

Antioxidant-activiteit van *Mucuna pruriens*

S.B.A. Halkes, A. Niedziela, E. van den Worm, H.C. Quarles van Ufford, C.J. Beukelman, A.J.J. van den Berg

De bonen van *Mucuna pruriens* (fluweelboon of jeukboon) bevatten hoge concentraties aan levodopa en worden gebruikt voor de (aanvullende) behandeling van de ziekte van Parkinson (ZvP; zie ook elders in dit tijdschrift). De levodopa uit de gepoederde bonen van *M. pruriens* heeft een goede biologische beschikbaarheid [1,2] en klinische studies hebben aangetoond dat producten op basis van *M. pruriens* het motorisch disfunctioneren en andere aan de ZvP gerelateerde symptomen kunnen verbeteren [2,3].

Hoewel de therapeutische werking van *M. pruriens* bij de ZvP voornamelijk lijkt te moeten worden toegeschreven aan de aanwezigheid van levodopa, wordt ook verondersteld dat inhoudsstoffen in de bonen met neuroprotectieve en antioxidatieve eigenschappen een bijdrage kunnen leveren [4,5]. Het feit dat oxidatieve stress een rol speelt bij het ontstaan van beschadigingen van de zenuwcellen in de hersenen en de pathogenese van de ZvP (zie referentie [6] en elders in dit tijdschrift) was aanleiding om de antioxidant-capaciteit van *M. pruriens* nader te onderzoeken. In dit artikel worden de resultaten van dit laboratoriumonderzoek kort besproken.

GEbruikte ONDERzoeksmethoden

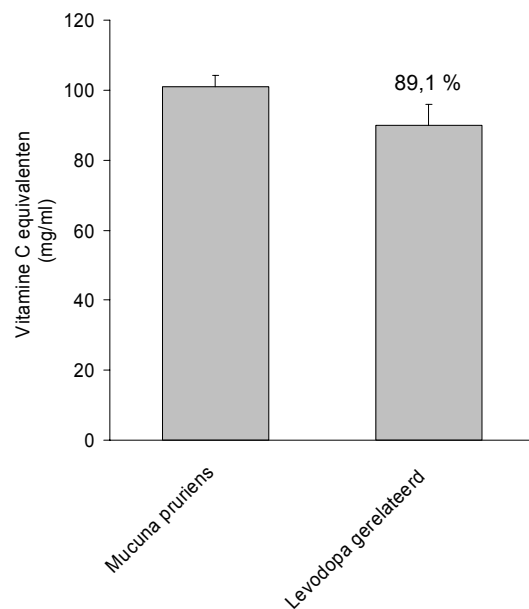
Extracten van het poeder van *M. pruriens* bonen (HP-200; Surya Products, Tuil) werden onderzocht op antioxidant-activiteit met behulp van verschillende laboratoriumtesten. Zo werd het poeder van de *M. pruriens* bonen gedurende 30 minuten geëxtraheerd in kokende 75% ethanol en werd dit extract getest op het vermogen om het stabiele vrije radicaal 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl te reduceren (DPPH-test) volgens de door Du Toit *et al.* [7] beschreven methode. De gepoederde bonen werden daarnaast geëxtraheerd met een mengsel van aceton, water en azijnzuur (140:59:1) en onderzocht in de *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) test volgens de door Ou *et al.* [8] beschreven methode. De gepoederde bonen werden ten slotte ook gedurende 30 minuten gekookt in 80 % ethanol en getest op het vermogen om erythrocyten te beschermen tegen oxidatieve schade (*cell-based antioxidant protection test in erythrocytes* (CAPE-test)) volgens de door Honzel *et al.* [9] beschreven methode.

Ter vergelijking werden ook enkele veelvuldig in de voeding gebruikte bonensoorten getest in de drie bovengenoemde antioxidanttesten. Hiertoe werden rode *kidney*-bonen, bruine bonen, sojabonen, groene bonen, limabonen, rode linzen, kikkererwten, tuinbonen en mungbonen (in ontkiemde vorm bekend als taugé) ge(vries)droogd, tot poeder vermalen en op de hierboven beschreven manieren geëxtraheerd.

