دراسة محتوى حبوب فول الصويا من الإيزوفلافونات

إعداد طالبة الماجستير

سهير النقري*

إشراف الأستاذ الدكتور **ومشاركة الدكتور**

أحمد سمير النوري** **أنطون اللحام*****

الملخص

خلفية البحث وهدفه: تمتلك الإيزوفلافونات الموجودة في حبوب فول الصويا تأثيرات إيجابية في صحة الإنسان، وبشكل خاص تأثيرها الواقي من السرطان. ينشأ هذا التأثير الإيجابي للإيزوفلافونات كنتيجة للخواص المضادة للأكسدة أو الفعالية الإستروجينية أو تفاعلهما معاً.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد كمية ثلاث إيزوفلافونات رئيسة هي (الجينستين، الدايدزين والغليسيتين) في حبوب فول الصويا المأخوذة من ثلاثة مصادر مختلفة (منطقة الغاب، مزرعة كلية الزراعة، مستوردة من الصين) وإجراء مقارنة بينها.

مواد البحث وطرائقه: استخلصت الإيزوفلافونات من حبوب فول الصويا باستخدام مزيج الإيتانول مع الماء (80%:20%)، وأجريت المقايسة باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC).

النتائج: أظهرت النتائج أن حبوب فول الصويا المأخوذة من منطقة الغاب تحوي أعلى نسبة من الإيزوفلافونات (الجينستين 660.51 مكغ/غ، الدايدزين 390.33مكغ/غ و الغليسيتين 130.59 مكغ/غ) يليها حبوب الصويا المستوردة (الجينستين 628.44 مكغ/غ، الدايدزين 350.65مكغ/غ والغليسيتين 100.18 مكغ/غ) ثم الحبوب المأخوذة من كلية الزراعة (الجينستين 540.43 مكغ/غ، الدايدزين 300.61مكغ/غ والغليسيتين 78.55 مكغ/غ).

الاستنتاج: تحتوي حبوب فول الصويا على نسبة عالية من الإيزوفلافونات، وتختلف نسب هذه الإيزوفلافونات باختلاف مصدرها .

الكلمات المفتاحية: الإيزوفلافونات، فول الصويا، الاستخلاص.

* قسم العقاقير والنباتات الطبية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

** أستاذ- قسم العقاقير والنباتات الطبية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

*** قسم العقاقير والنباتات الطبية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

Study of Isoflavones Content in Soybean seeds

Sahar Alnokari*

Ahmad Samir Alnori** **Antoun ALlaham*****

Abstract

Background & Objective: Isoflavones occurring in soybean seed have a positive effect on the health of humans, especially in cancer prevention. This positive impact may be a result of their antioxidant properties, estrogenic activity, or a combination of both mechanisms.

The purpose of this study was to quantify and compare levels of three major isoflavones in soybean seeds from three sources (Alghab area, Faculty of Agriculture, imported from China).

Material& methods: Isoflavones have been extracted from soybean seeds by ethanol-water mixture (80%:20%), then they have been analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The results showed that soybean seeds taken from Alghab area contain the highest concentration of isoflavones (genistin 660.51µg/gr, diadzin 390.33 µg/gr and glycitin 130.59µg/gr) then comes imported seeds (genistin 628.44µg/gr, diadzin 350.65µg/gr and glycitin 100.81µg/gr) and Faculty of Agriculture(genistin 54.43µg/gr , diadzin 300.61µg/gr and glycitin 78.55 µg/gr), respectively.

Conclusion: Soybean seeds contain high percentage of isoflavones, and this Quantities of isoflavons differ according to their sources.

Key words: Isoflavones, soybean seeds, extraction.

* Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

** prof. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

*** Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

مقدمة:

فول الصويا نبات بقولي موطنه الأصلي في جنوب شرق آسية، يعرف أيضاً بالفاصولياء الذهبية وهو واحد من النباتات القليلة جداً الذي يؤمن نوعية جيدة من البروتينات فهو يحتوي على جميع الحموض الأمينية الأساسية وبالكمية التي يحتاج إليها جسم الإنسان، وهو بالوقت نفسه منخفض الكلفة، كما أنه يحتوي على المغذيات الكبرى الثلاث وعلى الألياف و الفيتامينات والمعادن.[1]

