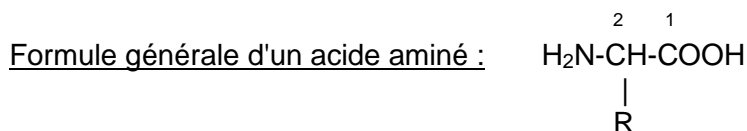


# 1 - Test à la ninhydrine caractéristique des acides aminés

C'est le test caractéristique de la présence d'acide aminé.

## 1. Les acides aminés

Les acides aminés (ou acides α-aminés) possèdent une fonction acide carboxylique (-COOH) et une fonction amine (-NH<sub>2</sub>), comme son nom l'indique.



Les acides α-aminés ont la fonction amine sur le carbone n°2, mais il existe aussi des acides β-aminés (carbone n°3) et acides γ-aminés(carbone n°4) mais ils sont d'une moindre importance.

Tous les acides aminés possèdent une isomérisation optique due au Cα qui est un carbone asymétrique C\*, à l'exception de la glycine.

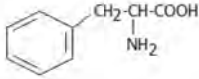
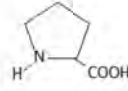
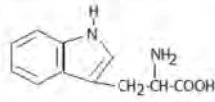
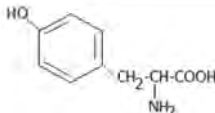
Les acides aminés ont un groupement acide (donneur de H<sup>+</sup>) et un groupement basique (accepteur de H<sup>+</sup>).

La fonction acide donne des sels en présence de bases, des esters par réaction avec un alcool, et peut-être transformée en chlorure d'acide pour accélérer la réaction d'estérification.

La fonction amine primaire réagit avec les chlorures d'acide en donnant une amide;

### Ci-dessous un tableau des vingt aminoacides constituant les protéines naturelles :

<i>Nom</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Formule semi-développée</i>	<i>Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100 g d'eau)</i>
Acide aspartique	Asp	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	DL : 0,778 L : 0,500
Acide glutamique	Glu	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	DL : 2,054 L : 0,864
Alanine	Ala	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	DL : 16,72 L : 16,65
Arginine	Arg	$\text{NH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L : 18,26
Asparagine	Asn	$\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L : 2,51
Glutamine	Gln	$\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L : 4,2
Glycine	Gly	$\text{H}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	24,99
Histidine	His	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{HC}}{\text{C}}=\underset{\text{NH}}{\text{N}}-\text{CH}$	L : 4,35

Isoleucine (*)	Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 2,229 L : 4,117
Leucine (*)	Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 0,991 L : 2,426
Lysine (*)	Lys	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	L : 0,58
Méthionine (*)	Met	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 3,381
Phénylalanine (*)	Phe		DL : 1,411 L : 2,965
Proline	Pro		L : 162,3
Sérine	Ser	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 5,023
Thréonine (*)	Thr	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 9,06
Tryptophane (*)	Try		L : 1,136
Tyrosine	Tyr		DL : 0,0351 L : 0,0453 D : 0,0453
Valine (*)	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	DL : 7,09 L : 8,85

(\*) Acides aminés essentiels (ou indispensables). Ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation.

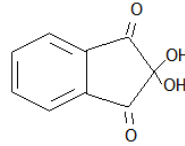
Les acides aminés "D" (dextrogyre) ou "L" (lévogyre) sont des isomères optiques, c'est à dire qu'ils sont composés de la même formule moléculaire, mais qu'ils ont des arrangements spatiaux différents. Ils ne diffèrent que par leur capacité à faire tourner la lumière polarisée dans un plan ou des directions opposées.

Ici, nous pouvons constater que leur différence est essentielle car leur solubilité varie en fonction de l'isomère.

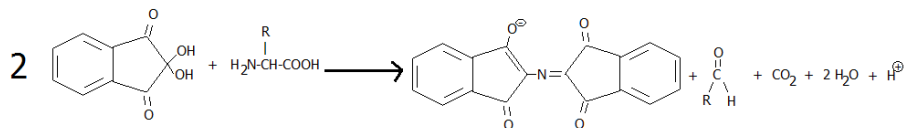
## 2. La ninhydrine

La ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) est un composé aromatique utilisé comme révélateur des acides aminés.

