

DOSAGE DES ACIDES AMINÉS ET AMINES PAR LA NINHYDRINE. AMÉLIORATION PRATIQUE

M. C. MICHEL⁽¹⁾

avec la collaboration technique de Geneviève HANNEQUART

*Station centrale de Nutrition,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Les réactifs employés pour le dosage colorimétrique des acides aminés comprennent :

a) une solution de ninhydrine (20 g) dans le méthylcellosolve (500 ml), et un tampon propionate de sodium (201,8 g) et acide propionique (93 ml) ; H₂O q.s. 1 litre ;

b) une solution d'acide ascorbique à 1 mg par ml dans l'eau.

La solution à doser (1 ml) est additionnée de 1 ml de réactif (*a*) et de 2 gouttes de réactif (*b*). Après 15 minutes au bain-marie bouillant, on ajoute 15 ml d'alcool à 50 p. 100 et on lit la coloration à 570 m μ .

Les résultats obtenus indiquent :

a) une grande stabilité du réactif (*a*), qui se conserve plus de 3 mois en présence d'air ;

b) une excellente reproductibilité de la coloration ;

c) un pouvoir tampon élevé du réactif, qui permet d'analyser des effluents de pH variés sans correction ;

d) une réaction colorée avec les amines primaires très proche de celle des acides aminés correspondants.

INTRODUCTION

La formation d'un dérivé coloré entre la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène), et les acides aminés est connue depuis longtemps. L'intensité de la coloration, la stabilité d'un complexe coloré, sont déterminées par les conditions physico-chimiques du milieu réactionnel, et en particulier par la présence de ninhydrine réduite (MOORE et STEIN, 1948).

⁽¹⁾ Station de Physiopathologie de la nutrition Centre de Recherches zootechniques et vétérinaires sur les Ruminants 63 - Theix de Clermont-Ferrand.

Les réactifs proposés peuvent être classés en trois groupes :

a) La ninhydrine réduite (hydrindantine), est obtenue dans le réactif, à l'aide d'un réducteur de la ninhydrine. Celui-ci peut être le chlorure stanneux (MOORE et STEIN, 1948; SPACKMAN et *al.*, 1958; PIEZ et MORRIS, 1960) ; le cyanure de potassium (TROLL et CANNAN, 1953; YEMM et COKING, 1955; KALANT, 1956) ; le cyanure de sodium (CADAVID et PALADINI, 1964; ROSEN, 1957) ; l'acide ascorbique (YAMAGASHI, 1953) ; la dithionite et le fluorure de sodium (STEGEMAN, 1960).

b) On ajoute au réactif une certaine proportion d'hydrindantine, synthétisée par réduction de la ninhydrine par l'acide ascorbique (MOORE et STEIN, 1954; MATHESSON, 1961; CONNEL et *al.*, 1955).

c) Le réactif à la ninhydrine — sans réducteur — est mélangé au liquide à doser contenant le réducteur (ROSEN et *al.*, 1962).

Les deux premières techniques conduisent à des réactifs instables, devant être conservés en l'absence totale d'oxygène. On observe souvent une formation de cristaux qui grippent les seringues des pipettes automatiques. Le blanc-réactif est variable et souvent élevé, surtout en présence de tampon phosphate.

Le réactif de ROSEN et *al.* (1962) ne présente pas ces inconvénients. Il est parfaitement stable et peut être conservé en présence d'air. Cependant, le réducteur proposé (KCN) n'étant pas suffisamment stable dans nos conditions expérimentales, nous avons mis au point un réactif modifié, destiné à l'analyse des amines biologiques.

I. — RÉACTIFS

1. Réactif à la ninhydrine

Dans un bécber de 2 litres placé sur un agitateur magnétique, on ajoute successivement :

a) acide propionique (Merck)	93 ml
b) méthylcellosolve (Touzart)	500 ml
c) propionate de sodium (Merck)	201,8 g
d) ninhydrine (Touzart)	20 g

Le cellosolve, stocké à + 4°C en flacons jaunes, est distillé avant l'emploi sous pression réduite.

2. Solution d'acide ascorbique (Prolabo)

A 1 mg/ml dans l'eau.

