SCIENTIFIC REPORTS /ABOUT /EDITORIAL BOARD /FOR AUTHORS

Sci Rep . 2015; 5: 11078. PMCID: PMC4460905
Publié en ligne le 9 juin 2015 doi: 10.1038 / srep11078 PMID: 26058043

Lévodopa chez *Mucuna pruriens* et sa dégradation

Haridas Pulikkalpura , [1] Rajani Kurup , [2] Paravanparampil Jacob Mathew , [1] et Sabulal Baby [a, 2]

[1]Plant Genetic Resource Division, Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute, Pacha-Palode, Thiruvananthapuram 695 562, Kerala, India
[2]Phytochemistry and Phytopharmacology Division, Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute, Pacha-Palode, Thiruvananthapuram 695 562, Kerala, India
[a]Email: sabulal@gmail.com

Received 2015 Jan 12; Accepted 2015 May 13.

Copyright © 2015, Macmillan Publishers Limited

Ce travail est distribué sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International. Les images ou autres éléments tiers de cet article sont inclus dans la licence Creative Commons de cet article, sauf indication contraire indiquée sur la ligne de crédit. si le contenu n'est pas inclus dans la licence Creative Commons, les utilisateurs devront obtenir l'autorisation du détenteur de la licence pour reproduire le contenu. Pour voir une copie de cette licence, visitez http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Abstrait

Mucuna pruriens est la source naturelle la plus connue de L-dopa, l'étalon-or du traitement de la maladie de Parkinson. *Les* variétés de *M. pruriens* sont des suppléments riches en protéines et sont utilisées dans le monde entier comme aliments et fourrages. Nous rapportons ici le contenu L-dopa dans les graines de cinquante - six accessions de quatre *M. pruriens* variétés, *M. pruriens* var. *pruriens* , *M. pruriens* var. *hirsuta* , *M. pruriens* var. *utilis* et *M. pruriens* var. *thekkadiensis* , quantifié par HPTLC-densitometry. La teneur en L-dopa variait entre 0,58 et 6,42 (%, poids dr.). Génotypes / chimotypes de L-dopa à rendement élevé et faible*M. pruriens* pourrait être multiplié à des fins médicinales et nutritionnelles, respectivement. Les profils HPTLC des graines de *M. pruriens* après extraction répétée (24 h) dans un acide formique-alcool 1: 1, suivi d'un développement au butanol: acide acétique: eau (4: 1: 1, v / v) ont montré une dégradation constante de la L-dopa (*Rf* 0,34 ± 0,02) en un second pic (*Rf* 0,41 ± 0,02). Une dégradation moyenne de 52,11% de la L-dopa a été constatée dans les graines de variétés *M. pruriens* . Depuis *M. pruriens* graines et / ou L-dopa sont utilisés pour le traitement de la maladie de Parkinson et comme un aphrodisiaque aussi bien dans les systèmes modernes et / ou de la médecine traditionnelle, la découverte de haut niveau de dégradation L-dopa (sous une forme pure et *M pruriens*extraits) en quinones dommageables et ROS est très significatif.

Mucuna pruriens (L.) DC. est une légumineuse grimpante distribuée à travers les tropiques. Quatre variétés de l'espèce ont été répertoriées à ce jour dans le sud de l'Inde, dont *M. pruriens* var. *pruriens* est bien distribué [1] , [2] . *M. pruriens* var. *hirsuta* et *M. pruriens* var. *thekkadiensis* se limitent au sud de la péninsule indienne et *M. pruriens* var. *utilis* ne se produit que dans la culture [2] . *M. pruriens* var. *pruriens* et *Mucuna pruriens* var. *utilis*trouvent leur importance en tant que denrées alimentaires, aliments pour animaux, cultures de couverture et fourrages et sont largement cultivés dans le monde [3] , [4] , [5] , [6] . *Les* variétés de *M. pruriens se* propagent principalement par leurs graines. *M. pruriens* var. *pruriens* est mieux connu comme la source naturelle de l'acide aminé aromatique, la L-3,4-dihydroxy phénylalanine (lévodopa ou L-dopa) (figure 1). La L-dopa est largement utilisée pour le traitement clinique de la maladie de Parkinson (maladie de Parkinson) [7] , [8] , [9] , [10] , [11] , maladie neurodégénérative

. Semences de *M. pruriens* var. *pruriens*ont longtemps été utilisés en médecine traditionnelle indienne pour le traitement de la MP et également pour ses propriétés aphrodisiaques. *M. pruriens* var. *pruriens* est la seule variété de *M. pruriens* étudiée de manière approfondie pour ses propriétés chimiques et biologiques [12, 13, 14, 15, 16, 17]. La L-dopa, la 5-méthoxy-N, la N, la diméthyl tryptamine et la 5-hydroxy tryptamine (sérotonine) sont les principaux constituants thérapeutiques de *M. pruriens* var. *pruriens* .

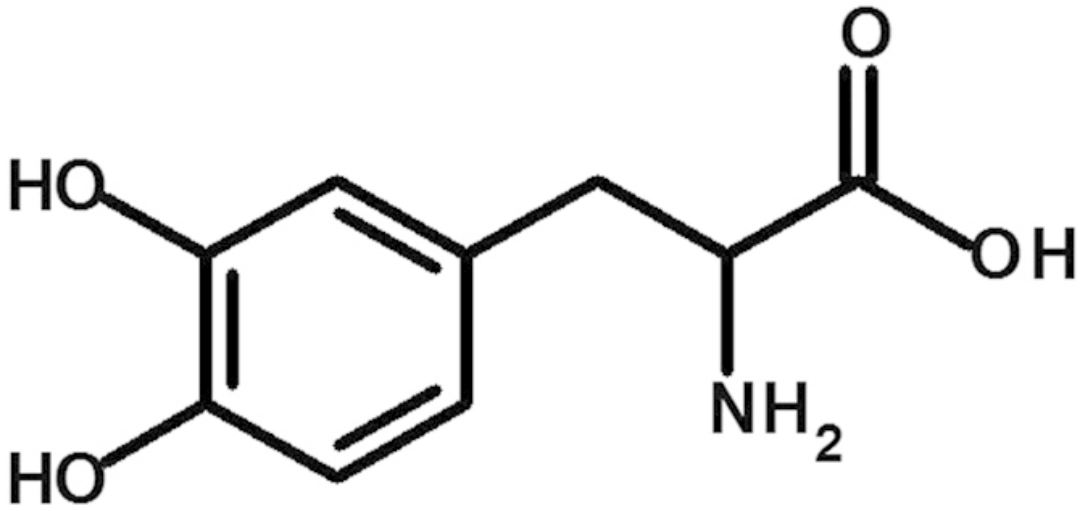


Figure 1

Lévodopa.

