LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

J. PIEN, J. BAISSÉ et R. MARTIN. — Le dosage du diacétyle dans les beurres. Méthode d'expertise 673

M. POLONOVSKI. — Modifications physico-chimiques des constituants du lait au cours de la concentration en présence de sirop de sucre 699

J. VIEILLY et J. HARDER. — Actinisation du lait (*fin*) 707

Revue :

G. GÉNIN. — La conservation des produits laitiers par le procédé Hofius 727

Bibliographie analytique :

1^o Les livres 729

2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 733

Bulletin bibliographique :

1^o Les livres 779

2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 780

Documents et informations :

G. THIEULIN. — Le « bon lait » indispensable au consommateur, profitable au producteur 785

E. HAUCK. — L'importance économique et l'organisation de l'industrie laitière allemande 789

Le concours laitier-beurrier de Paris en 1937 793

Programme officiel du Congrès international de laiterie, Berlin 22-28 août 1937 795

Congrès de l'hygiène et de la science du lait, Paris, 21-22-27 juin 1937 798

Création d'un comité du lait dans divers départements 799

Ecole nationale d'industrie laitière de Mamirolle 800

Ecole nationale d'industrie laitière de la Roche-sur-Foron 800

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

LE DOSAGE DU DIACÉTYLE DANS LES BEURRES

(Méthode d'expertise)

par

JEAN PIEN

Ingénieur-Chimiste (I. C. R.)

Docteur ès-sciences

Directeur des Laboratoires des « Fermiers Réunis »

JACQUES BAISSÉ

et

ROBERT MARTIN

Ingénieur-Chimiste (I. C. R.)

Ingénieur-Chimiste (I. C. R.)

des Laboratoires de la Laiterie des « Fermiers Réunis ».

* * *

La plupart des travaux relatifs au diacétyle ont, comme objet essentiel, soit l'étude des fermentations qui lui donnent naissance,

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

soit l'examen des conditions physiques et chimiques de sa formation ou de sa disparition dans le cadre de la préparation industrielle des levains lactiques, de la crème et du beurre.

Dans ces travaux, les méthodes actuellement connues de dosage du diacétyl (et de sa substance mère : l'acétylméthylcarbinol) n'ont servi que de moyen pour atteindre une fin plus élevée et plus vaste. Ces méthodes se sont révélées parfaitement satisfaisantes dans les conditions particulières où l'on avait à les appliquer.

Tout autre est le problème du dosage du diacétyl dans le beurre en tant que *procédé destiné à dépister la fraude éventuelle*. Ce problème est dominé par un certain nombre de considérations théoriques et pratiques qui en font une question tout à fait indépendante des études dont nous venons de parler.

D'abord, à l'inverse de ce qui se passe dans ces travaux où l'on dose toujours la somme : acétylméthylcarbinol + diacétyl, il nous faut ici doser le diacétyl seul. Nous verrons pourquoi.

Ensuite, pour l'interprétation des résultats, il est indispensable de connaître les quantités de diacétyl rencontrées naturellement dans les beurres non falsifiés.

Il faut encore posséder l'ordre de grandeur des quantités de cette substance susceptibles d'être apportées frauduleusement : y a-t-il des doses supérieures ou inférieures limites, en dehors desquelles la fraude ne peut pas songer à s'exercer ? Ces doses ne fixent-elles pas des nécessités particulières quant aux possibilités de dosage ? Ne font-elles pas apparaître des impossibilités ?

Enfin, puisqu'il s'agit du problème de la découverte d'une fraude éventuelle, il faut tenir compte d'une considération pratique importante qui influence la sensibilité à exiger de la méthode de dosage : le poids d'échantillons mis à la disposition de l'expert. Le problème change en effet totalement, suivant que l'on dispose de 50 grammes de beurre ou que l'on peut opérer sur un kilogramme.

Ces diverses considérations doivent être étudiées avant toute autre chose car ce sont elles qui vont fixer les *données du problème* à résoudre. Nous en ferons la première partie de notre exposé.