3. Acides aminés et amines (Calbiochem) (Eastmann)

Solutions M/100 dans l'eau. Elles sont ajustées à pH 6 si nécessaire. Conserver à — 20°C. Diluer au moment de l'emploi.

4. L'eau

Employée pour toutes les solutions, l'eau est d'abord permutée, puis distillée dans un appareil métallique, et enfin désionisée sur une colonne de résine (SAGEI A 20). Sa teneur en ammoniac est pratiquement nulle, ce qui permet d'obtenir un blanc réactif très faible.

II. — TECHNIQUE

Dans des tubes Pyrex de 16×160 mm, contenant la solution à doser (1 ml), ajouter 1 goutte de la solution d'acide ascorbique à l'aide d'une pipette calibrée à 20 gouttes par ml, puis avec la seringue, 1 ml de réactif à la ninhydrine. Les placer 15 minutes dans un bain-marie bouillant, puis les refroidir sous le robinet. Ajouter ensuite 15 ml d'un mélange éthanol-eau (V/V). Agiter les tubes pour détruire l'excès d'hydrindantine. Le photomètre utilisé pour la lecture était un Unicam SP 1300 muni d'un filtre Ilford n° 624 (495-575 m μ), et d'une cuve de 1 cm. Toutes les lectures sont effectuées par rapport à l'eau, ce qui permet de contrôler la qualité des réactifs. Les valeurs indiquées sont rapportées à la coloration fournie par une micromole de la substance considérée.

III. — EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

a) *La méthode de ROSEN et al.* (1962), appliquée à l'analyse des amines après séparation sur colonne de résine, ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. Dans les fractions ayant séjourné une nuit à l'air, on observait une baisse du blanc-réactif, lequel était élevé au départ, et une réaction colorée non quantitative avec les amines et l'ammoniac.

Ceci nous a amené à utiliser un autre réducteur, l'acide ascorbique, et à ajouter ce dernier au moment du dosage.

TABLEAU I

Relation entre la quantité du réducteur et la formation du complexe coloré

Acide ascorbique mg/tube	Densité optique $\times 10^3$	
	Blanc	N (NH ₃) 1 μ M
0	15	56*
10	16	640
20	16	830
30	17	975
40	17	1 000
50	18	1 001
60	18	1 001

(¹) La valeur du blanc est déduite.

La quantité d'acide ascorbique nécessaire pour obtenir le maximum de coloration est de l'ordre de 50 μ g par ml. Le blanc-réactif est très faible et reste pratiquement indépendant de la quantité de réducteur (tabl. I). L'essai reporté a été effectué avec l'ammoniac, la coloration fournie par ce dernier étant très sensible à la quantité d'hydrindantine présente dans le milieu réactionnel.

Cette quantité de réducteur (50 $\mu\text{g/ml}$) est suffisante pour une teneur en azote aminé de l'ordre de 3 micromoles/ml et doit être augmentée pour des teneurs plus élevées (fig. 1). Les valeurs indiquées sont obtenues par dilution de la solution à doser avant la lecture.

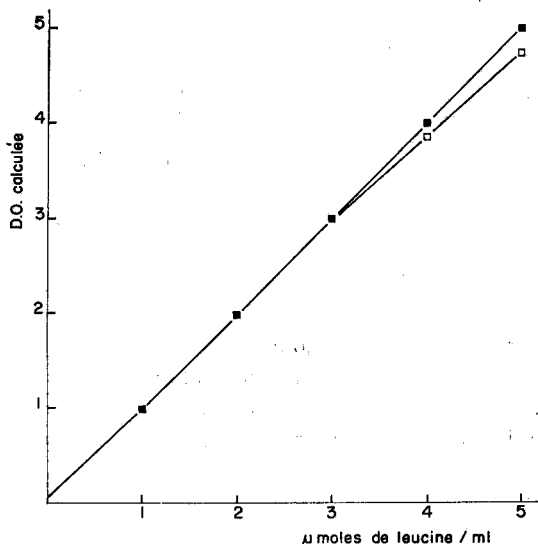


FIG. 1. — Influence du réducteur
 □ 50 $\mu\text{g A. Ascorbique/ml}$. ■ 100 $\mu\text{g A. Ascorbique/ml}$.