La MP se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra et une déficience ultérieure en neurotransmetteur dopamine dans les régions du cerveau. La MP affecte les activités motrices, y compris l'écriture et la parole. Des études récentes ont suggéré que le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial et l'altération du système ubiquitine-protéasome soient les principaux facteurs impliqués dans la pathogenèse de la MP [18]. Les patients atteints de MP sont traités à la L-dopa pour améliorer leurs fonctions motrices. La dopamine en tant que telle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, contrairement à la L-dopa et, dans le système nerveux central, la dopa décarboxylase le convertit en dopamine. Ainsi, la L-dopa agit comme un précurseur de la dopamine. Jusqu'à présent, la L-dopa est considérée comme la référence pour le traitement de la MP et de la dystonie sensible à la dopamine [7, 8, 9, 10, 11, 19]. Le stress oxydatif, provoqué par l'oxydation de la L- dopa et de la dopamine, générant des semiquinones, des quinones, des radicaux oxygène et d'autres espèces réactives de l'oxygène à oxygène (ROS), joue un rôle dans la mort des cellules neuronales chez les PD[20, 21]. De plus, lesproduits *O*- quinone de l'autoxydation de L-dopa sont cytotoxiques pour les systèmes cellulaires[22, 23, 24, 25]. La L-dopa est également un facteur antinutritionnel et sa consommation provoque des vomissements, des nausées, une distension abdominale, une dyskinésie, etc.[26]. Cela est dû à la conversion de la L-dopa en dopamine dans le système nerveux périphérique par la dopa décarboxylase. De plus, *M. pruriens* var. *pruriens* et la L-dopa pourraient récupérer une perte spermatogène, ce qui en fait le traitement de choix de l'infertilité [27, 28].

Vachhani *et al* ., 2011 et Sundaram et Gurumoorthi, 2012, protocoles standardisés pour la quantification par HPTLC de la L-dopa chez *M. pruriens* var. graines de *pruriens* [29, 30]. Modi *et al* ., 2008 (5,60%, poids dr.), Behara *et al* ., 2010 (4,83%), Raina et Khatri, 2011 (2,23–5,36%) et Raina *et al* ., 2012 (3,29–5,44%) quantification de la teneur en L-dopa dans *M. pruriens* var. graines de *pruriens* par HPTLC [31, 32, 33, 34]. Mennickent *et al* ., 2007 [35] et Vachhani*et al* ., 2011 [29] estimation standardisée de la L-dopa dans des formulations pharmaceutiques basée sur la méthode HPTLC.

Kshirsagar *et al* ., 2008 [36] (2,11 à 2,19%), Modi *et al* ., 2008 [31] (3,80 à 4,30%) et Behara *et al* ., 2010 [32] (7,48 à 8,44%) dans des formulations commercialisées et capsules par HPTLC. Shah et Joshi, 2010 a estimé la L-dopa chez *M. pruriens* var. *Pruriens* (7,20%) et ses formulations (4,20-5,60%) par spectrofluorimétrie [37] . Le contenu de L-dopa dans les graines de *Stizolobium pruriens* var. *utilis* (*M. pruriens*var. *utilis*) (3,9–10,6%) [38] , *M. pruriens* var. *utilis* (4,39–5,21%) [5] et *M. pruriens* var. *pruriens* (4,0 à 6,0%) [6] ont été estimés par HPLC. Soumyanath *et al* ., 2012 ont quantifié la L-dopa dans *M. pruriens* var. préparations de *pruriens* (3,0 à 6,0%) par HPLC [39] . Singh *et al* ., 2010 ont mis au point une quantification de la L-dopa par HPLC chez *M. pruriens* var. *utilis* [40] . Jiang *et al* ., 2010 ont effectué une quantification HPLC-MS / MS de la L-dopa dans le plasma de rat[41] . Dethy *et al* ., 1997 ont déterminé les taux de L-dopa seuil dans le plasma de patients atteints de MP avancée parmicrodialyse *in vitro* -HPLC[42] .

La plupart des études de quantification de L-dopa dans les graines et les formulations de *M. pruriens* par des techniques chromatographiques (HPTLC, HPLC) portent sur un nombre limité d'échantillons et impliquent des procédures d'extraction multiples et prolongées dans des milieux acides. Le criblage d'un plus grand nombre de variétés / accessions de *M. pruriens* pourrait permettre de découvrir des accessions à rendement élevé (élite) et à faible teneur en L-dopa, adaptées à des fins médicinales et nutritionnelles, respectivement. Deuxièmement, dans notre profil préliminaire HPTLC des extraits de *M. pruriens* et du standard L-dopa, nous avons détecté à plusieurs reprises des signaux de dégradation labiles à base de L-dopa. La plupart des études HPTLC / HPLC similaires n'ont jamais enregistré ce signal de dégradation de la L-dopa [5] , [6] , [29] , [31] ,[32] , [33] , [34] , [35] , [36] , [38] , [39] , [40] , [41] , [42] . Nous rapportons ici (i) la teneur en L-dopa dans les graines de trente accessions des quatrevariétés de *M. pruriens* , à savoir *M. pruriens* var. *pruriens* (21), *M. pruriens* var. *hirsuta* (3), *M. pruriens* var. *utilis* (5) et *M. pruriens* var. *thekkadiensis*(1), recueillies dans divers endroits du Kerala, dans le sud de l'Inde, (ii) contenu de L-dopa dans des semences de deuxième génération de vingt-six obtentions de *M. pruriens* var. *pruriens* (21) et *M. pruriens* var. *utilis* (5) cultivé dans une parcelle expérimentale dans des conditions écologiques identiques, (iii) profils de dégradation de la L-dopa dans des extraits de graines de *M. pruriens* , (iv) quantification des produits dégradés en L-dopa dans des graines (30 sauvages, 26 EP cultivées) de quatre variétés de *M. pruriens* et v) caractérisation de fractions dégradées en L-dopa par HPTLC, DART-MS et LC / EI-MS.