Dans une seconde partie, nous étudierons le dosage du diacétyl lui-même, dans la limite des données ainsi fixées et pour le but précis que nous nous sommes fixé ici.

PREMIÈRE PARTIE

LES DONNÉES DU PROBLÈME

I. Diacétyl et acétylméthylcarbinol

Dans les études biochimiques relatives à la fermentation lactique, aux levains, à la maturation des crèmes, à la fabrication du beurre

même, la question de l'acétylméthylcarbinol présente plus d'importance que celle du diacétyle. On admet que le premier peut produire peu à peu le second par oxydation, ce dernier étant toujours beaucoup moins abondant que l'acétylméthylcarbinol.

En fait, pour les dosages, on ne se préoccupe que de la somme de ces deux substances. On transforme intégralement la cétone-alcool en diacétyle ; on obtient ainsi un chiffre relativement important exprimé généralement en milligrammes de sel de nickel du diméthylglyoximate (méthode Lemoigne) correspondant à la somme : diacétyle + acétylméthylcarbinol.

Si on ne dose que le diacétyle (et on le peut si on se contente d'entraîner à la vapeur sans peroxyder le carbinol) on obtient des résultats beaucoup plus faibles, négligeables même dans de nombreux cas. Pratiquement, le dosage du diacétyle seul n'est que rarement effectué dans ces études où il présente peu d'intérêt.

Dans le cas du beurre au point de vue général, la même observation se justifie. La détermination du diacétyle seul, jusqu'à plus ample informé, ne présente pas grand intérêt. Comme on le verra ci-après, les doses naturelles de diacétyle seul sont très faibles dans les beurres alors que les teneurs en acétylméthylcarbinol sont beaucoup plus élevées comme l'ont montré les auteurs de l'Ecole américaine : HAMMER, MICHAELIAN, FARMER, STAHLY, WERMAN [1, 2, 3].

Mais là n'est pas la question. Nous nous proposons ici, non pas l'étude du beurre normal, mais la *détermination précise du diacétyle frauduleusement introduit*.

Devant cet objectif précis, le dosage de l'acétylméthylcarbinol naturel (et a fortiori la somme : diacétyle introduit + acétylméthylcarbinol naturel) ne présente pas d'intérêt. Bien plus, ce dosage global constituerait une gêne : Les doses d'acétylméthylcarbinol naturel sont, selon nous, encore supérieures aux quantités de diacétyle susceptibles d'être introduites frauduleusement. Nous risquons donc de voir disparaître l'appréciation du diacétyle introduit sous les variations de l'acétylméthylcarbinol naturel.

Il semble donc évident d'avoir à laisser de côté cette substance naturelle et de doser uniquement le diacétyle.

On objectera que la fraude pourrait aussi consister en un apport d'acétylméthylcarbinol. Nous croyons pouvoir répondre que le problème ne se pose pas. L'acétylméthylcarbinol n'est pas un parfum, ni un arôme. Il ne possède ni ne communique au beurre, aucune saveur ni aucune odeur. Les travaux de VIRTANEN [4] l'ont montré. Nos observations personnelles le confirment. Il ne sera donc pas introduit dans le beurre pour améliorer ses qualités organoleptiques.

Mais, dira-t-on, ne pourrait-on introduire frauduleusement de l'acétylméthylcarbinol dans l'espoir de le voir s'oxyder peu à peu en diacétyl ? Cette question semble devoir comporter une réponse négative puisque les beurres normaux (même ceux qui ne contiennent que des traces de diacétyl) sont presque toujours relativement riches en acétylméthylcarbinol et ne sont pas plus parfumés de ce fait.

