uygunluğu gösterilmiştir. Ayrıca glycoalkaloidlerin analizinde kullanılmaya üzere katı faz mikroekstraksiyon (SPME) üzerine daha önce yapılmayan orijinal bir araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmanın desteklenmesi, iki yüksek lisans öğrencisinin başarı ile mezun olmasını, diğer bilim adamları ile uluslararası ilişkilerin güçlenmesini, ulusal konferansta çalışmanın sunulmasını (Tek ile Eanes 2006) ve İYTE'deki diğer araştırmacılarla iş birliği kurulmasını sağlamıştır.

5.0 Yararlanılan Kaynaklar

- ABREU, P., Relva, A., Matthew, S., Gomes, Z., Morais, Z., "High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated, and organic crop systems," *Food Control*, 18, 40-44. (2007).
- AUBERT, S., Daunay, M.C., Pochard, E., "Saponosides steroïdiques de l'aubergine (*Solanum melongna* L.) I. Interet alimentaire, methodologie d'analyse, localisation dans le fruit," *Agronomie*, 9, 641-651, (1989a).
- AUBERT, S., Daunay, M.C., Pochard, E., "Saponosides steroïdiques de l'aubergine (*Solanum melongna* L.) II. Variations des teneurs liees aux conditions de recolte, aux genotypes et a la quantite de graines des fruits," *Agronomie*, 9, 751-758, (1989b).
- BACIGALUPO, M.A., Longhi, R., Meroni, Giacomo, "Alpha-solanine and alpha chaconine glycoalkaloid assay in *Solanum tuberosum* extracts by liposomes and time-resolved fluorescence," *J. Food Comp. & Anal.*, 17, 665-673, (2004).
- BEHRMAN E.J., Gopalan, V., "Cholesterol and Plants," *J. Chem. Ed.*, 82, 1791-1793 (2005).
- BLANKEMEYER, J.T., McWilliams, M.L., Rayburn, J.R., Weissenberg, M., Friedman, M., "Developmental Toxicology of Solamargine and Solasonine Glycoalkaloids in Frog Embryos," *Food and Chem. Tox.*, 36, 383-389, (1998).
- BUSHWAY, R.J., Bureau, J.L., King, J., "Modification of the Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Potato Glycoalkaloids," *J. Agric. Food Chem.*, 34, 277-279, (1986).
- CARMAN, Jr., A.S., Kuan, S.S., Ware, G.M., Francis, Jr., O.J., Kirschenheuter, G.P., "Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Determination of the Potato Glycoalkaloids alpha-Solanine and alpha-Chaconine," *J. Agric. Food. Chem.*, 34, 279-282, (1986).
- CARPINTEIRO, J. Quintana, J.B., Rodriguez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R. "Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry" *J. Chromatogr. A*, 1056, 179-185, (2004).
- CHAM, B.E., Meares, H.M. "Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* are effective in the treatment of skin cancers in man," *Cancer Letters*, 36, 111-118, (1987).
- CHAM, B.E., Daunter, B. "Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180," *Cancer Letters*, 55, 221-225, (1990).
- CHANG, L-C., Tsai, T-R., Wang, J-J., Lin, C-N., Kuo, K-W., "The Rhamnose Moiety of Solamargine Plays a Crucial Role in Triggering Cell Death by Apoptosis" *Biochem. & Biophys. Res. Commun.*, 242, 21-25, (1998).