Résultats

Teneur en L-dopa chez les variétés *M. pruriens*

Teneur en L-dopa chez *M. pruriens* sauvage var. *les* accessions de *pruriens* variaient de 0,89 à 6,42 (%, poids dr.) (Tableau 1). La teneur en pourcentage du deuxième pic de dégradation (SDP) variait de 0,1 à 3,85% (%, poids corporel, sur la base de l'étalonnage à la L-dopa) (tableau 1). En deuxième génération, *M. pruriens* var. *Les* graines de *pruriens* cultivées dans le PE, les teneurs en L-dopa variaient de 0,58 à 4,32% et le pourcentage de PDS, de zéro (non détectable) à 3,34%. Teneur en L-dopa dans les accessions sauvages de *M. pruriens* var. *hirsuta* variait de 1,01 à 4,27% et le pourcentage de PDS de 0,01 à 1,40%. Teneur en L-dopa dans les graines de *M. pruriens* var. *utilis*les accessions sauvages variaient de 0,65 à 2,67% et les teneurs en SDP de 0,12 à 3,82%. Dans les accessions de *M. pruriens* var. *utilis* , les teneurs en L-dopa allaient de 1,33 à 3,97% et les teneurs en SDP de zéro à 0,77%. *M. pruriens* var. l'accession sauvage *thekkadiensis a* montré 4,34% de L-dopa avec SDP 0,01% (tableau 1). La fructification n'a pas été observée chez *M. pruriens* var. *hirsuta* et *M. pruriens* var. *thekkadiensis* dans la banque de gènes au champ (FGB). Ceci est le premier signalement de quantification de L-dopa chez *M. pruriens* var. *hirsuta* et *M. pruriens* var.*thekkadiensis* . C'est également la première détermination quantitative des produits de dégradation de la L-dopa dans les graines de *M. pruriens* .

Tableau 1

Quantification de la L-dopa et de sa dégradation dans les semences de cinquante-six accessions de quatre variétés de *Mucuna pruriens* par HPTLC-densitométrie.

Acc. Non.	Lieu de collecte, quartier	Altitude (m)	Longitude	Latitude	L-dopa sauvage (%, poids dr.)	Sauvage, SDP (%, poids dr.) +	EP, L-dopa (%, poids dr.)	EP, SDP (%, poids dr.) +
Mucuna pruriens* var. *pruriens								
3656	Wandoor, Malappuram	65	E 76 ° 13,662 '	N 11 ° 11.621 '	3,42 ± 0,06	1,21 ± 0,00	2,17 ± 0,0014	0,30 ± 0,00
3666	Erimayur, Palakkad	90	E 76 ° 34,015 '	N 10 ° 39.409 '	2,64 ± 0,00	1,27 ± 0,00	1,54 ± 0,0069	2,88 ± 0,00
3822	Achenkovil, Kollam	111	E 77 ° 7.267 '	N 09 ° 05.549 '	3,37 ± 0,00	1,11 ± 0,00	0,84 ± 0,0087	2,93 ± 0,0243
3911	Payannur, Kannur	63	E 75 ° 5,844 '	N 12 ° 18.416 '	3,49 ± 0,00	0,34 ± 0,00	1,44 ± 0,00	3,27 ± 0,00
3912	Kappad, Kozhikode	1	E 75 ° 42.833 '	N 11 ° 23,599 '	1,63 ± 0,00	1,15 ± 0,00	1,04 ± 0,00	3,34 ± 0,00
4072	Mathur, Palakkad	125	E 76 ° 33,646 '	N 10 ° 44.656 '	3,51 ± 0,00	2,05 ± 0,00	0,58 ± 0,00	1,77 ± 0,0134
4077	Panathur, Kasaragod	123	E 75 ° 22.719 '	N 12 ° 29.267 '	2,34 ± 0,00	0,41 ± 0,00	2,54 ± 0,00	0,67 ± 0,00
4088	Malampuzha, Palakkad	135	E 76 ° 43.374 '	N 10 ° 49.401 '	3,03 ± 0,0014	0,15 ± 0,00	3,30 ± 0,0071	0,36 ± 0,00
4090	Elavenchery, Palakkad	93	E 76 ° 39,091 '	N 10 ° 35.758 '	0,97 ± 0,00	2,75 ± 0,00	2,93 ± 0,00	0,45 ± 0,00
4091	Pulpaire, wayanad	802	E 76 ° 09.662 '	N 11 ° 47.655 '	1,66 ± 0,00	2,96 ± 0,00	2,12 ± 0,0027	0.00 ± 0.00
4098	Pala, Kottayam	240	E 76 ° 38,660 '	N 09 ° 44.285 '	2,60 ± 0,00	0,79 ± 0,00	4,32 ± 0,0497	0.00 ± 0.00
4100	Muthalamada, Palakkad	143	E 76 ° 45,530 '	N 10 ° 36.595 '	0.95 ± 0.00	3.19 ± 0.00	2.83 ± 0.0035	0.65 ± 0.00
4101	Madavoor, Kozhikode	60	E 75° 44.110’	N 11° 21.523’	3.03 ± 0.00	0.58 ± 0.00	1.22 ± 0.00	3.16 ± 0.00
4283	Govindapuram, Palakkad	157	E 076° 49.002’	N 10° 36.866’	6.42 ± 0.0034	0.00 ± 0.00	1.21 ± 0.0024	2.16 ± 0.0320
	Changanassery,	90	E 076°	N 09°	2.61 ±	0.49 ±	3.99 ±	0.11 ±

Ouvrir dans une fenêtre séparée

SDP - Deuxième pic de dégradation; + SDP% calculé sur la courbe standard L-dopa; EP - Parcelle expérimentale; * La fructification est absente dans les accessions cultivées en FGB. Chaque valeur en pourcentage est une moyenne de six valeurs.