Si vraiment cette oxydation peut se produire *dans le beurre* (de nombreux faits semblent cependant prouver le contraire) le rapport des deux substances doit être sous la dépendance d'un état physico-chimique précis auquel un léger apport supplémentaire de la cétone-alcool ne changera rien. Cet apport ne modifiera donc pas la teneur normale en diacétyl et n'améliorera pas l'arôme du produit. Enfin l'expérience montre que le diacétyl diminue rapidement dans les beurres avec le temps au lieu de s'accroître comme le laisserait supposer l'oxydation du carbinol. Nous travaillons actuellement à préciser ces diverses notions, mais nous pensons pouvoir déjà affirmer que la question de l'addition frauduleuse d'acétylméthylcarbinol dans le beurre ne se pose pas.

Se poserait-elle pour la crème pendant la maturation ? Le problème est ici tout différent. La transformation en diacétyl qui pourrait vraiment en résulter (parce que, dans la crème, une oxydation peut facilement s'établir) se traduirait éventuellement par une majoration du taux de diacétyl dans le beurre, exactement comme par un apport direct de cette dicétone. Nous retombons donc dans le cas général de la recherche de l'apport de diacétyl et la conclusion serait la même, du moins en ce qui concerne le fait de la fraude.

En résumé : l'apport d'acétylméthylcarbinol ne semble pas devoir être envisagé comme une fraude d'aromatisation du beurre lui-même. Si cet apport frauduleux avait lieu dans la crème, l'élévation du taux de diacétyl du beurre traduirait et révélerait la fraude en nous replaçant dans le cas général de l'introduction de diacétyl. Nous pensons donc que le dosage de l'acétylméthylcarbinol n'est pas nécessaire au point de vue du but poursuivi ici. C'est véritablement le diacétyl que le fraudeur cherchera à introduire dans le beurre et c'est lui qui doit être dosé directement et isolément.

Ces considérations comportent une conséquence importante :

Alors que dans les études auxquelles nous avons fait allusion plus haut on dosait la somme diacétyl + acétylméthylcarbinol et on obtenait de ce fait une quantité appréciable de sel de nickel du diméthylglyoximate (jusqu'à 15-20 mgr. par kilogramme de beurre par exemple), dans le dosage du diacétyl seul nous allons nous trouver en présence de chiffres beaucoup plus faibles (par exemple :

une fraction de milligramme par kilogramme de beurre normal, quelques milligrammes dans des beurres additionnés frauduleusement de diacétyle).

La méthode de dosage qui convenait pour la somme des deux substances conviendra-t-elle encore au dosage du diacétyle seul, même dans le cas des beurres frelatés ?

La réponse à cette question va vous être fournie ci-après.

II. Teneur en diacétyle naturel des beurres normaux

Notre première préoccupation, après avoir mis au point une méthode de dosage remplissant toutes les conditions imposées, fut de procéder à une enquête détaillée sur les beurres français.

Nous avons, par cette méthode qui a fait maintenant ses preuves, dosé le diacétyle sur environ 130 échantillons de beurre produit pendant une année dans diverses régions de France, en opérant sur un kilogramme de beurre en général.

Voici les résultats obtenus en milligrammes de diacétyle par kilogramme de beurre. (Le terme « traces » signifie moins de 0 mgr. 05 par kilogramme ; la méthode que nous décrirons permet en effet d'apprécier avec certitude et avec la plus grande facilité le demi-dixième de milligramme de diacétyle.)

Ce tableau nous montre : que tous les beurres examinés renferment des quantités de diacétyle inférieures à 1 milligramme par kilogramme ; que 11 % d'entre eux seulement en renferment entre 0 mgr. 5 et 1 mgr. par kilogramme ; que 47 % en contiennent entre 0 mgr. 1 et 0 mgr. 5 par kilogramme et que 42 % en ont moins d'un dixième de milligramme par kilogramme.

Aucun beurre n'a été trouvé rigoureusement exempt de diacétyle ; mais, pratiquement, les 9/10 en renferment moins d'un demi-milligramme par kilogramme.

Cette enquête mériterait d'être reprise par d'autres laboratoires, poursuivie et étendue à d'autres régions et sur un plus grand nombre d'échantillons.