- CHEN, Z., Miller, A.R., "Steroidal Alkaloids in Solanaceous Vegetable Crops," *Horticultural Reviews*, 25, 171-196, (2001).
- CIPOLLINI, M.L., private email communication, Wednesday, Nov. 3, (2004).
- CIPOLLINI, M.L., Levey, D.J. "Antifungal activity of Solanum fruit glycoalkaloids: Implications for frugivory and seed dispersal," *Ecology*, 78, 799-809, (1997).
- COELHO, R.M., De Souza, M.C., Sarrigiottos, M.H., "Steroidal Alkaloid Glycosides from Solanum Orbignianum," *Phytochem.*, 49, 893-897, (1998).
- DAO, L., Friedman, M. "Comparison of Glycoalkaloid Content of Fresh and Freeze-Dried Potato Leaves Determined by HPLC and Colorimetry," *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2287-2291, (1996).
- EDWARDS, E.J., COBB, A.H. "Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Potato (*Solanum tuberosum*) Glycoalkaloids," *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2705-2709, (1996).
- ELDRIDGE, A.C., Hockridge, M.E. "High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Easter Black Nightshade (*Solanum ptycanthum*) Glycoalkaloids," *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1218-1220, (1983).
- ELTAYEB, E., Al-ansari, A.S., Roddick, J.G., "Changes in the Steroidal Alkaloid Solasodine During Development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*," *Phytochem.*, 46, 489-494, (1997).
- FRIEDMAN, M., "Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds," *J. Chromatogr. A.*, 1054, 143-155, (2004).
- FRIEDMAN, M., Henika, P.Ř., Mackey, B.E. Effect of feeding solanidine, solasodine, and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice, *Food and Chemical Toxicology* 41, 61-71, (2003a).
- FRIEDMAN, M., Roitman, J.N., Kozukue, N. "Glycoalkaloid and Calystegine Contents of Eight Potato Cultivars" *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2964-2973, (2003b).
- FRIEDMAN, M., Bautista, F.F., Stanker, L.H., Larkin, K.A., "Analysis of Potato Glycoalkaloids by a New ELISA Kit" *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5097-5102.
- FRIEDMAN, M., Levin, C.E., "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Potato Glycoalkaloids and Hydrolysis Products on Acidic Columns," *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2157-2163, (1992).
- FUKUHARA, K., Shimizu, K., Kubo, I., "Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei," *Phytochem.*, 65, 1283-1286, (2004).

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods*, 3rd ed., Chapman & Hall, London, (1998). Pp: 213.

KITTIPONGPATANA, N., Porter, J.R., Hock, R.S. "An Improved High Performance Liquid Chromatographic Method for the Quantification of Solasodine," *Phytochem. Anal.*, 10, 26-31, (1999).

KOZUKUE, N., Misoo, S., Yamada, T., Kamijima, O., Friedman, M. "Inheritance of Morphological Characters and Glycoalkaloids in Potatoes of Somatic Hybrids between Dihaploid *Solanum acaule* and Tetraploid *Solanum tuberosum*," *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4478-4483, (1999).

KUHN, R., Löw, I., "Zur Konstitution der Leptine," *Chemische Berichte*, 94, 1088, (1961).

KUO, K-W., Hsu, S-H., Li, Y-P., Lin, W-L., Liu, L-F., Chang, L-C., Lin, C-C., Lin, C-N., Sheu, H-M., "Anticancer activity evaluation of the *Solanum* Glycoalkaloid Solamargine Triggering Apoptosis in Human Hepatoma Cells," *Biochem. Pharm.* 60, 1865-1873, (2000).

KURONEN, P., Vaananen, T., Pehu, E. "Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous profiling of steroidal glycoalkaloids and their aglikones," *J. Chromatogr. A.* 863, 25-35. (1999).

LAURILA, J., Laakso, I., Larkka, J., Gavrilenko, T., Rokka, V.-M., Pehu, E. "The proportions of glycoalkaloid aglikones are dependent on the genome constitutions of interspecific hybrids between two *Solanum* species (*S. brevidens* and *S. tuberosum*)," *Plant Science*, 161, 677-683, (2001).

LAURILA, J., Laakso, I., Vaananen, T., Kuronen, P., Huopalahti, R., Pehu, E., "Determination of Solanidine- and Tomatidine-Type Glycoalkaloid Aglikones by Gas Chromatography/Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2738-2742, (1999).

LORD, H., "A review of strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography" *J. Chromatogr. A.*, article in press, (2006).

MENSINGA, T.T., Sips, A.J.A.M., Rompelberg, C.J.M., van Twillert, K., Meulenbelt, J., van den Top, H.J., van Egmond, H.P., "Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study," *Reg. Tox. & Pharma.*, 41, 66-72, (2005).

MESTER, Z., Sturgeon, R., Pawliszyn, J. "Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation" *Spectrochem. Act. B.*, 56, 233-260, (2001).

PAWLISZYN, J. *Applications of Solid-Phase Microextraction*, Royal Society Chemistry, Cambridge, (1999).

RIPPERGER, H., Porzel, A., "Steroidal Alkaloid Glycosides from *Solanum Suavelens*," *Phytochem.*, 46, 1279-1282, (1997).