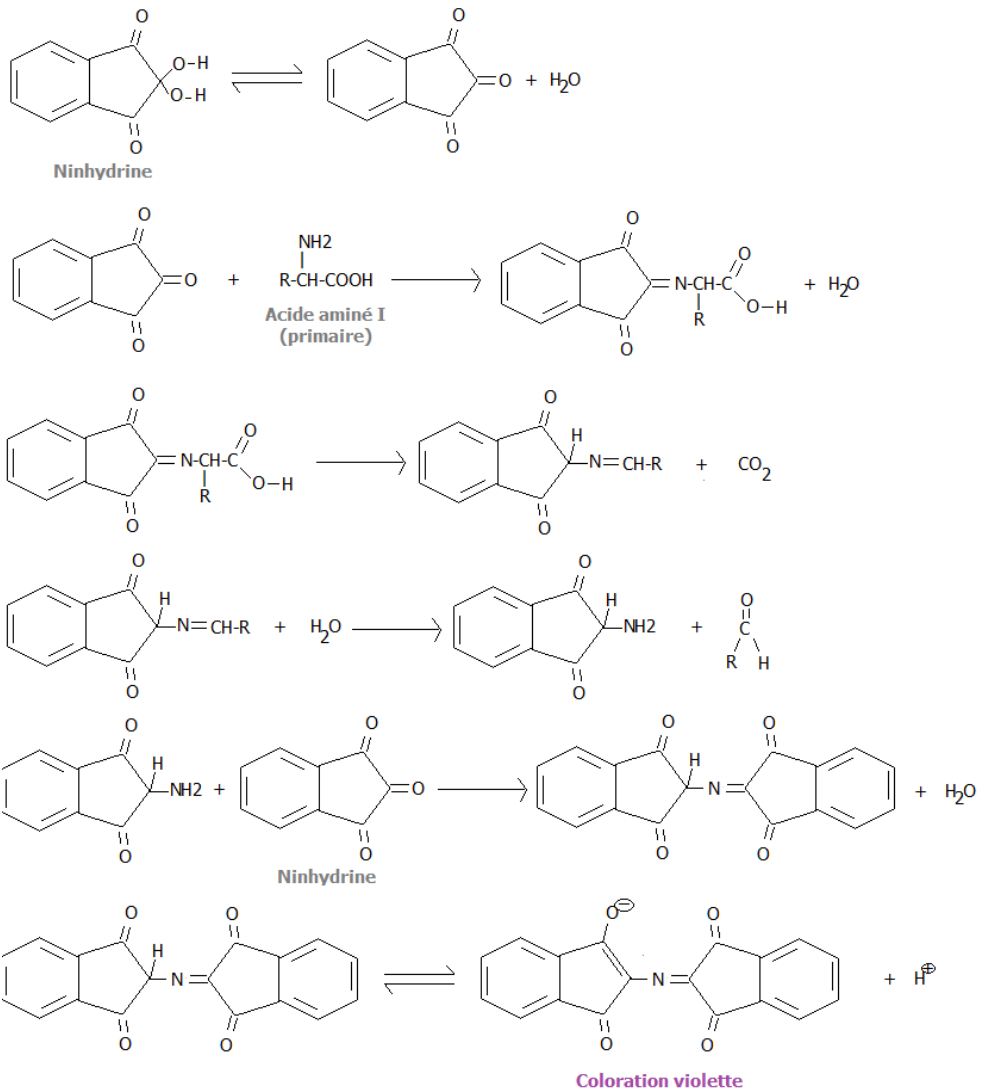
Sa formule est :



**Equation de réaction entre la ninhydrine et un acide aminé (primaire) :**



**Mécanisme réactionnel du test à la ninhydrine :**



## Préparation de la solution de ninhydrine :

A notre disposition, nous avons deux préparations différentes pour la ninhydrine.

- Préparation 1 (sur internet) :
  - m de ninhydrine à peser = 0,20g
  - V butan-1-ol = 95 mL
  - V CH<sub>3</sub>COOH (acide acétique) à 0,1 mol/L = 10 mL
- Préparation 2 (du labo) :
  - m de ninhydrine à peser = 0,5g
  - V alcool à 65 % = 100 mL

Pour faire la dilution de l'alcool, nous utilisons la *table de Gay-Lussac* (**Annexe 1**).