Remarques

1° Influence de la saison.

Ce tableau nous montre que la saison ne semble pas influencer la teneur du beurre en diacétyle naturel.

Les pourcentages des beurres contenant moins de 0 mgr. 1 par kilogramme, ou moins de 0 mgr. 5 par kilogramme, sont les mêmes, quelle que soit la saison.

Il est d'ailleurs connu que ce sont les conditions de la préparation de la crème (maturation) et de la fabrication du beurre qui jouent le rôle prépondérant. Le diacétyle de la crème et du beurre en effet possède une origine bactériologique ; les facteurs qui règlent l'activité des microorganismes producteurs d'acétylméthylcarbinol et de diacétyle, ainsi que les conditions

	Printemps	Eté	Automne	Hiver
Normandie	traces	0,05	0,50	0,10
	traces	0,07	0,50	0,20
	0,50	0,10	0,20	0,50
	traces	0,15	0,25	0,05
	traces	0,35	0,40	traces
	traces	0,07	0,50	traces
	0,50	0,20	0,70	0,40
	0,50	0,25	0,10	traces
	traces	0,15	traces	0,20
	0,70	0,15	traces	0,40
	0,05	0,10	0,05	0,10
	0,20	0,10	0,80	0,50
	0,05	0,15	0,05	0,10
	0,12	0,10	0,20	0,40
	0,15	0,20	0,25	0,40
		0,60		
	0,70	0,30	0,10	0,20
	0,05	0,15	0,25	0,40
Nord et Est	0,10	0,35	0,10	0,10
	0,50	0,20	0,25	0,30
	0,35	0,40	0,20	
	0,15		0,40	
			0,50	
			0,80	
Charentes			0,40	
	0,70			
	0,25			
	0,60			
	0,70			
	0,90			
	0,80			
	0,10	0,15	0,10	traces
	0,05	0,20	0,10	traces
	0,65	0,05	0,10	0,50
Beurres de grands mélanges (crèmes de Normandie, Nord, Est, etc.)	0,45	0,05	0,10	0,60
	0,15	0,50	0,05	traces
	0,20	0,20	traces	0,10
		0,10	0,05	0,10
		0,05	traces	0,20
			traces	traces
			0,25	0,80
			traces	
			0,05	
			0,40	

physiques des opérations de fabrication peuvent agir sur la teneur en diacétyle du beurre. La saison ne pourrait jouer qu'un rôle secondaire ou indirect, par son influence sur l'activité de certaines bactéries productrice d'arôme.

Les beurres provenant de crèmes mûries spontanément sans apport de levains lactiques devraient être théoriquement plus sensibles à ces influences que les beurres industriels. Or le tableau ci-dessus ne fait rien apparaître de semblable : les beurres dits « de grands mélanges » proviennent de crèmes mûries spontanément, alors que la plupart des autres proviennent de crèmes pasteurisées et ensemencées de levains lactiques. Il n'y a pratiquement pas de différence dans les teneurs en diacétyle.

Par conséquent, la teneur en diacétyle ne semble pas être influencée par la saison pour autant qu'on puisse en juger par nos résultats.

2° Influence de la région d'origine.

Nos chiffres, malheureusement trop peu nombreux, surtout en ce qui concerne les beurres des Charentes, semblent montrer que les produits de cette région sont plus riches en diacétyle que la moyenne des autres.

Il n'est pas impossible qu'il y ait là un rapport naturel. Mais nous ne nous croyons pas autorisés à tirer une conclusion. Il nous faudrait plusieurs centaines de beurres de chacune des grandes régions de France. De nouvelles études, seules, pourront permettre de saisir ce rapport s'il existe.

3° Diacétyle et arôme du beurre.

Tous les échantillons de beurre examinés ci-dessus ont été dégustés.

L'odeur, la saveur, l'arôme ont été notés.