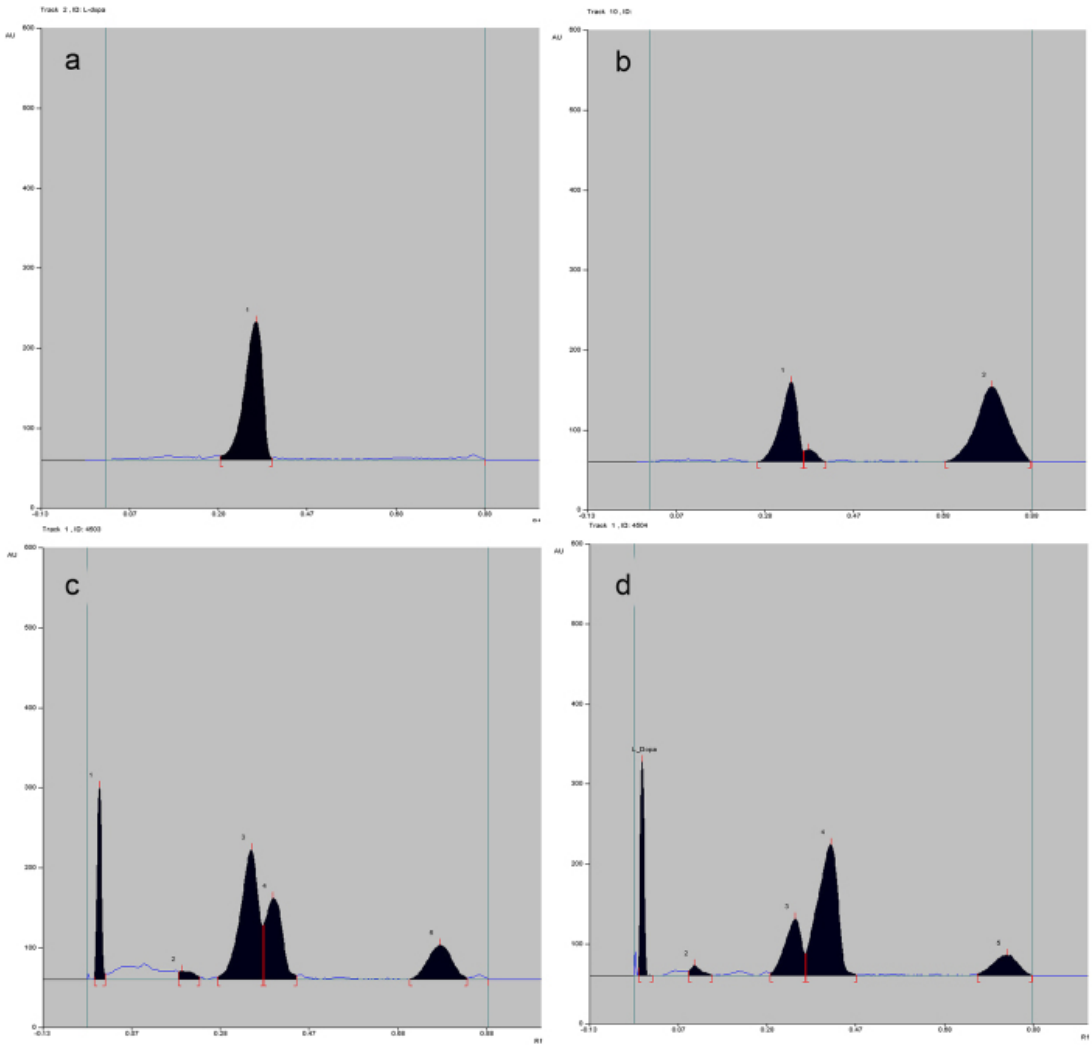
Dans *M. pruriens* sauvage var. *pruriens* , *M. pruriens* var. *hirsuta* et *M. pruriens* var. *Le* contenu en L-dopa des graines utilises n’a montré aucune corrélation positive avec les altitudes de leurs lieux de collecte (numéro d’accession 3912, 1 m, L-dopa / SDP 1,63% / 1,15%; numéro d’accession 4503, 10 m, L -dopa / SDP 1,78% / 3,85%; N ° d'acc. 4091, 802 m, L-dopa / SDP 1,66% / 2,96%) (tableau 1). *M. pruriens* var. *pruriens* et *M. pruriens* var. *Les* semences *utilis* dans EP dans des conditions identiques n'ont montré aucune corrélation dans les contenus de L-dopa avec leurs accessions parentales (sauvages) (Tableau 1).). Les teneurs les plus élevées en L-dopa ont été détectées dans les

graines d'accessions sauvages de *M. pruriens* var. *pruriens* (n ° d'accès 4283, 6,42%; n ° d'accession 4498, 6,11%), *M. pruriens* var. *thekkadiensis* (*numéro d'accession* 4147, 4,34%) et *M. pruriens* var. *hirsuta* (numéro d'accès 3820, 4,27%). Les pourcentages les plus bas de L-dopa ont été trouvés chez *M. pruriens* var. graines de *pruriens* (n ° d'accès 4072, 0,58%; n ° d'accession 3822, 0,84%) (tableau 1). Encore une fois, la L-dopa ayant le plus haut rendement en *M. pruriens*les graines (n ° d'accès 4283, 6,42%; n ° d'accent. 4498, 6,11%; n ° d'accès. 4147, 4,34%; n ° d'accès. 3820, 4,27%) ont présenté les niveaux de dégradation les plus bas (n ° d'accueil 4283, 0,00 %; Numéro d'accès 4498, 0,10%; numéro d'accès 4147, 0,01%; 3820, 0,01%). De même, les teneurs les plus faibles en L-dopa (numéro d'acc. 4072, 0,58%; numéro d'acc. 3822, 0,84%; numéro d'acc. 4100, 0,95%; numéro d'acc. 4090, 0,97%) ont été observées dans des graines à niveaux de dégradation (n ° d'accès 4072, 1,77%; n ° d'accès 3822, 2,93%; n ° d'accès 4100, 3,19%; n ° d'accès 4090, 2,75%) (tableau 1).

Le SDP total (72,15%) des accessions de *M. pruriens* sauvages (30) et cultivées dans du PE (26) représentait 52,11% du contenu total de L-dopa (138,45%) (tableau 1). Ces données ont montré que les niveaux de dégradation de la L-dopa dans les graines de *M. pruriens* dans un milieu d'extraction (acide formique-alcool 1: 1, 24 h) sont hautement significatifs. La L-dopa standard a également montré une dégradation similaire en un second signal sur le profil HPTLC (L-dopa R*f* 0,34 ± 0,02; SDP R*f* 0,41 ± 0,02). Les études précédentes mentionnaient rarement [30] la détection des signaux de dégradation de la L-dopa sur les profils chromatographiques de graines et de formulations de *M. pruriens* [5 , 6., 29 , 31 , 32 , 33 , 34 , 35 , 36 , 38 , 39 , 40 , 41 , 42] .