Pour préparer la solution d'alcool à 65% à partir d'alcool à 99%, il faut donc ajouter 57,49 mL d'eau à 100 mL d'alcool à 99%. Le volume final sera d'environ 100 mL car il y a contraction du volume.

## 3. Essais sur un acide aminé : la Glycine

### Préparation de la solution de glycine :

Toutes mes pesées sont effectuées à l'aide d'une balance KERN, son maximum étant de 100g et son pas de 0,001g. Elle est précise à 0,01g près.  
Les volumes des solutions sont fixés à 50 mL.

Concentration désirée (g/L)	Masse à peser (g)
50	2,5
40	2
30	1,5
20	1,0
10	0,5
5	0,25
1	0,05
0,5	0,025 (*)
0,1	0,01 (*)

Exemple d'un calcul :

pour 50 g/L →  $m = C_m \times V = 50 \times 50E-3 = 2,5g$

Pour les 7 premières préparations, peser la masse calculée, la dissoudre dans un peu d'eau distillée dans la fiole de 50 mL. Remplir la fiole d'eau distillée jusqu'au trait de jauge, boucher et agiter.

(\*) Pour ces 2 dernière solutions, nous avons procédé par dilution à partir de la solution à 1 g/L.

## Protocole pour le test à la ninhydrine :

Mettre la solution à tester dans un tube à essai, puis y ajouter de la solution de ninhydrine (fraîchement préparée). Si la coloration n'apparaît pas de suite, chauffer au bain marie (ou bec bunsen). Si une coloration violette-bleue apparaît alors, le test est positif : il y a présence d'acides aminés.

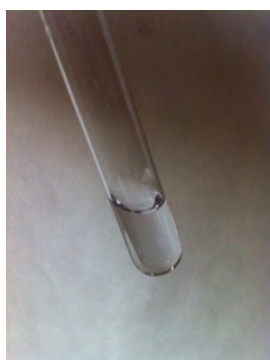
Au début nous nous sommes intéressés au plus simple des acides aminés : la Glycine ( $C_2H_5O_2N$ ). Nous avons pensé qu'il était plus judicieux de faire ces tests sur seulement un acide aminé, afin de trouver les conditions les plus optimales possibles. Ensuite de tester ces conditions sur d'autres acides aminés.

Tout d'abord pour trouver ces conditions optimales, nous avons fabriqué une solution de glycine à 50 g/L et une solution de ninhydrine (préparation 1).

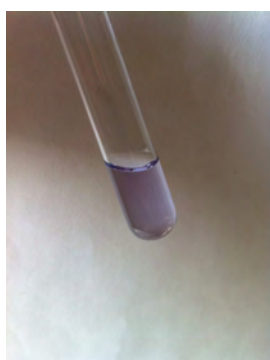
V Ninhydrine (mL)	V Glycine (mL)
1	2
2	1
1	1
0,5	0,5
0,4	0,4
0,3	0,3
0,2	0,2
0,1	0,1

Pour chaque solution, nous avons réalisé une série de tests dans des tubes à essais, contenant des volumes différents de solution de ninhydrine et de solution de glycine (voir tableau ci-dessus). Nous avons chronométré le temps d'apparition de la couleur violette : si elle mettait moins d'une minute pour apparaître alors il n'y avait pas besoin de chauffage. Par contre si au bout d'une minute il n'y avait pas formation de couleur, alors on chauffait (bec bunsen ou bain marie, le choix n'a pas d'importance car après vérification lors des manipulations, le temps d'apparition de la couleur avec l'un ou l'autre est relativement le même).

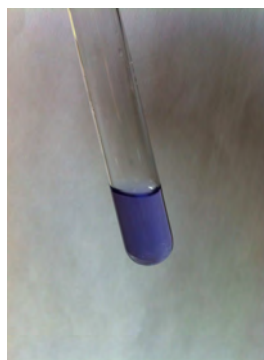
Nous avons tout d'abord essayé d'ajouter en premier la solution de ninhydrine, puis la solution d'acide aminé, et inversement. Nous n'avons observé aucun changement, ainsi pour la suite nous allons d'abord mettre la solution d'acide aminé puis la solution de ninhydrine.