D'une manière générale, les beurres riches en diacétyle (par exemple : 0 mgr. 5 et plus par kilogramme) avaient un arôme plus prononcé et recevaient une bonne note. Mais la réciproque n'est pas vraie : nous avons rencontré d'excellents beurres ne renfermant que des traces de diacétyle.

Dans l'ensemble des facteurs qui déterminent la saveur d'un beurre, le diacétyle semble n'occuper qu'une place limitée. Si l'apport d'une quantité relativement faible de diacétyle (voir ci-après) améliore incontestablement les beurres en renforçant leur arôme (et c'est peut-être là l'un des éléments de la supériorité des beurres des Charentes), il ne faut pas omettre que les qualités particulières à certains beurres naturellement très bons tiennent à d'autres facteurs qu'au diacétyle. Ces facteurs, d'essence chimique eux aussi, dépendent de la région d'origine, du climat, de la race des animaux, de la nourriture, etc., et se caractérisent très vraisemblablement par une structure particulière des lipides du beurre.

Le diacétyle, quand il existe en quantités sensibles, superpose donc son odeur et sa saveur aux impressions organoleptiques qui résultent du jeu des facteurs dont nous venons de parler et que nous appelons « facteurs de cru ». Par conséquent, dans un beurre quelconque qui n'a pas bénéficié de l'action de ces facteurs, le diacétyle constitue à lui seul tout l'arôme du produit et un léger apport de cette substance améliore artificiellement la qualité (d'où la fraude).

Dans un très bon beurre ou dans un beurre de grand cru, le diacétyle joue aussi, quand il est assez abondant, un rôle appréciable ; mais il ne constitue alors qu'un des éléments du complexe « qualité ».

Dans tous les cas donc, le diacétyle joue un rôle favorable. Mais on conçoit fort bien qu'on puisse avoir des beurres de qualité n'en renfermant que des traces.

III. Quantités de diacétyle susceptibles d'être apportées frauduleusement

Nous nous sommes longuement expliqués dans notre travail de l'an dernier [5], sur les raisons qui doivent faire considérer comme une fraude l'addition de diacétyle au beurre. Nous n'y reviendrons pas. Ce qui vient d'être dit, d'ailleurs, concernant l'un des aspects de cette question, constitue la base d'un des arguments essentiels.

Mais ce que nous devons chercher à connaître, maintenant, ce sont les doses susceptibles d'être employées par les fraudeurs ; car la méthode d'analyse employée pour dépister la fraude sera nécessairement influencée par l'importance de ces additions.

Nous connaissons l'ordre de grandeur des teneurs naturelles des beurres normaux en diacétyle. Les quantités de diacétyle susceptibles d'être introduites frauduleusement dans les beurres sont-elles voisines des doses naturelles, ou très supérieures, et de combien ?

Pour résoudre cette question, nous avons préparé nous-mêmes, en laboratoire, des beurres additionnés de quantités connues et croissantes de diacétyle.

Nous avons rapidement constaté qu'il existe une limite que la fraude ne peut pas atteindre sans risquer de compromettre immédiatement ou rapidement la qualité du beurre. Nous pensons que la fraude la plus importante à déceler n'est pas celle qui provoque ces altérations rapides, mais bien celle qui améliore vraiment l'arôme sans entraîner d'inconvénients. C'est en effet la seule qui sera employée par un fraudeur avisé.

Or, il apparaît que ces doses « *commerciallement utilisables* » par la fraude sont très faibles. Voici, en effet, ce que nous avons observé en ajoutant du diacétyle (solution aqueuse au 1/1.000^e) à du beurre sans arôme, par malaxage à froid :

1^o Un apport de quelques milligrammes de diacétyle par kilogramme confère au beurre après quelques heures un arôme très fin et très agréable sans faire apparaître aucun défaut.

Le beurre à 2-3 mgr., très nettement supérieur au témoin qui n'en renferme que des traces, est en même temps légèrement supérieur au beurre qui en renferme 5 mgr. Néanmoins ce dernier est également très supérieur au témoin.