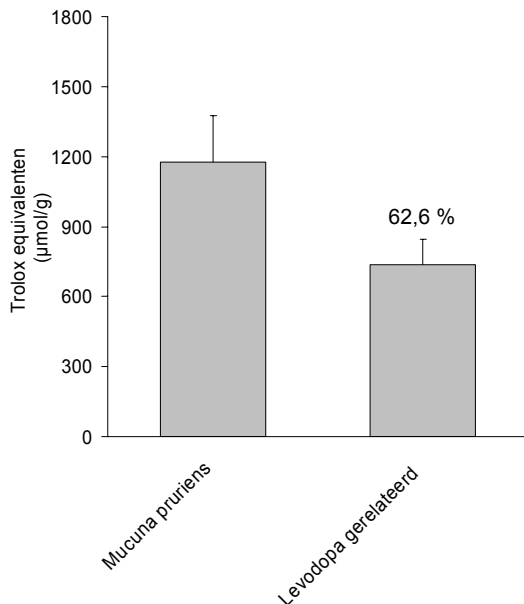
RESULTATEN

Extracten van *M. pruriens* bonen vertoonden een hoge antioxidant-activiteit in de DPPH-test (figuur 1), de ORAC-test (figuur 2) en de CAPE-test (figuur 3). De antioxidant-activiteit van *M. pruriens* was vele malen groter dan die van bonensoorten die veel in de voeding en/of gezondheidsproducten (soja) worden gebruikt (figuur 4). Het vermogen om DPPH te reduceren was

20 tot zelfs 300 maal groter voor de uit *M. pruriens* verkregen extracten dan voor de extracten uit de andere bonensoorten. In de ORAC-test bleek *M. pruriens* 4 tot 40 keer actiever te zijn dan de andere bonen. In tegenstelling tot *M. pruriens* kon voor geen van de veelvuldig in de voeding gebruikte bonensoorten een intracellulaire antioxidant-activiteit (zoals gemeten met de CAPE-test) worden aangetoond. De antioxidant-activiteit van de extracten uit *M. pruriens* in de DPPH- en ORAC-test kon voor een belangrijk deel worden toegeschreven aan het aanwezige levodopa (figuren 1 en 2). De aanwezigheid van levodopa kon de intracellulaire antioxidant-activiteit zoals gemeten met de CAPE-test echter niet verklaren; in concentraties tot tien maal hoger dan de effectieve dosering van het extract uit de boon van *M. pruriens* vertoonde levodopa namelijk geen enkele werkzaamheid in deze test.



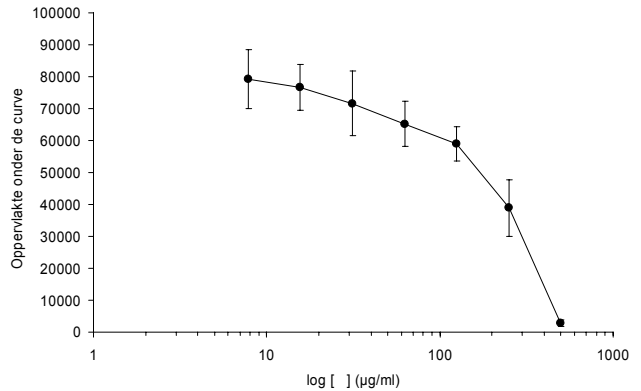
Figuur 1: Antioxidant-activiteit van *M. pruriens* bonen gemeten als de reductie van het stabiele radicaal 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH-test). Het percentage van de antioxidant-activiteit van *M. pruriens* dat kon worden gerelateerd aan levodopa, werd berekend met behulp van de experimenteel vastgestelde antioxidant-activiteit van levodopa en een gemeten levodopagehalte in de bonen van 2,6%. De antioxidant-activiteit wordt uitgedrukt in vitamine C equivalenten en de weergegeven waarden representeren het gemiddelde \pm SD van drie afzonderlijke experimenten.