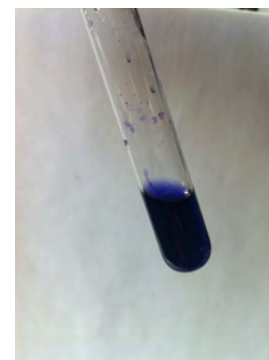
*Solution initiale incolore  
( 1 mL de solution de Glycine  
+ 1 mL de Ninhydrine)*



*Après 1min30s*

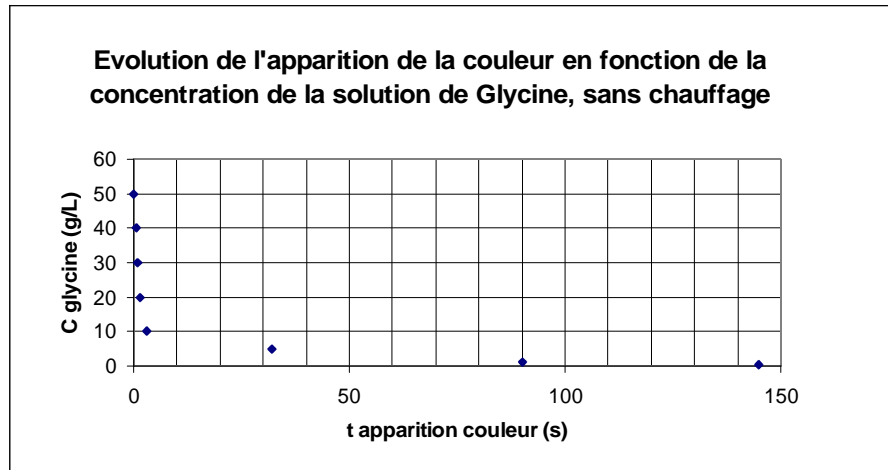


*Après 4min*



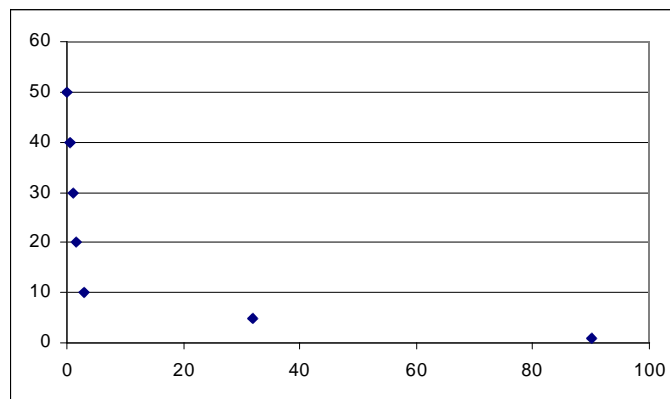
*Solution initiale après  
7sec de chauffage*

**(Annexe 2, temps apparition de la couleur en fonction de la concentration de la solution de Glycine)**

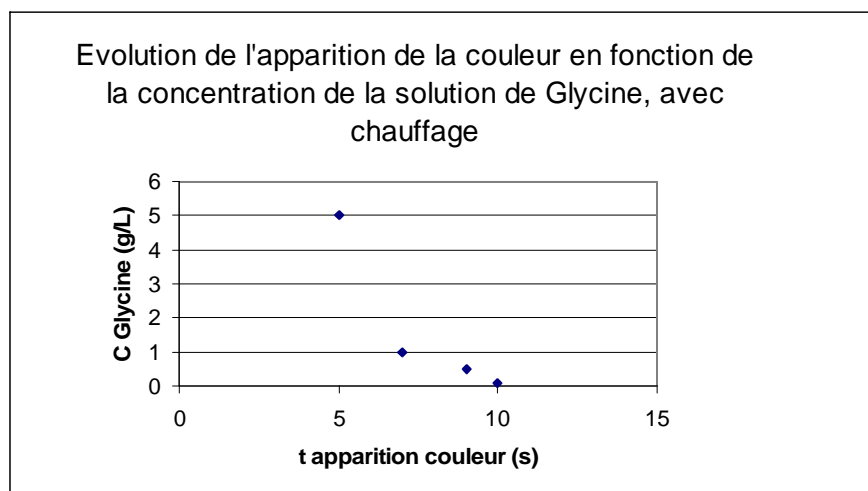


Dans ce diagramme nous avons pris seulement 8 points au lieu de 9 (car 9 solutions différentes), car le temps d'apparition de la couleur de la dernière solution (à 0,1 g/L) était trop long (> 900 s). Donc nous ne l'avons pas pris en compte.