Le beurre à 10 mgr. par kilogramme est jugé trop parfumé, peu agréable, par certains dégustateurs.

Le beurre à 20 mgr. par kilogramme est jugé désagréable unani-

mement (forte odeur de diacétyle ; irrite la gorge). Pourrait néanmoins être consommé (?).

2° Deux ou trois jours plus tard, les conclusions sont légèrement différentes suivant les essais :

Dans une expérience c'est le beurre à 2-3 mgr. qui est encore jugé le meilleur de tous. Dans une autre c'est le beurre à 5 mgr. Le beurre à 10 mgr. est considéré soit comme « limite », soit comme désagréable (moins bon que le témoin). Serait encore consommable pour certains dégustateurs.

Le beurre à 20 mgr. est unanimement déclaré inacceptable.

3° Six ou huit jours après le début des expériences, l'optimum paraît se fixer sur le beurre à 5 mgr. Les beurres à 2-3-5 mgr. sont tous déclarés bons, *non rances*. Le témoin est plus altéré que ces beurres additionnés de diacétyle. En revanche, le beurre à 10 mgr. est légèrement suiffeux, nettement moins bon que les précédents (témoin y compris). Le beurre à 20 mgr. beaucoup plus rance et suiffeux que tous les autres, possédant toujours une forte odeur de diacétyle, est inconsommable.

Plusieurs expériences concordantes permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

1° La dose de 20 mgr. de diacétyle par kilogramme nuit immédiatement, et de plus en plus par la suite, à la qualité du beurre. Ce n'est pas une dose susceptible d'être utilisée par un fraudeur.

2° La dose de 10 mgr., bien qu'un peu trop forte à notre avis, peut encore être employée. Dans certains cas, elle nuit déjà nettement à la qualité.

3° Les doses comprises entre 1 et 5 milligrammes apportent un arôme incontestable et n'entraînent pas d'inconvénients ni immédiatement, ni dans les huit jours qui suivent (beurres conservés à 20°-25°) (1).

Il n'est pas possible de préciser quelle est la dose optima. Elle varie sans doute avec les beurres et cet optimum se déplace dans le temps. Peut-être même dans certains cas la dose de 5 mgr. pourrait-elle être dépassée avec profit (?). Mais là n'est pas la question.

Ce qui nous importe ici c'est de savoir que la dose de 20 mgr. par kilogramme ne peut pas être utilisée par la fraude. Considérons donc que l'expert aura, dans la grande majorité des cas, à doser moins de 20 et même moins de 10 mgr. de diacétyle par kilogramme de beurre (supposé falsifié).

(1) Le rancissement dû à l'emploi du diacétyle signalé par divers auteurs ne s'est produit qu'aux doses de 10-20 mgr. par kilogramme dans nos essais. Un fraudeur avisé n'atteindra pas ces doses.

IV. Quantités de beurre disponible pour l'expertise Quantités absolues de diacétylène à doser

Nous avons donc dès à présent un certain ordre de grandeur des données du problème. Résumons-les en disant qu'un beurre normal titre très généralement moins (et même beaucoup moins) de 1 mgr. par kilogramme, et que les beurres fraudés titreront généralement entre 1 et 10 mgr. (rarement plus) par kilogramme.

Si l'expert disposait d'une quantité de beurre très importante (plusieurs kilogrammes) le problème pourrait être résolu par les méthodes déjà existantes (bien que dans certains cas de faibles fraudes on serait à la limite de sensibilité). Mais pratiquement il ne dispose que de quantités beaucoup plus faibles. Après avis pris auprès des experts-chimistes spécialisés dans l'expertise des beurres, on estime qu'il faut pouvoir effectuer le dosage du diacétylène sur 100 gr. de beurre *au maximum*. (VIZERN et GUILLOT [6] estiment même qu'une opération aisée à réaliser en laboratoire ne devrait pas porter sur une prise d'essai supérieure à 50 gr.)