Dégradation de la L-dopa

La norme de L-dopa fraîchement dissoute (dans de l'acide formique-alcool 1: 1) sur HPTLC n'a montré qu'un seul signal à *Rf* 0,34 ± 0,02 (figure 2a). Cependant, le standard L-dopa (décomposé) présentait deux signaux, un à R*f* 0,34 ± 0,02 (L-dopa) et un SDP à R*f* 0,41 ± 0,02 (Fig. 2b). Les extraits de graines de *M. pruriens* (sauvages, cultivés dans l'EP) ont montré deux signaux significatifs (*Rf* 0,30–0,40, 0,40–0,46) à des rapports variables (Fig. 2c, d). Frais (24 h extraites à l'acide formique-alcool 1: 1) *M. pruriens* var. *pruriens*extrait de graine, décomposé (extrait pendant 24 h, dissous dans de l'alcool formique à 1/1 pendant sept jours) *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens* et le standard de L-dopa décomposé ont montré des profils de dégradation sur HPTLC, DART-MS et LC / EI-MS (Fig. 2 , Fig. S1-S7). Sur DART-MS, la L-dopa fraîche n'a montré que son propre signal majeur $M + H^+$ à 198.09 (Fig. S1). Frais *M. pruriens* var. *L'* extrait de *pruriens* (extrait au bout de 24 heures) a montré des signaux $M + H^+$ à 123,06 (moyenne), 154,10 (moyenne, dopamine), 162,07 (moyenne), 198,09 (uniquement la principale, L-dopa), 199,09 (mineure) et 224,11 (mineure).) (Fig. S2). *M. pruriens* décomposévar. *L'* extrait de *pruriens* (extrait pendant 24 h, dissous dans de l'alcool 1: 1 acide-formique pendant sept jours) a montré des signaux $M + H^+$ à 129,08 (moyenne), 176,08 (majeure), 190,10 (majeure), 191,11 (mineure), 192,13 (mineure).), 193,13 (acide dopachrome ou 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique) mineur, 195,17 (acide dopaquinone, leucodopachrome), 204,11 (majeur), 218,13 (moyen), 244,12 (moyen) et 245,13 (mineur) (Fig. S3).



Ouvrir dans une fenêtre séparée

Figure 2

Profils HPTLC de

(**a**) standard de L-dopa (dans 1: 1 acide formique-alcool, frais), (**b**) standard dégradé de L-dopa (1: 1 acide-alcool-formique, 24 h), (**c**) extrait de graine de *Mucuna pruriens* var . *pruriens* , numéro d'accession 4503 (extraction en cinq étapes, acide formique-alcool 1: 1, 24 h) et (**d**) extrait de graine de *M. pruriens* var. *utilis* , numéro de dépôt 4504 (extraction en cinq étapes, acide formique-alcool 1: 1, 24 h); Axes X - *Rf* , axes Y - AU.

En bref, *M. pruriens* frais var. *L'* extrait de *pruriens* (extrait au *bout de* 24 h) ne présentait que des signaux majeurs de L-dopa et de dopamine. *M. pruriens* décomposé var. *L'* extrait de *pruriens* ne montrait pas de L-dopa ni de dopamine, mais montrait un groupe de signaux de dégradation aux niveaux $M + H^+$ 190.10, 191.11, 192.13, 193.13 et 195.17. Ces signaux DART-MS correspondent aux dopachromes, leucodopachromes, dopaquinones, autres quinones et ROS (Fig. S3). L-dopa standard décomposée et décomposée (extraite pendant 24 h, dissoute dans un mélange acide formique 1: 1 pendant sept jours) *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens a* également montré des profils de dégradation dans la LC / EI-MS (Fig. S4-S7).).

Les patrons de dégradation de la L-dopa chez *M. pruriens* var. Extraits de graines de *pruriens* et L-dopa standard dans un milieu solvant constitué d'acide formique-alcool 1: 1 (acide), de tampon Tris 20 mM (pH 7,2, neutre) et d'eau à différentes périodes (1 h après le début de l'extraction, 1, 7 30 jours après le début de l'extraction) ont été testés par profilage HPTLC. Une dégradation liée au temps a été observée

chez *M. pruriens* var. extraits de *pruriens* et dans la L-dopa standard à ces valeurs de pH (Fig. S8-S19). Les taux de dégradation de la L-dopa chez *M. pruriens* var. *Les* extraits de *pruriens* et la L-dopa standard étaient relativement faibles à 4 ° C.

Discussion

Notre étude a conduit à la découverte de génotypes / chimotypes d'élite dans 56 accessions de quatre variétés de *M. pruriens* à l'état sauvage et en condition de fertilité. Teneur en L-dopa dans les graines de *M. pruriens* var. *pruriens* (42), *M. pruriens* var. *utilis* (10), *M. pruriens* var. *hirsuta* (3) et *M. pruriens* var. *les accessions thekkadiensis* (1) variaient entre 0,58 et 6,42 (%, poids corporel). *M. pruriens* var. *Les* accessions élites *pruriens* sont 4283 (6,42%, sauvages) et 4498 (6,11%, sauvages) (tableau 1). D' autres adhésions d' élite sont *M. pruriens* var.*thekkadiensis* (4147, sauvage, 4,34%) et *M. pruriens* var. *hirsuta* (3820, sauvage, 4,27%) (tableau 1). Parmi les accessions cultivées au PE, *M. pruriens* var. *pruriens* (4098) a montré une teneur en L-dopa la plus élevée de 4,32% (tableau 1). Ces accessions d'élite pourraient être sélectionnées pour être multipliées et utilisées dans des applications pharmaceutiques. La L-dopa étant un facteur antinutritionnel, les graines de *M. pruriens* var. *pruriens* (4072, cultivé EP, 0,58%; 3822, cultivé EP, 0,84%; 4450, sauvage, 0,89%; sauvage, 0,95%; 4090, sauvage, 0,97%) et *M. pruriens* var. *utilis*(4456, sauvage, 0,65%; 4504, sauvage, 0,97%; 4456, sauvage, 0,98%), les accessions montrant moins de 1% de L-dopa peuvent être multipliées et utilisées comme régimes riches en protéines.