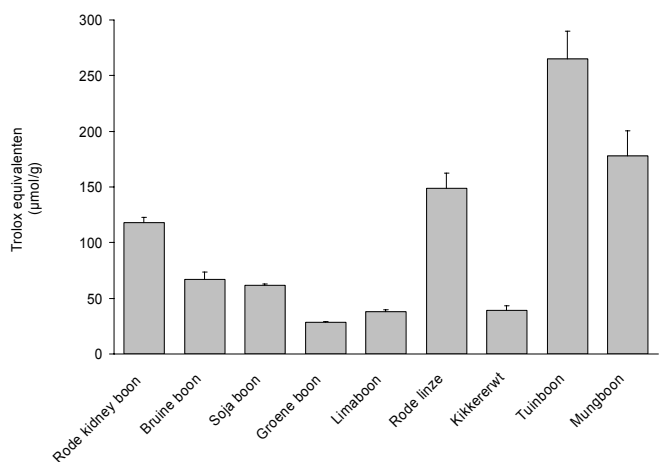
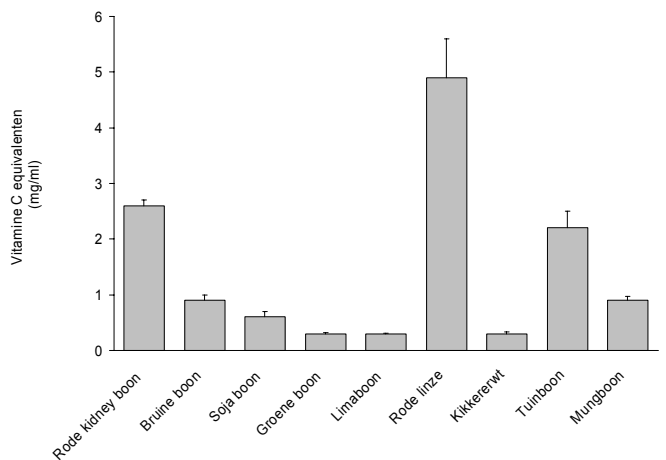
Figuur 2: Antioxidant-activiteit van *M. pruriens* bonen gemeten in de oxygen radical absorbance capacity (ORAC) test. Het percentage van de antioxidant-activiteit van *M. pruriens* dat kon worden gerelateerd aan levodopa, werd berekend met behulp van de experimenteel vastgestelde antioxidant-activiteit van levodopa en een gemeten levodopagehalte in de bonen van 2,6%. De antioxidant-activiteit wordt uitgedrukt in Trolox (een wateroplosbare vitamine E analoog) equivalenten en de weergegeven waarden representeren het gemiddelde \pm SD van drie afzonderlijke experimenten.

CONCLUSIES EN DISCUSSIE

Extracten van de bonen van *M. pruriens* hebben een zeer hoge antioxidant-activiteit, zeker in vergelijking met een aantal veelvuldig in de voeding gebruikte bonensoorten. Deze bevinding komt overeen met eerdere in de literatuur beschreven experimenten [10,11,12]. Hoewel de gemeten antioxidant-activiteit van *M. pruriens* in de DPPH- en ORAC-test grotendeels kan worden toegeschreven aan de aanwezigheid van levodopa, lijken ook andere inhoudsstoffen in dit opzicht een bijdrage te leveren. Aanwijzingen hiervoor werden verkregen in experimenten waarin een dunnelaag-chromatografische scheidingstechniek werd gecombineerd met de DPPH test en waarbij andere stoffen dan levodopa eveneens in staat bleken om DPPH te reduceren (gegevens niet getoond). Een andere interessante bevinding uit dit onderzoek is dat de met de CAPE-test gemeten intracellulaire antioxidant-activiteit van *M. pruriens* niet kon worden gerelateerd aan de aanwezigheid van levodopa. Dit lijkt erop te duiden dat – in tegenstelling tot levodopa – andere inhoudsstoffen in *M. pruriens* beter in staat zijn om de cel binnen te dringen en daar een antioxidatieve werking te ontplooiën. Mogelijk is het ook zo dat de boon van *M. pruriens* stoffen bevat die de permeabiliteit van de celmembranen verhogen waardoor meer levodopa in de cel kan doordringen en daar een antioxidatieve activiteit kan vertonen. Op basis van de uitgevoerde experimenten lijkt de laatste verklaring het meest waarschijnlijk omdat de extracten van *M. pruriens* de integriteit van de celmembranen bleken te beïnvloeden; bij hogere concentraties van de extracten werd namelijk een verhoogde afgifte van hemoglobine uit de



Figuur 3: Intracellulaire antioxidant-activiteit van *M. pruriens* bonen gemeten in de cell-based antioxidant protection test in erythrocyten (CAPE-test). De weergegeven waarden representeren het gemiddelde \pm SD van drie afzonderlijke experimenten.



Figuur 4: Antioxidant-activiteit van verschillende bonensoorten die veelvuldig in de voeding worden gebruikt. De antioxidant-activiteit zoals die werd bepaald met behulp van de DPPH-test staat weergegeven in het bovenste deel van de figuur. De resultaten van de ORAC-test staan weergegeven in het onderste deel van de figuur. De weergegeven waarden representeren het gemiddelde \pm SD van drie afzonderlijke experimenten.

erythrocyten waargenomen.