Zoom du diagramme précédent :



Comme nous l'avons précisé précédemment, nous avons chauffé pour les concentrations de glycine inférieure à 10 g/L.



Grâce aux diagrammes créés ci-dessus nous remarquons que *sans chauffage*, les concentrations idéales seraient 5 g/L ou 1 g/L. Ces deux concentrations n'ont qu'une minute d'écart, ce qui est négligeable.

Maintenant si nous observons *avec chauffage*, nous en déduisons que la solution préférable serait celle à 1 g/L.

Après avoir trouvé la meilleure concentration possible (1 g/L avec ou sans chauffage), nous avons voulu diluer la solution de ninhydrine par deux, afin de voir si cette dilution influencée. Une fois le test effectué avec la solution de glycine à 1 g/L, nous nous sommes rendus compte que les résultats n'étaient pas concluants (trop long), c'est pourquoi nous allons garder la solution de ninhydrine de départ (donc non diluée).

### Conclusion :

Les conditions optimales trouvées sont :

- concentration de 1 g/L de glycine
- 1 mL de cette solution d'acide aminé
- 1 mL de solution de ninhydrine non diluée (préparation 1)
- Temps apparition de la couleur sans chauffage : 1min 30s (avec chauffage : 7s)

Le professeur choisira avec ou sans chauffage, en fonction des activités prévues pendant la séance de TP.

## 4. Essais sur les autres acides aminés disponibles au laboratoire

Pour vérifier si ces conditions sont optimales avec toutes les acides aminés, nous avons réalisé des solutions des différents acides aminés présents dans notre stock (DL-Alanine, L-Acide glutamique, Glycine, L-Lysine, DL-Leucine, DL-Thréonine, DL-Tryptophane, L-Tyrosine, L-Proline, L-Valine, L-Histidine, DL-Sérine, L-Arginine, L-Asparagine, ) à 1 g/L.

Lors de la fabrication des solutions, quelques acides aminés (tyrosine, tryptophane, asparagine, leucine) ne sont pas très solubles dans l'eau froide, c'est pourquoi nous avons dû chauffer pour pouvoir les dissoudre complètement.

De plus, la lysine nous a posé problème, nous n'avons pas réussi à la dissoudre pour en faire une solution, la solution apparaissait comme gluante. Nous avons donc décidé de ne pas l'utiliser.

Nous avons remarqué que 2 solutions s'étaient bien colorées après ajout de la ninhydrine, mais d'une couleur différente que le violet :

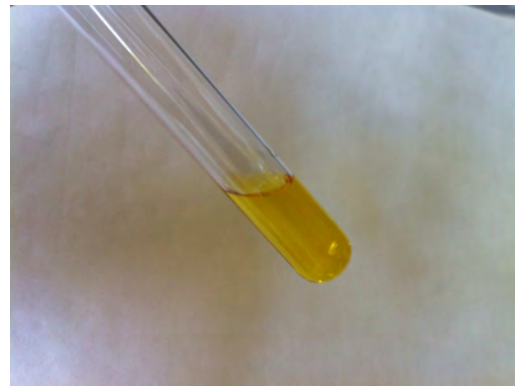
### • Cas Proline :

Dans un cas, la solution de Proline a bien réagi avec la ninhydrine, mais au lieu de devenir violette nous avons obtenu une coloration jaune-orangée (avec chauffage et sans chauffage).

Nous allons donc étudier le mécanisme de la réaction entre la proline et la ninhydrine pour voir si nous trouvons une explication à cette coloration.