Nous avons régulièrement trouvé des profils de dégradation de la L-dopa dans les graines de *M. pruriens* dans le milieu acide acide formique 1: 1-alcool. Lors du profilage HPLC, des extraits de graines des quatre variétés de *M. pruriens* (prélevés dans divers endroits sauvages et cultivés en EP) présentaient de la L-dopa à R *f* 0,34 ± 0,02 et un second pic de dégradation cohérent à R *f* 0,41 ± 0,02. Ce pic dégradé a été identifié comme un mélange labile de dopamine, dopachrome, leucodopachrome, dopaquinone et autres ROS par HPTLC, DART-MS et LC / EI-MS. En moyenne, la dégradation de la L-dopa dans un protocole d'extraction de 24 h était de 52,11%, ce qui est suffisamment important pour causer des effets indésirables dans les systèmes biologiques.

Profils HPTLC de *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens* (4450) et le standard L-dopa en milieu acide, neutre et eau ont montré une dégradation en fonction du temps. Les taux de dégradation de la L-dopa dans le milieu acide (1: 1 acide formique-alcool) étaient équivalents, voire supérieurs, par rapport au tampon Tris (neutre) ou à l'eau avec des périodes d'extraction identiques. Dans sept jours, *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens* et la L-dopa dans ces milieux liquides ont entraîné une dégradation avec l'apparition progressive d'un dépôt noir. En 30 jours, les deux *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens* et la L-dopa dans ces milieux solvants ont entraîné une dégradation importante et de forts dépôts noirs. Les taux de dégradation de la L-dopa chez*M. pruriens* var. *Les* extraits de *pruriens* et la L-dopa standard étaient bas à 4 ° C par rapport à la température ambiante.

Des études récentes ont montré que les produits de dégradation de la L-dopa et les adduits de la dopamine entraînaient un stress oxydatif et provoquaient une cytotoxicité sélective des cellules neuronales induisant une pathogenèse chez PD [18], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [43], [44]. De plus, dans le traitement de la MP, les graines de *M. pruriens* ou la L-dopa sont administrées pendant de très longues périodes. Le traitement chronique à la L-dopa dans la MP entraîne des troubles du mouvement ou une dyskinésie chez la plupart des patients. *M. pruriens*Les graines et leurs préparations sont également utilisées depuis les temps anciens pour le traitement de la MP dans le système médical traditionnel de l'Ayurveda. Certaines études ont affirmé que les graines de *M. pruriens* étaient encore plus efficaces que la L-dopa dans le traitement de la MP. Certains rapports de littérature mettent en garde contre des preuves insuffisantes pour recommander l'utilisation clinique de *M. pruriens* dans le traitement de la MP [45], [46]. *Les* graines de *M. pruriens* sont également utilisées dans les toniques pour la vitalité et la virilité masculines dans Ayurveda [28], [47].

Depuis *M. pruriens* graines et / ou L-dopa sont utilisés pour le traitement de PD et comme un aphrodisiaque aussi bien dans les systèmes modernes et / ou de la médecine traditionnelle, la découverte de haut niveau de dégradation L-dopa (dans sa forme pure et *M* extraits de *pruriens*) en quinones et ROS dommageables est très important. Notre découverte de produits de dégradation

cohérents suggère la nécessité d'examiner attentivement le traitement des graines de *M. pruriens* (séchage / grillage, mise en poudre, extraction), de la L-dopa et de leur mode (s) d'administration (milieu, pH, température). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer les effets indésirables des produits de dégradation de la «cure» (*M. pruriens* , L-dopa) elle-même chez les patients MP et d'autres utilisateurs.

Les méthodes

Matières végétales

Semences de trente accessions de variétés *M. pruriens* , à savoir. *M. pruriens* var. *pruriens* (21), *M. pruriens* var. *hirsuta* (3), *M. pruriens* var. *utilis* (5) et *M. pruriens* var. *thekkadiensis* (1) ont été collectés de janvier à avril 2009 dans divers sites sauvages du Kerala, dans le sud de l'Inde (tableau 1). Les coordonnées GPS et autres données de terrain pertinentes de ces accessions de *M. pruriens* ont été enregistrées lors de visites sur le terrain. Spécimens de *référence* de ces *M. pruriens*les accessions ont été déposées à l'herbier (TBGT) du jardin botanique tropical et de l'institut de recherche Jawaharlal Nehru (JNTBGRI). Les graines de ces trente *obtentions de M. pruriens* recueillies ont été séchées et réduites en poudre (séparément).

Une seconde série de graines de *M. pruriens* recueillies a été initialement plantée dans un FGB de l'espèce établie à JNTBGRI. Semences de première génération de 21 accessions de *M. pruriens* var. *pruriens* et 5 accessions de *M. pruriens* var. *utilis* ont été collectés à partir de la FGB et plantés au PE en conception de blocs randomisés avec deux répétitions de chaque accession et une plante dans chaque réplication. *M. pruriens* var. *hirsuta* et *M. pruriens* var. *Les* accessions *thekkadiensis* ne produisaient pas de fruits dans le FGB. Par conséquent, ces deux variétés n'ont pas été plantées au PE. *M. pruriens* var. *pruriens*et *M. pruriens* var. *Les* accessions *utilis* ont été maintenues au PE dans des conditions uniformes. *Les* accessions de *M. pruriens* plantées à la fois en FGB et en EP ont été irriguées selon les besoins et ne sont complétées par aucun engrais externe. Semences de deuxième génération de 21 accessions de *M. pruriens* var. *pruriens* et 5 accessions de *M. pruriens* var. *utilis* ont été collectés de janvier à avril 2011, séchés et réduits en poudre (séparément) (tableau 1).