يؤمن فول الصويا غالبية المتطلبات العالمية من البروتين والزيت، وهذا ما جعله من أهم المحاصيل المزروعة وأكثرها قيمةً. وإن زيادة الاهتمام العالمي في العقد الأخير بفول الصويا ومنتجاته يعود إلى فوائده الغذائية والعلاجية.[2]

الوصف النباتي

يراوح ارتفاع النبات بين 20 سم كحد أدنى و2م كحد أعلى، وتتميز الأوراق بأنها مركبة حيث تملك كل ورقة ثلاث إلى أربع وريقات، أمَّا الأزهار فهي ذاتية الإلقاح وتتوضع عند إبط الورقة وتكون بلون أبيض، زهري أو أرجواني، والثمار عبارة عن قرون موبرة تنمو بشكل عنقودي وكل عنقود مكون من ثلاثة إلى خمسة قرون، القرن طوله (3-8) سم ويحتوي بداخله عادةً من اثنين إلى أربع حبات[3]،

التوزع الجغرافي الولايات المتحدة الأميركية، البرازيل، الأرجنتين، الصين، والهند.[4]

تشكل كلاً من الإيزوفلافونات و السابونينات غالبية المستقلبات الثانوية الموجودة في حبوب الصويا، وأصبحت قيمة حبوب فول الصويا حديثاً تقدر بمحتواها من الإيزوفلافونات فضلاً عن محتواها من الزيت والبروتين.[5]

الإيزوفلافونات:

مركبات فينولية تنضم لعائلة كبيرة هي الفلافونوئيدات، تكون الإيزوفلافونات عادةً على شكل أغليكون، غليكوزيد، أسيتيل غليكوزيد ومالونيل غليكوزيد[6]. الشكل المسيطر للإيزوفلافونات في فول الصويا هو الغليكوزيد والأغليكون[7]. تعدُّ الغليكوزيدات مركبات غير فعالة حيوياً تجري حلمهتها بعد الهضم بواسطة الفلورا المعوية أو (βغليكوزيداز) المعوية لتعطي الأغليكون وهو الجزء الفعال حيوياً الذي يمتصُّ مباشرةً من الأمعاء الدقيقة.[8]

يحتوي فول الصويا على ثلاث إيزوفلافونات رئيسة وهي الجينستين(genistein)، الدايدزين(daidzein) والغليسيتين(glycitein)، يعدُّ الجينستين أهم هذه الإيزوفلافونات وأكثرها فعالية، وتتمتع الإيزوفلافونات بخواص إستروجينية ضعيفة. وبخواص مضادة للأكسدة.[9]

الفوائد الطبية والتأثيرات العلاجية

نظراً إلى محتواه الغني بالإيزوفلافونات فإن السمة الأغلب لفول الصويا اليوم هي فوائده الصحية المتعلقة بالعلاج والوقاية من العديد من الأمراض المزمنة كالأمراض الوعائية القلبية، والسرطانات، والسكري، وتخلخل العظام، وتحسين الوظائف الإدراكية، وتخفيف أعراض سن الإياس.[10]

المواد والطرائق:

الاعتيان:

تعدُّ عملية أخذ العينات من أهم مراحل العمل التحليلي، فهي تتحكم بنتائج التحليل و بتفسير هذه النتائج.

أجريت الدراسة على عينات من حبوب فول الصويا مأخوذة من ثلاثة مصادر:

المصدر الأول: أربع عينات من المزرعة التابعة لكلية الزراعة في جامعة دمشق، ورمزت بالرموز الأتية:

(A1) , (A2) , (A3) , (A4).

المصدر الثاني: خمس عينات من منطقة الغاب في ريف حماه، ورمزت بالرموز الآتية:

(H1) , (H2) , (H3) , (H4) , (H5).

المصدر الثالث: ثلاث عينات مستوردة من الصين، ورمزت بالرموز الآتية:

(I1) , (I2) , (I3).

الاستنتاج:

تتصف الإيزوفلافونات التي تحمل مجموعات هيدروكسيل حرة أو التي ترتبط بجزيء سكر بالصفة القطبية. وعليه فهي تذوب في المذيبات القطبية مثل الإيتانول والميتانول والأسيتون والماء.[12]

اختيرت طريقة الاستخلاص بالمحلات القطبية بالاعتماد على خصائص الإيزوفلافونات، وذلك لسهولة تطبيقها ولعدم حاجتها إلى تجهيزات أو أدوات معقدة أو متطورة.