TABLEAU 2

Influence du pH sur le développement de la coloration

	pH de la solution		Densité optique ⁽¹⁾			
	Seule	+ réactif	Leucine ⁽²⁾	NH ₃	Tryptophane	
H ₂ O		5,84	1 003	840	917	
Citrate {	0,5 N.....	6	5,80	1 002	960	902
	2 N.....	5	5,69	1 010	920	907
	0,2 N.....	3,25	5,67	1 010	950	910
	0,2 N.....	4,25	5,72	1 010	940	911
Acide acétique {	N.....	2,37	5,45	967	864	825
	2 N..	2,16	5,25	917	796	822
	3 N..	2,02	5,11	859	773	771

⁽¹⁾ Densité optique $\times 10^3$ rapportée à 1 $\mu\text{M/ml}$.

⁽²⁾ La valeur du blanc réactif a été déduite.

b) Le pH du milieu réactionnel joue un rôle important sur le développement de la coloration. Dans la réaction étudiée par MOORE et STEIN (1948), le maximum de coloration n'était pas obtenu au même pH pour la leucine, le tryptophane et l'ammo-

niac. Or, dans l'analyse chromatographique des acides aminés et amines, les effluents de colonne peuvent présenter une gamme variée de pH et de concentration saline. Il est préférable dans la pratique de disposer d'un pouvoir tampon suffisant, plutôt que d'ajuster le pH du liquide à doser.

L'expérience montre que le réactif est très tamponné, et il n'est nécessaire de corriger le pH que pour des solutions très acides (tabl. 2). Les tampons usuels fournissant des valeurs pratiquement identiques.

IV. — RÉSULTATS

a) La détermination du coefficient de coloration propre à chaque substance est effectuée sur des solutions contenant 0,0,1—0,2—0,4 et 0,5 micromoles de celle-ci,

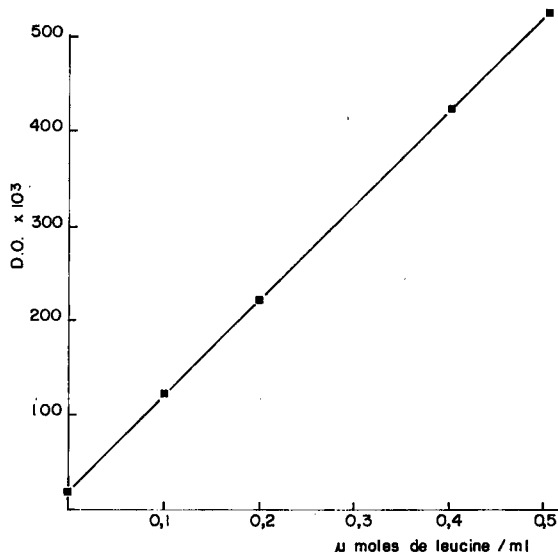


FIG. 2. — Dosage de la leucine

TABLEAU 3

Analyse d'un étalon leucine

	1 ^{er} série	2 ^e série
.D. × 10 ³ pour 1 μM/ml...	1 035 ± 17,8	1 019 ± 10,8

afin de rester dans les limites dans lesquelles la lecture photométrique fournit une droite en fonction de la concentration (fig. 2).

b) *La reproductibilité de la méthode* est satisfaisante, d'après les résultats obtenus sur deux séries de 9 analyses effectuées à 6 mois d'intervalle (tabl. 3).

TABLEAU 4

Facteurs de coloration obtenus avec des acides aminés, amines, et substances diverses, rapportés à la leucine = 100

Leucine.....	100	NH ₃	97
Méthionine.....	99	Méthylamine.....	98
Glycine.....	94	Éthylamine.....	98
Alanine.....	103	Propylamine.....	98
Isoleucine.....	101	Butylamine.....	100
Phénylalanine.....	97	Éthanolamine.....	92
Valine.....	100	Leucamine.....	100
Lysine.....	109	Putrescine.....	115
Ornithine.....	112	Phénylalanine.....	97
Arginine.....	97	Tyramine.....	97
Histidine.....	95	Allylamine.....	87
Tryptophane.....	90	Histamine.....	77
Acide aspartique.....	94	Agmatine.....	91
Acide glutamique.....	99	Tryptamine.....	72
Thréonine.....	95	Cadavérine.....	108
Citrulline.....	111	Ansérine.....	84
Sérine.....	96	Carnosine.....	84
Tyrosine.....	98	Acide δ-amino-valérique.....	94
1-méthylhistidine.....	92	Acide γ-amino-butyrique.....	95
3-méthylhistidine.....	94	Urée.....	0,03
Asparagine.....	94	Guanidine.....	0
Glutamine.....	99	Acide uréidosuccinique.....	0
5-hydroxytryptophane.....	81	Diéthylamine + (jaune-vert).....	
Glucosamine.....	93		