Extraction de L-dopa

La poudre de graines de *M. pruriens* (2 g chacune) a été extraite avec de l'acide formique-alcool 1: 1 (20 ml, 2 h) à la température ambiante et l'extrait a été filtré. Le résidu de poudre de graine a ensuite été extrait à plusieurs reprises avec de l'acide formique-alcool 1: 1 (3 x 10 ml, 2 h chacune) et les extraits ont été filtrés. Ce résidu d'ensemencement a de nouveau été extrait avec de l'acide formique-alcool 1: 1 (10 ml, jusqu'au lendemain). Les filtrats (de cinq extractions) ont été réunis, centrifugés (5000 tr / min, 30 min, 10 ° C) et complétés à 100 ml en utilisant de l'acide formique-alcool 1: 1. Cet extrait de graines de *M. pruriens* (5 ml) a été concentré sur un évaporateur rotatif et le poids de l'extrait a été enregistré. Ce *M. pruriens* (concentré)l'extrait de graine a été dissous dans 20 ml d'acide formique-alcool 1: 1 et utilisé pour la quantification de L-dopa par HPTLC-densitométrie. Ce protocole d'extraction a été suivi pour la quantification de la L-dopa dans les graines de toutes les (56) accessions de *M. pruriens* (Tableau 1). Le protocole d'extraction a été optimisé pendant 24 h et l'extraction à froid a été préférée (contre l'extraction à chaud) en raison de la nature labile (dégradation) de la L-dopa lors de l'extraction.

Quantification de la L-dopa

La teneur en L-dopa dans les extraits de graines de *M. pruriens a* été quantifiée à l'aide d'un HPTLC (CAMAG, Suisse) composé d'un applicateur d'échantillons Linomat V, d'une chambre de développement de plaques à deux augets, de TLC Scanner 3 et de WinCATS Software 4.03. *L'* extrait de graines de *M. pruriens* (5 ml d'extrait de graines concentré) a été dissous dans 20 ml d'acide formique-alcool 1: 1 (voir Extraction L-dopa), 4 ul de cette solution ont été appliqués de manière répétée sur une plaque HPTLC de gel de silice (60 F254 E. Merck, Allemagne, 20 × 10 cm, 0,2 mm d'épaisseur) en bandes de 6 mm de large avec applicateur d'échantillons Camag Linomat V, équipé d'une microseringue, en écoulement de N_2 (vitesse d'application -50 nL / s, espace entre deux bandes - 11,3 mm, dimension de la fente - 6 × 0,45 mm, vitesse de balayage -20 mm / s). Le standard L-dopa a

également été appliqué avec *M. pruriens*extraits de graines. La plaque HPTLC a été développée jusqu'à 80 mm dans la chambre de verre à double cuve pré-saturée pendant 30 min avec la phase mobile butanol: acide acétique: eau (4: 1: 1, v / v, 24 ml). La plaque développée a été balayée par densitométrie à 282 nm (lampe au deutérium) à l'aide du TLC Scanner 3 équipé du logiciel WinCATS. De la L-dopa à R*f* 0,34 ± 0,02 (n = 56) et un deuxième pic de dégradation (SDP) à R*f* 0,41 ± 0,02 (n = 56) ont été trouvés dans l'extrait de graine de *M. pruriens* dans du butanol: acide acétique: eau (4 : 1: 1, v / v) (Fig. 2a – d). Un protocole de quantification similaire a été suivi pour tous les extraits de graines de *M. pruriens* . La L-dopa fraîchement dissoute ne montre pas le deuxième signal, mais après 24 h dans un solvant (acide formique 1: 1), elle présente un deuxième signal net à la position R*f* 0,41 (Fig. 2a, b). D'autres signaux dans les extraits de graines de *M. pruriens* étaient bien résolus à partir de ces deux signaux à base de L-dopa (Fig. 2c, d). Des systèmes de solvants tels que 7: 3 éthanol: eau, 4: 1: 1 butanol: acide acétique: eau, 4: 1: 5 butanol: acide acétique: eau et 4: 2: 1 butanol: acide acétique: eau ont été essayés pour le développement de plaques. Parmi ceux-ci, 4: 1: 1 butanol: acide acétique: eau ont donné la meilleure résolution des signaux de développement.

Analyse de données, validation

La quantification de la L-dopa basée sur la méthode HPTLC a été validée en termes de précision, d'exactitude, de répétabilité et de linéarité. La spécificité des tests a été testée par application répétée de L-dopa standard. Les valeurs *Rf* (*Rf* 0,34 ± 0,02, n = 56) de l'étalon étaient reproductibles et se révélèrent identiques aux valeurs observées pour le pic (L-dopa) dans des extraits de graines de *M. pruriens* . Courbe d'étalonnage a été tracée entre la quantité de L-dopa standard (frais) *par rapport* à la réponse moyenne (surface de pic) (y = 6.542x + 88,22, R^2 = 0,996). La linéarité de la courbe d'étalonnage dans la plage 100-1000 ng a été assurée. Teneur (s) en L-dopa en pourcentage (R*f* 0,34 ± 0,02% ± SD, n = 6, sur la base du poids sec) dans des extraits de *M. pruriens* ont été calculés à partir des surfaces de pic en utilisant la courbe standard. Le pourcentage du deuxième pic de dégradation (SDP, *Rf* 0,41 ± 0,02), qui est une combinaison de molécules labiles, a également été quantifié sur la base de la courbe standard L-dopa. La répétabilité de l'application de l'échantillon (précision instrumentale) a été évaluée en appliquant une solution d'échantillon (*M. pruriens*extrait, 4 µl) sur une plaque HPTLC développée jusqu'à 80 mm en conditions de saturation avec du butanol: acide acétique: eau (4: 1: 1, v / v) comme phase mobile dans la chambre en verre à double auge (saturée le solvant pendant 30 min). La tache (L-dopa) a été balayée six fois, le coefficient de variation% était acceptable. La robustesse de la méthode a été contrôlée en modifiant légèrement la composition de la phase mobile et la distance de développement de la plaque a été contrôlée. Aucun effet considérable sur les données n'a été trouvé. Des études de récupération ont été réalisées (en deux modes) en ajoutant de la L-dopa à des extraits de *M. pruriens* pré-analysés et ont été à nouveau analysées (voir Quantification de la L-dopa). Dans le premier mode, (i) *M. pruriens* var. *pruriens*de la poudre de graine (numéro 4088, 2 g) a été extraite dans le protocole en cinq étapes (24 h) et (ii) de la L-dopa standard (10 mg) a été ajoutée initialement à *M. pruriens* var. poudre de graines de *pruriens* (n ° d'accès 4088, 2 g) et extraite selon le protocole en cinq étapes (24 h). (i), (ii) et (iii) de la L-dopa standard fraîche (1 µg / µl) dans 1: 1 d'acide formique-alcool ont été chargées (4 µl chacune) sur une plaque HPTLC, développée avec du butanol: acide acétique: de l'eau (4: 1: 1, v / v) et les surfaces de pic ont été mesurées à 282 nm (voir Extraction de la L-dopa, Quantification de la L-dopa). Le pourcentage de récupération de L-dopa a été calculé à partir de 49,78% à partir des zones de pic. Dans le second mode, *M. pruriens* var. *La* poudre de graines de *pruriens* (numéro d'accès 4502, 2 g) a été extraite dans le protocole standard en cinq étapes (24 h). (i) *M. pruriens*var. extrait de *pruriens* dans 1: 1 d'acide formique-alcool (4 µl), (ii) *M. pruriens* var. *pruriens*extrait dans 1: 1 acide formique-alcool (4 µl) et L-Dopa fraîche dissoute dans 1: 1 acide formique-alcool (1 µg / µl, 4 µl) et (iii) L-dopa fraîche dissoute dans 1: 1 formique De l'alcool acide (1 µg / µl, 4 µl) a été chargé sur une plaque HPTLC ((ii) co-repéré), développé et les surfaces de pic ont été mesurées. Le pourcentage de récupération de L-dopa a été calculé à 99,30%. Le pourcentage d'écarts-types résiduels (RSD) a été déterminé à 2,63 (L-dopa) et 3,58 (SDP). Limite de détection (LOD, moyenne de 3,3 × SD de la surface / pente de la courbe de calibration pour 56 accessions, n = 6) et limite de quantification (LOQ, moyenne de 10 × SD de la surface / pente de la courbe de calibration pour 56 accessions , n = 6) ont été déterminées pour les deux L-dopa (ng LOD -31,46, -95,32 LOQ ng) et SDP (LOD -21,10 ng, LOQ -63,93 ng) [48, 49] .