المحاليل المستخدمة

الإيتانول (إنتاج شركة panreac نقاوته 99.5%) (HPLC-grade).

ماء مقطر

حمض كلور الماء 1.0 نظامي

ميتانول (HPLC-grade)

الأجهزة المستخدمة

محرك مغناطيسي نوع Snijders (هولندا)

مطحنة مخبرية عيارية(UDY cyclone mill)

المثقلة نوع (Labofuge 1) لشركة (Heraeus-Germany).

ميزان حساس(±0.1) (Sartorius مغ)

المبخرة الدوراة (Buchi; Brinkmann, westbury,NY).

تحضير محلول الاستخلاص

يؤخذ 20 مل ماءً مقطراً ويوضع في حوجلة سعة 100مل ثم يكمل الحجم بالإيتانول وترج الحوجلة جيداً، فنحصل على مزيج الإيتانول مع الماء (80%:20%).

تحضير عينة الحبوب

توزن كمية معينة من الحبوب ثم تجفف حتى الحصول على وزن ثابت، ثم تطحن إلى بودرة ناعمة بواسطة مطحنة مخبرية عيارية.

خطوات الاستخلاص:[13]

وزن 1 غ من مطحون حبوب فول الصويا، وأضيف لها 10 مل من محلول الاستخلاص مزيج الإيتانول مع الماء(80%:20%) ومزجت مدة ساعتين بواسطة المحرك المغناطيسي وبدرجة حرارة الغرفة، ركزت الخلاصة بواسطة المثقلة بسرعة rpm3000 ومدة نصف ساعة ثم أخذت الخلاصات وجففت بالمبخرة الدوراة، حُلَّت الرسابة الناتجة عن التبخير من جديد بـ10 مل من محلول الميتانول 80%(HPLC-grade). وهكذا أصبحت الخلاصة جاهزة للقياس بجهاز HPLC وتحوي على الإيزوفلافونات المراد حساب تركيزها.

2.المقايسة باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)[14]

حسبت تراكيز كل من إيزوفلافونات الجينستين، الدايدزين و الغليسيتين في خلاصة مسحوق حبوب فول الصويا باستخدام جهاز الHPLC

المحاليل و المواد المستخدمة

ماء (HPLC grade)، إنتاج شركة Scharlau-Germany

حمض الخل الثلجي

محلول الأسيتونتريل

الكواشف المعيارية (standards) وقد استخدمت ثلاثة كواشف معيارية هي:

الجينستين (genistin)، الدايدزين (daidzin)، الغليسيتين (glycitin) ذو نقاوة 98%.

وجميعها من إنتاج شركة (Sigma- Aldrish Germany) المتخصصة في إنتاج المواد الكيميائية والكواشف المعيارية.

ميتانول (HPLC-grade) إنتاج شركة Panreac

شروط الفصل[15]

عمود فصل C18 (150×4.6مم)

طور متحرك مكون من محلول A (أسيتونتريل + 0,1% حمض الخل الثلجي)

ومحلول B (ماء+ 0,1% حمض الخل الثلجي).

معدل تدفق 1 مل/دقيقة

درجة حرارة العمود ثابتة و مساوية لـ 25° م.

طول موجة المتحري 260 نانومتراً.

حجم العينة المحقونة 1 ميكروليتر

مبدأ الطريقة: يضخ الطور المتحرك السائل بضغط ما ضمن عمود من الفولاذ غير قابل للصدأ، حاوٍ على حبيبات مرتبطة بالطور الثابت، تحقن المادة المراد تحليلها عند رأس العمود من خلال عروة الحقن ويحصل فصل للمواد اعتماداً على التوزع بين الطورين الثابت والمتحرك.

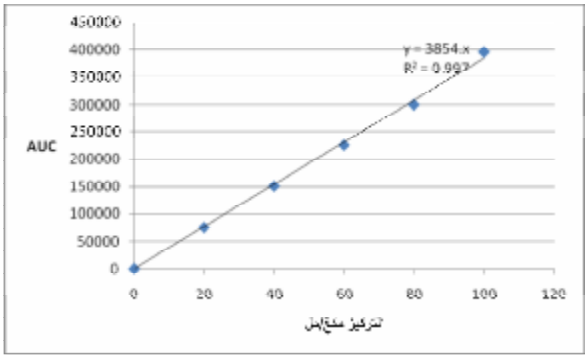
تحضير المحلول الأم (stock solution): حُلَّ(10) مغ من كل عياري من المعياريات الآتية: الجينستين(genistin)، الدايدزين (daidzin)، الغليسيتين (glycitin) في بالون سعة 100 مل، ثم أكمل الحجم بالميتانول 80% للحصول على محلول بتركيز 100مكغ/مل.