c) *Les facteurs de coloration* sont indiqués dans le tableau 4.

CONCLUSION

Le but de cette mise au point était d'obtenir une réaction colorée aussi sensible que possible avec les amines biologiques et l'ammoniac, pour leur analyse par chromatographie sur colonne de résine. Les résultats montrent que ces substances fournissent une coloration, sur une base équimoléculaire, très voisine des acides aminés correspondants.

Le pouvoir tampon élevé du réactif, qui permet d'analyser des effluents de pH varié sans correction, la faible valeur du blanc-réactif, qui n'est influencé ni par le pH, ni par la concentration saline de la solution à doser, sont également des facteurs favorables.

Enfin, la conservation du réactif effectué sans précautions spéciales pendant plus de trois mois, permet d'envisager des analyses discontinues avec une bonne reproductibilité.

Reçu pour publication en mai 1968.

SUMMARY

QUANTITATIVE ESTIMATION OF AMINO-ACIDS AND AMINES BY NINHYDRINE
EXPERIMENTAL IMPROVEMENTS

The reagents used for colorimetric estimation of amino-acids are :

(a) 20 g ninhydrine dissolved in 500 ml methyl Cellosolve, with a sodium propionate buffer (201.8 g) and 93 ml propionic acid, brought to 1 liter with H₂O.

(b) 1 mg ascorbic acid dissolved per ml water.

The solution to estimate (1 ml) is added with 1 ml reagent (a) plus 0.1 ml reagent (b). After 15 mn in a boiling water bath, 15 ml of 50 per cent aqueous ethanols is added and coloration recorded at 570 m μ .

Our results show.

1. A good stability of reagent (a), which can be kept for more than three months in contact with the air.
2. An excellent reproducibility of coloration.
3. A high buffer activity that allows the analysis of effluents of various pH values without corrections.
4. Coloration with primary amines very similar to that of the corresponding amino-acids.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CADAVID N. G., PALADINI A. C., 1964. Automatic amino-acid analysis : reagent and instrumental improvements. *Analyt. Biochem.*, **9**, 170-174.
- CONNELL G. E., DIXON G. H., HANES C. S., 1955. Quantitative chromatographic methods for the study of enzymic transpeptidation reactions. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 416-427.
- KALANT H., 1956. Colorimetric ninhydrin reaction for measurement of alpha amino nitrogen. *Anal. Chem.*, **28**, 265-266.
- MATHESON A. T., TIGRANE E., HANES C. S., 1961. Quantitative chromatographic methods. 5. An improved ninhydrin hydrindantin reagent. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 417-425.
- MOORE S., STEIN W. H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids. *J. Biol. Chem.*, **176**, 367-388.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913.
- PIEZ K. A., MORRIS L., 1960. A modified procedure for the automatic analysis of amino acids. *Anal. Biochem.*, **1**, 187-201.
- ROSEN H., 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 10-15.
- ROSEN H., BERARD C. W., LEVENSON S. M., 1962. A simplified procedure for automatic amino acid analysis. *Analyt. Biochem.*, **4**, 213-221.
- SPACKMANN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190-1206.
- STEGEMANN H., 1960. Bestimmung von Aminosäuren mit dithionitradiezertem Ninhydrin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **319**, 102-109.
- TROLL W., CANNAN R. K., 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.*, **200**, 803-811.
- YAMAGISHI M., YOSHIDA T., T., 1953. Studies on ninhydrin reaction. I. Colorimetric determination of α -amino acids. *J. Pharm. Soc. Japan*, **73**, 675-676.
- YEMM E. W., COCKING E. C., 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.*, **80**, 209-213.