Dégradation de la L-dopa

M. pruriens var. *L'* extrait de graine de *pruriens* (Acc. N ° 4450) préparé par l'extraction en cinq étapes pendant 24 h (extrait de graine de *M. pruriens* var. *pruriens* frais) et la L-dopa standard (fraîche) ont été suspendus dans de l'acide formique-alcool 1: 1 et conservés à la température ambiante pendant sept jours avec une agitation occasionnelle. Ceci a entraîné la décomposition de *M. pruriens* var. extrait de graine de *pruriens* et standard de L-dopa décomposé, respectivement. Frais *M. pruriens* var. extrait de graine de *pruriens* , standard de L-dopa fraîchement préparé (tous les deux en acide formique-alcool 1: 1), décomposé de *M. pruriens* var. *pruriens*L'extrait de graine et le standard L-dopa décomposé ont été appliqués sur des plaques de gel de silice (60 F254, E. Merck, Allemagne, 20 x 10 cm, 0,2 mm d'épaisseur) par HPTLC (CAMAG, Suisse), développés dans du butanol: acide acétique: de l'eau (4: 1: 1, v / v, 24 ml) et balayé à 282 nm (TLC Scanner 3, CAMAG, Suisse) (Fig. 2).

Frais *M. pruriens* var. extrait de graine de *pruriens* (100 mg), décomposé de *M. pruriens* var. *L'* extrait de graine de *pruriens* (100 mg) et le standard de L-dopa décomposé (26,1 mg) ont été analysés par DART-MS sur un spectromètre de masse AccuTOF JMS-T100LC comportant une DART (JEOL, USA). Les échantillons ont été analysés directement devant la source DART. Dry He a été utilisé à un débit de 4 L / min pour une ionisation à 350 ° C. L'orifice 1 a été réglé à 28 V, les spectres ont été recueillis et les données de 6 à 8 balayages ont été moyennées (Fig. S1-S3). Encore une fois, *M. pruriens* décomposé var. *pruriens*l'extrait de graine (80 mg) et le standard L-dopa décomposé (20 mg) ont été soumis à une analyse LC / ESI-MS sur un système Surveyor-LCQ Deca XP plus (Thermo Finnigan, USA) avec une colonne Hypersil BDS C18 (longueur 250 mm), diamètre int. 4,6 mm, taille de particule 5 µm), phase mobile: méthanol-eau 85:15, inj. volume: 10 µl, débit: 0,3 ml / min, durée: 30 min, détection LC: détecteur PDA / UV, 280 nm et détection de masse: ionisation par électro-pulvérisation (Fig. S4-S7).

Effet du pH sur la dégradation de la L-dopa

M. pruriens var. *des* graines de *pruriens* (numéro d'accession 4450) (1 g chacune) ont été extraites séparément avec 20 ml (chacun) d'acide formique-alcool 1: 1 (fortement acide), Tris-HCl 20 mM, KCl 20 mM (pH 7,2, neutre) et eau à température ambiante et à 4 ° C. De même, la L-dopa standard (5 mg) a été extraite (dissoute) dans 10 ml de chacun de ces trois solvants à la température ambiante et à 4 ° C. Ces *M. pruriens* var. *Des* extraits de graines de *pruriens* / L-dopa (3 µl chacun) ont été analysés à l'aide d'un test HPTLC-densitométrie (comme décrit dans Quantification of L-dopa) à différentes périodes, à savoir 1 h après le début de l'extraction, 1, 7 et 30 jours après le début. d'extraction (Fig. S8-S19).

Information additionnelle

Comment citer cet article : Pulikkalpura, H. *et al* . Lévodopa chez *Mucuna pruriens* et sa dégradation. *Sci. Rep* . **5** , 11078; doi: 10.1038 / srep11078 (2015).

Matériel complémentaire

Information supplémentaire:

Cliquez ici pour voir. (7.1M, doc)

Remerciements

Nous remercions le CSIR-Institut central de recherche sur les médicaments, situé à Lucknow, en Inde, d'avoir effectué des analyses sophistiquées sur DART-MS. Ce travail a été financé par un projet de plan du gouvernement du Kerala, en Inde.

Notes de bas de page

Contributions des auteurs HP, PJJ et SB ont conçu des expériences. HP et PJJ ont collecté des matières végétales. HP, RK et SB ont effectué des analyses chimiques; SB a écrit le manuscrit.