تحضير السلسلة العيارية: حضرت سلسلة عيارية بتراكيز 20، 40، 60، 80، 100مكغ/مل.

وذلك بأخذ الحجوم (2، 4، 6، 8، 10) مل من المحلول الأم ووضعها في بالون سعة 10 مل ثم أكمل الحجم بالميتانول 80% إلى خط العيار.

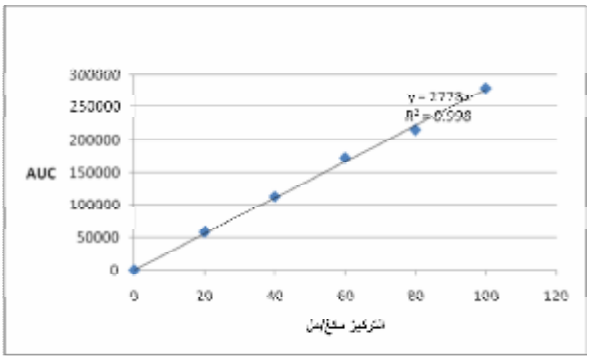
حقنت المحاليل المحضرة سابقاً بعد ترشيحها بالمراشح الميكرونية (µm0.45) المعدة للHPLC في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. ومثلت العلاقة بين قيم المساحة تحت المنحنى (Curve) Area Under والتركيز بيانياً، كما في الأشكال (1,2,3):

الجينستين (Genistin)



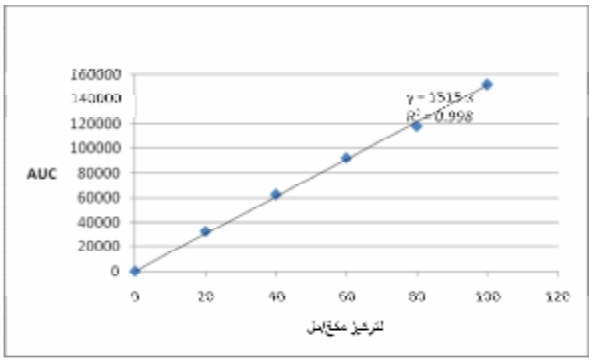
الشكل رقم(1): المنحنى البياني للعلاقة بين المساحة تحت المنحنى (AUC) و التركيز للمعياري الجينستين

الدايدزين(Daidzin)



الشكل رقم (2): المنحنى البياني للعلاقة بين المساحة تحت المنحنى(AUC) والتركيز للمعياري الدايدزين

الغليسيتين(Glycitin)



الشكل رقم(3) المنحنى البياني للعلاقة بين المساحة تحت المنحنى (AUC) والتركيز للمعياري الغليسيتين

تحضير العينة: أخذ حجم 50 ميكروليتراً من الخلاصة ورشح بمرشحة ميكرونية (µm0.45) ثم حقن منها ميكروليتر واحد في الجهاز.

الدراسة الإحصائية:

اعتمد اختبار T-Student لتحديد كون الفارق بين قيم الإيزوفلافونات المأخوذة من المصادر الثلاثة ناجماً عن الحظ والمصادفة أم أنه ذو فارق جوهري وذو دلالة إحصائية.

عُدَّ الفارق جوهرياً وذا دلالة إحصائية عند قيمة $P \leq 0.05$ وحللت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج Excel Microsoft نسخة 2007.

النتائج:

كانت نتائج مقايسة إيزوفلافونات (الجينستين- الدايدزين- الغليسيتين) المستخلصة من حبوب فول الصويا باستخدام مزيج الإيتانول مع الماء، كما هو مبيّن بالجداول (1,2,3):

العينات المأخوذة من كلية الزراعة:

جدول رقم (1): تراكيز الإيزوفلافونات في عينات كلية الزراعة

رقم العينة	Gin	Din	Glin
A1	540	300.5	78.8
A2	541	298.72	78.1
A3	539.9	301	79
A4	540.82	300.41	78.31
	Average: 540.43 Standard Deviation: 0.560	Average: 300.16 Standard Deviation: 0.993	Average: 78.55 Standard Deviation: 0.418

التركيز محسوب بالـ µg/gr.