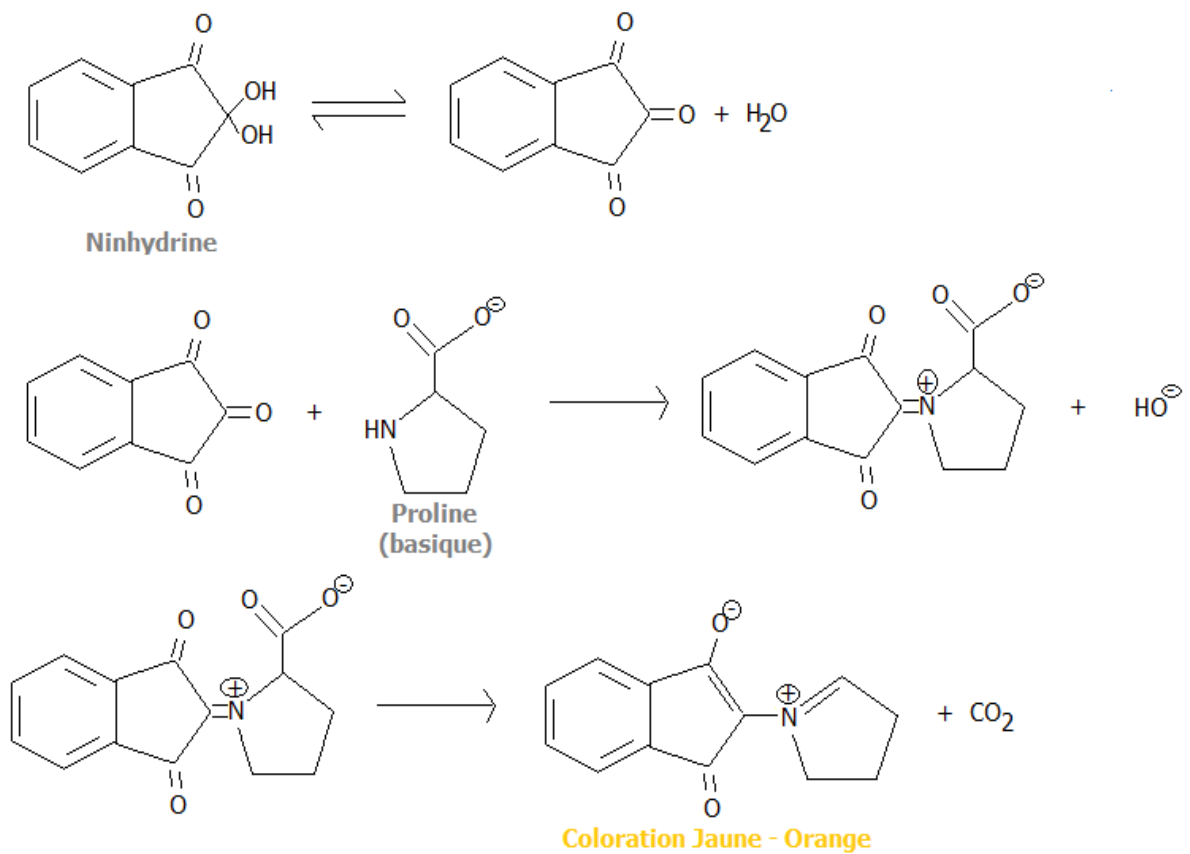


Solution initiale incolore  
(1 mL de solution de Proline + 1 mL de Ninhydrine)



Résultat après chauffage (32sec)

**Mécanisme réactionnel du test à la ninhydrine sur la proline :**



• **Cas Asparagine :**

Et dans un autre cas, la solution d'Asparagine est devenue orange-ambree (avec chauffage et sans chauffage). Nous avons voulu refaire le test, mais en mettant un grain de cristaux dans un tube à essais et en y ajoutant un peu d'eau (afin que la solution soit très concentrée). Puis nous avons ajouté quelques gouttes de ninhydrine et nous avons placé le tube à essais au bain marie. Au bout de quelques secondes la solution se colore en ambree, puis passe au noir-mauve au bout d'1min40. Et si nous diluons notre solution restante avec de l'eau nous remarquons que nous avons bien une solution colorée violette. Comme notre test est positif, nous avons réessayé avec la solution à 1 g/L, et lorsque celle-ci s'est colorée en orange-ambree, nous l'avons tout de même laisser dans le bain marie

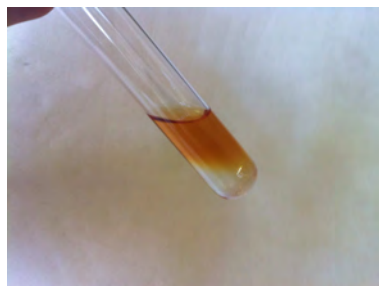


afin de voir la possible évolution de cette couleur. Au bout de 20 min nous obtenons une solution noir-mauve et lorsque nous la diluons nous obtenons bien une solution violette. Le test est donc bien positif, mais il met beaucoup plus de temps à réagir. Par contre, lorsque nous faisons ce test sans chauffage, il n'y a pas de réaction dans un temps de 2h 30min observé.