- SAITO, K., Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Nakazawa, H., "High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potato products," *J. Chromatogr.* 508, 141-147, (1990).
- SAMPEDRO, M.C., Martin, O., Lopez de Armentia, C. Goicolea, M.A., Rodriguez, E., Gomez de Balugera, Z., Costa-Moreira, J., Barrio, R.J. "Solid-phase microextraction for the determination of systemic and non-volatile pesticides in river water using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron-capture detection" *J. Chromatogr. A.* 893, 347-358 (2000).
- Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA., 2007.
- SIMONS, V., Morrissey, J.P., Latijnhouwers, M., Csukai, M., Cleaver, A., Yarrow, C., Osbourn, A., "Dual Effects of Plant Steroidal Alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*" *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 2732-2740 (2006).
- SNYDER, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. *Practical HPLC Method Development*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., (1997), Pp: 21-58.
- SOTELO, A., SERRANO, B. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of the Glycoalkaloids alpha-Solanine and alpha-Chaconine in 12 Commercial Varieties of Mexican Potato," *J. Agric. Food Chem*, 48, 2472-2475, (2000).
- STASHENKO, E., Martinez, J. "Derivatization and solid-phase microextraction" *Trends Anal. Chem.*, 23, 553-561, (2004).
- STOBIECKI, M., Matysiak-Kata, I., Franski, R., Skala, J., Szopa, J., "Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry," *Phytochem.*, 62, 959-969, (2003).
- TEK, N., Eanes, R. 'Glikoalkaloidlerin Patlıcanda Kromatografik Tayini' VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, 28 Haziran, 2006, Izmir.
- TURAKAINEN, M., Vaananen, T., Anttila, K., Ollilainen, V., Hartikainen, H., Seppanen, M., "Effect of Selenate Supplementation on Glycoalkaloid Content of Potato (*Solanum tuberosum* L.)," *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7139-7143, (2004).
- USUBILLAGA, A., Aziz, I., Tettamanzi, M.C., Waibel, R., Achenbach, H., "Steroidal Alkaloids from *Solanum Sycophanta*," *Phytochem.*, 44, 537-543, (1997).
- VAANANEN, T., Kuronen, P., Pehu, E. "Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids" *J. Chromatogr. A.* 869, 301-305, (2000).
- VOET, D., Voet, J.G. *Biochemistry*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1995). Pp: 284.

WANYONYI, A.W., Chabra, S.C., Mkoji, G., Eilert, U., Njue, W.M. "Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*," *Phytochem.*, 59, 79-84, (2002).

WEISSEBERG, M., "Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom" *Phytochem.*, 58, 501-508, (2001).

ZHU, P.-L., Liu, C.-L., Liu, M.-C., "Solid-phase microextraction from small volumes of sample in a glass capillary" *J. Chromatogr. A.*, 988, 25-32, (2003).

Proje No: TBAG-2364 (103T139)
Proje Başlığı: Development of a method for glycoalkaloid analysis of eggplant
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Ritchie EANES, Filiz PARLAYAN, Neslihan TEK, Yurdanur AKGÜL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Gülbahçe kampüsü, Urla, İZMİR
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Ankara, Türkiye İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Nisan 2003- Ekim 2006
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada, α -solanine, α -chaconine, α -solasonine ve α -solamargine steroid glycoalkaloidleri (SGAs) ile solanidine, solasodine steroid aglikonlarının (SGAAs) ayırım ve tayininde kullanılan mevcut yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemlerinde değişiklikler yapılmıştır. Son olarak, aglikon ekstraksiyonu ve tayini için fiber üzerinde türevleme yapılarak katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve GC-MS yöntemleri incelenmiştir.
Anahtar Kelimeler: glycoalkaloidler, solasonine, solamargine, solanine, chaconine, solasodine, solanidine, SPME, Katı Hal Mikroekstraksiyon, patlıcan, Solanum linnaeanum, Solanum melongena
Projeden Yapılan Yayınlar: EANES, R.C., Tek, N., Kirsoy, O., Frary, A., Doganlar, S. , Almeida, A.E. "Development of Practical Liquid Chromatography (HPLC) Methods for the Separation and Determination of Eggplant Steroidal Glycoalkaloids and their Aglycones" submitted, September, 2007. EANES, R.C., Tek, N. Solid-Phase Microextraction (SPME) followed by On-Fiber Derivatization of Solasodine and Solanidine Aglycones of Steroidal Glycoalkaloids" submitted, September, 2007.