العينات المأخوذة من منطقة الغاب

جدول رقم (2): تراكيز الإيزوفلافونات في عينات منطقة الغاب

رقم العينة	Gin	Din	Glin
H1	660.5	390.21	130
H2	660.22	390	130.42
H3	660	390.8	131
H4	661.14	390.42	130.8
H5	660.7	390.2	130.74
	Average: 660.51 Standard Deviation: 0.441	Average: 390.33 Standard Deviation: 0.304	Average: 130.59 Standard Deviation: 0.391

التركيز محسوب بالـ µg/gr.

العينات المستوردة:

جدول رقم (3): تراكيز الإيزوفلافونات في العينات المستوردة

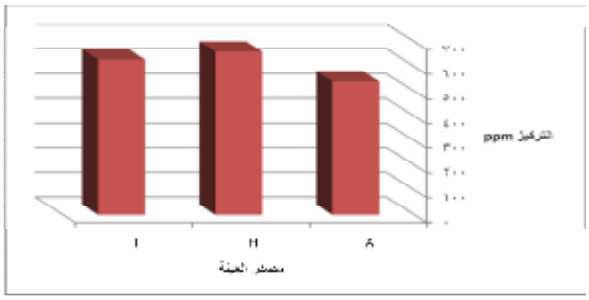
رقم العينة	Gin	Din	Glin
I1	628.4	350.8	100
I2	628.22	350.74	100.2
I3	628.7	350.4	100.34
	Average: 628.44 Standard Deviation: 0.242	Average: 350.65 Standard Deviation: 0.22	Average: 100.18 Standard Deviation: 0.170

التركيز محسوب بالـ µg/gr.

مناقشة النتائج:

أجريت مقارنة بين مصادر فول الصويا الثلاثة (كلية الزراعة- منطقة الغاب -المستوردة) التي رمِّزت مسبقاً (I- H-A) على التوالي، من حيث محتواها من إيزوفلافونات (الجينستين- الدايدزين- الغليسيتين). كما هو مبيّن بالأشكال (4,5,6):

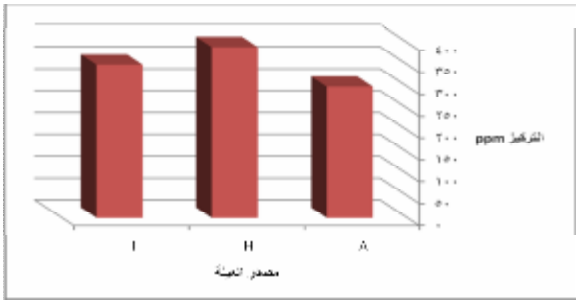
مقارنة المحتوى من إيزوفلافون الجينستين



الشكل رقم (4): مقارنة بين عينات فول الصويا الثلاث من حيث محتواها من إيزوفلافون الجينستين

أظهرت الدراسة عدم وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين قيم إيزوفلافون الجينستين في العينات الثلاث إذْ كانت قيمة(P=1.6) بين عينات كلية الزراعة وعينات منطقة الغاب، في حين كانت قيمة (P=1.2) بين عينات منطقة الغاب والعينات المستوردة، وكانت قيمة (P=2.6) بين عينات كلية الزراعة والعينات المستوردة.

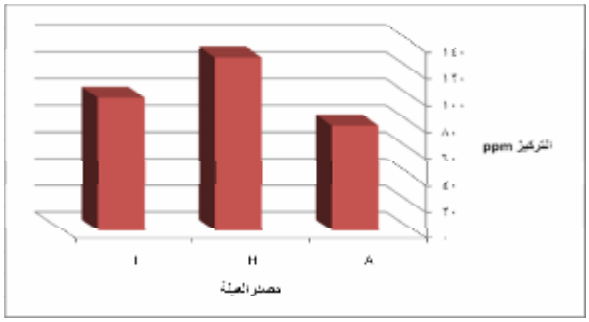
مقارنة المحتوى من إيزوفلافون الدايدزين



الشكل رقم(5): مقارنة بين عينات فول الصويا الثلاث من حيث محتواها من إيزوفلافون الدايزين

أظهرت الدراسة عدم وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين قيم إيزوفلافون الدايدزين في العينات الثلاث إذْ كانت قيمة (P=6.1) بين عينات كلية الزراعة وعينات منطقة الغاب، في حين كانت قيمة (P=3.2) بين العينات المأخوذة من الغاب والعينات المستوردة، وكانت قيمة (P=5.9) بين عينات كلية الزراعة والعينات المستوردة.