Omdat een overmatige productie van reactieve zuurstofmetabolieten en radicalen een rol lijkt te spelen in de



Mucuna pruriens

pathogenese van de ZvP, zou de werkzaamheid van *M. pruriens* bij de behandeling van de ZvP – in ieder geval ten dele en in aanvulling op de directe inwerking op de dopaminerge neuronen – kunnen worden toegeschreven aan de hoge antioxidant-activiteit van de bonen. Het hoge gehalte aan levodopa in de bonen van *M. pruriens* maar eventueel ook de aanwezigheid van andere inhoudsstoffen met een antioxidatieve werking en/of de aanwezigheid van stoffen die de biologische beschikbaarheid van levodopa verhogen, zouden hierbij met name van belang zijn. Eerder is echter beschreven dat hoge levodopa-concentraties ook kunnen resulteren in pro-oxidatieve en neurotoxische effecten [13,14]. Daarom is verder onderzoek naar de eventuele therapeutische waarde van *M. pruriens* voor Parkinsonpatiënten noodzakelijk, vooral ook om een goede afweging te kunnen maken van de voor- en nadelen van *M. pruriens*.

AUTEURSGEGEVENS:

Dr. S.B.A. (Bart) Halkes, dr. E. (Edwin) van den Worm, ing. H.C. (Linda) Quarles van Ufford, dr. C.J. (Kees) Beukelman en dr. A.J.J. (Bert) van den Berg zijn verbonden aan de Disciplinarygroep *Medicinal Chemistry & Chemical Biology*, Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht. S.B.A. Halkes, C.J. Beukelman en A.J.J. van den Berg zijn ook werkzaam bij PhytoGeniX, een bedrijf dat zich richt op het wetenschappelijk onderzoek aan bestaande fytotherapeutica en de ontwikkeling van nieuwe plantaardige geneesmiddelen. E. van den Worm is ook directeur van ORAC-Europe, een bedrijf

dat is gespecialiseerd in het meten van antioxidant-activiteit in, onder andere, voedingsmiddelen, functionele voeding en kruidenpreparaten. A. (Anna) Niedziela is een Poolse farmacistudente, die het in dit artikel beschreven onderzoek heeft uitgevoerd.

REFERENTIES

- 1 Mahajani SS, Doshi VJ, Parikh KM, Manyam BV. Bioavailability of L-dopa from HP-200 – a formulation of seed powder of *Mucuna pruriens* (Bak): a pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *Phytother Res* 1996;10:254-6.
- 2 Katzenschlager R, Evans A, Manson A. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical trial and pharmacological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75, 1672-7.
- 3 Parkinson's Disease Study Group. An alternative medicine treatment for Parkinson's disease: results of a multicenter clinical trial. *J Altern Complement Med* 1995;1(3):249-55.
- 4 Manyam BV, Dhanasekaran M, Hare TA. Neuroprotective effects of the antiparkinson drug *Mucuna pruriens*. *Phytother Res* 2004;18:706-12.
- 5 Latté KP. *Mucuna pruriens* (L.)DC. – Die Juckbohne. *Ztsch Phytother* 2008;29:199-206.
- 6 Tsang AHK, Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:643-50.
- 7 Du Toit R, Volsteed Y, Apostolides Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001;166(1-2):63-9.
- 8 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49(10):4619-26.
- 9 Honzel D, Carter SG, Redman KA, Schauss AG, Endres JR, Jensen GS. Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *J Agric Food Chem* 2008;18:8319-25.
- 10 Tripathi YB, Upadhyay AK. Antioxidant property of *Mucuna pruriens* Linn. *Curr Sci* 2001;80(11):1377-8.
- 11 Tripathi YB, Upadhyay AK. Effect of the alcohol extract of the seeds of *Mucuna pruriens* on free radicals and oxidative stress in albino rats. *Phytother Res* 2002;16:534-8.
- 12 Rajeshwar Y, Kumar GPS, Gupta M, Mazumder UK. Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *Eur Bull Drug Res* 2005;13(1):31-9.
- 13 Spencer JP, Jenner A, Butler J, Aruoma OI, Dexter DT, Jenner P, Halliwell B. Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Res* 1996;24(2):95-105.
- 14 Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Brus R. Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. *Amino Acids* 2002;23:57-63.