- Avec chauffage



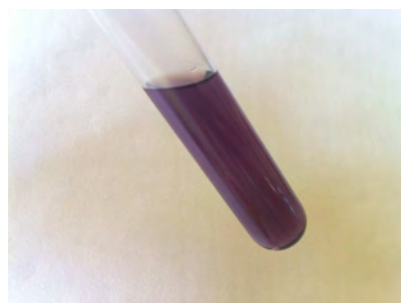
*Solution initiale incolore*  
(1 mL de solution d'Asparagine + 1 mL de Ninhydrine)



*Résultat après chauffage (35sec)*

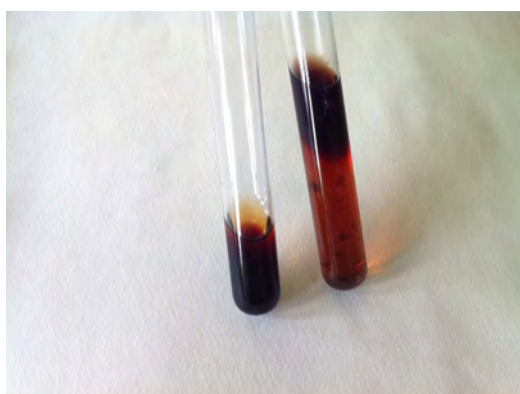


*Solution après chauffage intense (20 min)*



*Solution diluée*  
(pour voir la coloration violette)