مقارنة المحتوى من إيزوفلافون الغليسيتين



الشكل رقم (6): مقارنة بين عينات فول الصويا الثلاث من حيث محتواها من إيزوفلافونات الغليسيتين

أظهرت الدراسة عدم وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين قيم إيزوفلافون الغليسيتين في العينات الثلاث إذْ كانت قيمة (P= 3.7) بين عينات كلية الزراعة و عينات منطقة الغاب، في حين كانت قيمة (P=1.2) بين العينات المأخوذة من الغاب والعينات المستوردة، وكانت قيمة (P=4.3) بين عينات كلية الزراعة والعينات المستوردة.

نستنتج من المقارنات السابقة ما يأتي:

تحتوي حبوب فول الصويا على نسب عالية من إيزوفلافونات (الجينستين، الدايدزين، الغليسيتين).

يوجد إيزوفلافون الجينستين بأعلى نسبة في حبوب فول الصويا، تليها إيزوفلافون الدايدزين ثم إيزوفلافون الغليسيتين.

العينة المأخوذة من منطقة الغاب تحتوي على أكبر كمية من الإيزوفلافونات المدروسة، يليها العينة المستوردة ثم العينة المأخوذة من كلية الزراعة، لكن الفارق لم يكن ذا دلالة إحصائية.

التوصيات:

الاهتمام بزراعة نبات فول الصويا في سورية وتخصيص مساحات واسعة لزراعته.

توعية المجتمع بفوائد فول الصويا العديدة واستخدامه بوصفه بديلاً غذائياً صحياً للعديد من الأغذية الصنعية الضارة.

Reference

1- Grieshop C. M, Kadzere C. T, Clapper G. M, Flickinger E. A. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *J. Agric. Food Chem.* 2003;*51:* 7684-7691.

2- Katsvairo T. W, Cox. W. J. Economics of cropping systems featuring different rotations, tillage, and management. journal of functional food**.** 2000;92:485-493.

3- Chung J, Babka H. L, Graef G. L, Staswick P. E. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group.*Crop Sci.* 2003**;***43 :*1053-1067.

4- Jin Hwan Lee, In-Youl Baek, Jong-Min Ko. Profiles of Compositional Components in Vegetable Soybeans. J. Appl. Biol. Chem.2007; 50: 63-69.

5- Tsukamoto C, Shimada S, Igita S, Kokubun M. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development, J. Agric. Food. Chem. 1995;43:1184-1192.

6- Zubik L, Meydani M. Bioavailability of Soybean Isoflavones from Aglycone and Glucoside Forms in American Women. Am. J.Clin Nutr.2003; 77: 1459-1465.

7- Klejdus BI, Mikelovaa R, Petrlovaa J. Evaluation of Isoflavone Aglycon and Glycoside Distribution in Soy Plants and Soybeans by Fast Column High-Performance Liquid Chromatography Coupled with a Diode-Array Detector. J Agric Food Chem. 2005; 53: 5848-5852.
8- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary Phytoestrogenes and health.
Phytochemistry. 2004; 65: 995–1016.
9- Lee. J, Retina. M, Fioritto. RJ, Martin. SK, Schwartz. SJ, Vodovotz. Y, Isoflavone Characterization and Antioxidant Activity of Ohio Soybeans. J Agri Food Chem. 2004; 52: 2647-2651.
10- Jooyandeh H. Soy Products as Healthy and Functional Foods. Middle-East Journal of Scientific Research. 2011; 1: 71-80.
11- Murphy PA, Barua K, Hauck CC. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. J Chromatogr B Analyte Technol Biomed Life Sci. 2002; 777:38-129.
12- Allaoua Achouri, Joyce Irene Boye , Denis Belanger. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. Food Research International. 2005; 38: 1199–1204.
13- Griffith, A. P., and Collison, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-massspectrometry. J.Chromatogr. 2001; 913: 397–413.
14- Mercedes C. Carrao-Panizzi, Silvana Pedroso de Goes Favoni and Akio Kikuchi. Extraction time for soybean isoflavone determination.Brazilian Archives of Biology and Technology. 2002; 45: 515-518.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2012/6/24.
تاريخ قبوله للنشر 2012/10/17.