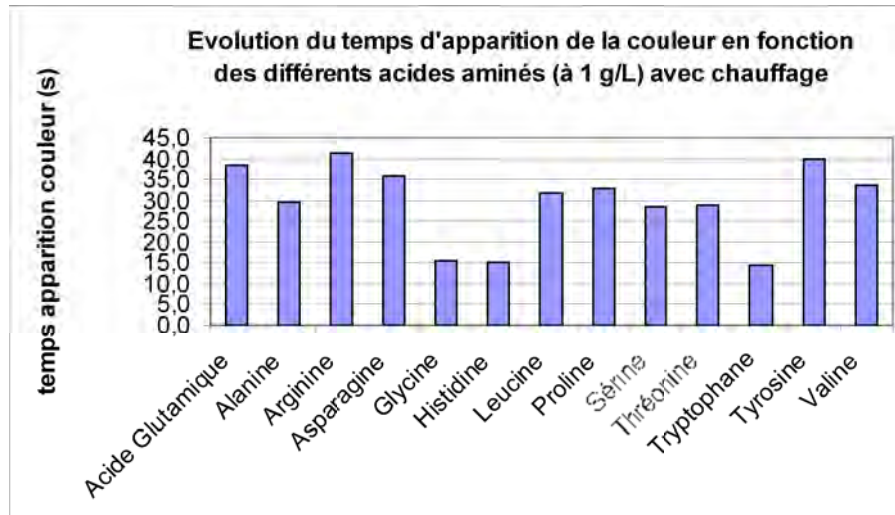
- Sans chauffage



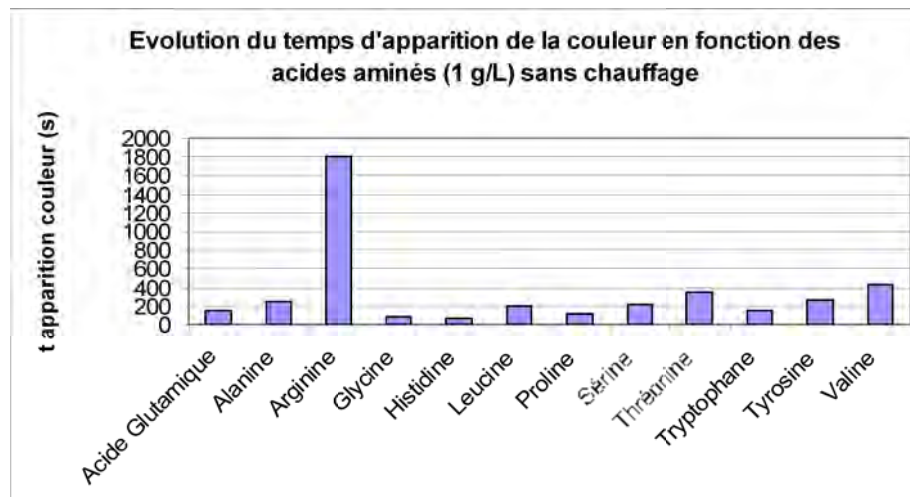
*Résultat après 2h30 d'attente*

Après manipulations sur les autres acides aminés, nous pouvons confirmer que ces conditions sont bien optimales.

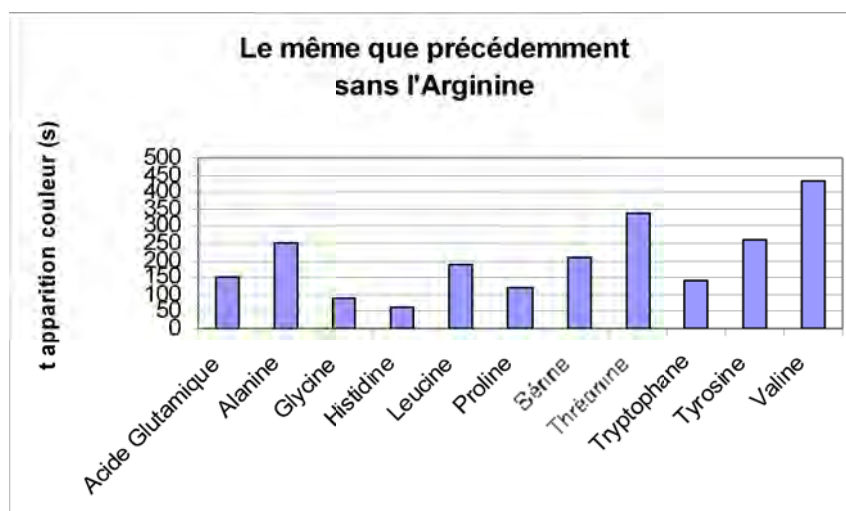
- Avec chauffage :



- Sans chauffage :



Zoom du diagramme précédent :



### Conclusion :

Nous pouvons expliquer la coloration jaune-orangée de la proline par le mécanisme. En effet, lorsque la ninhydrine réagit avec des acides aminés secondaires, la couleur devient alors jaune-orange plutôt que violette. Pour l'asparagine il faut absolument chauffer pour pouvoir voir la coloration violette caractéristique de ce test.

Le chauffage permet un temps d'attente beaucoup moins long et donc un visuel quasi instantané. Cependant il faut rappeler que nous cherchons ici l'optimisation de ce test dans un cadre d'enseignement, et tous les établissements n'ont pas forcément de bec bunsen ou plaque chauffante, ou même l'enseignant peut ne pas avoir envie d'utiliser un mode de chauffage. Ainsi le professeur peut facilement mettre en œuvre une autre activité, pendant le temps d'attente de l'apparition de la couleur caractéristique de ce test (violet pour acide aminé I ou jaune-orange pour acide aminé II).

Nous avons voulu effectuer ce test sur d'autres molécules qui ne sont pas des acides aminés, afin de voir si le résultat est bien négatif. Pour cela nous avons choisi de prendre une amine (butylamine) et un acide carboxylique (acide acétique), car ils sont les deux fonctions élémentaires d'un acide aminé.

Nous observons donc un résultat négatif (pas de coloration, la solution reste incolore), ce qui était prévisible.

### Conclusion Générale :

Nous pouvons ainsi certifier que les conditions optimales sont :

- 1 mL de la solution d'acide aminé à 1 g/L
- 1 mL de la préparation 1 de la ninhydrine (celle du laboratoire)
- chauffage éventuel

Les acides aminés les mieux adaptés pour l'enseignement sont la glycine, l'histidine et le tryptophane, car ce sont ceux qui réagissent le plus rapidement (avec et sans chauffage).

Ce test n'est positif qu'en présence d'acide aminé.