Ce qui se traduit, pour la valeur absolue du diacétylène de la prise d'essai, par les quantités suivantes : beurres naturels : moins de 1/10^e de milligramme dans la prise d'essai de 100 gr. ; beurres falsifiés : 0,1 à 1 mgr. dans la prise d'essai de 100 grammes.

Le problème qui se pose (dont nous avons maintenant toutes les données) est donc le suivant : disposer d'une méthode d'analyse permettant d'apprécier avec certitude une fraction de milligramme de diacétylène dans une prise d'essai de 100 grammes de beurre.

La méthode que nous avons mise au point dans ce but, et que nous allons maintenant décrire, permet d'y parvenir avec une grande sécurité puisqu'elle donne le moyen d'apprécier facilement jusqu'à 0 mgr. 05 de diacétylène dans 10 cm³ de distillat comme limite inférieure, avec la précision du dixième de milligramme, dans tous les cas.

DEUXIÈME PARTIE

LE DOSAGE DU DIACÉTYLÈNE DANS LES CONDITIONS DE L'EXPERTISE

I. Insuffisance des méthodes actuelles

Jusqu'à ces dernières années deux méthodes principales étaient utilisées pour l'identification et le dosage du diacétylène dans les levains lactiques, les crèmes, les beurres, etc. :

Les méthodes du type Voges-Proskauer à la créatine.

Les méthodes du type Lemoigne au nickel.

Ces deux groupes de méthodes ne sauraient convenir au but poursuivi ici :

En effet :

1^o Méthode Voges-Proskauer.

C'est la plus ancienne des méthodes d'identification du diacétyle. En 1911 déjà, HARDEN et NORRIS [7] étudiaient en détail les principes de cette réaction qui sont les suivants :

Certaines substances protidiques et principalement les dérivés de la guanidine (dicyandiamide, créatine, arginine...) en milieu fortement sodique, donnent avec l'acétylméthylcarbinol et le diacétyle une coloration rouge plus ou moins intense.

De nombreux auteurs ont étudié cette réaction fort intéressante au point de vue général : O'MEARA [8], WERKMANN [9], LEIFSON [10], BEDFORD [11], BARRITT [12], RITTER [13]. Nous poursuivons également sur ce sujet des recherches qui seront publiées ultérieurement. Mais dès à présent nous pouvons dire que cette méthode ne se prête pas au dosage du diacétyle, d'abord parce qu'elle est positive également — et, malheureusement, d'une manière différente — avec l'acétylméthylcarbinol, ensuite parce que l'intensité de la réaction colorée qu'elle fournit n'est pas proportionnelle à la concentration des corps à doser. Nos observations confirment en cela celles de RITTER [13]. Comme l'écrit fort bien ce savant, c'est une réaction excellente pour les recherches d'orientation, mais non une méthode de dosage.

La réaction de Voges-Proskauer pourra peut-être devenir une méthode de dosage de la somme diacétyle + acétylméthylcarbinol (non oxydé en diacétyle) et nous y travaillons actuellement car ce résultat serait fort intéressant. Mais pour le moment elle ne le permet absolument pas.

En dépit de sa sensibilité *qui est très grande* (beaucoup plus grande que celle de la méthode au nickel et presque aussi grande que celle de la méthode qui sera décrite plus loin) cette technique ne peut donc pas être retenue pour le but poursuivi ici.

2^o Méthode Lemoigne.

Il est inutile de rappeler le principe bien connu de la méthode de Lemoigne [14].

Le mécanisme de la formation du diméthylglyoximate de nickel exclut théoriquement et pratiquement la possibilité d'une réaction avec l'acétylméthylcarbinol et c'est là un avantage considérable sur les méthodes du groupe précédent.

La méthode Lemoigne est la méthode classique par excellence du dosage du diacétyle et elle est universellement appliquée avec, éventuellement, des variantes qui en augmentent la précision ou la sensibilité (TAPERNOUX [15], VIZERN et GUILLOT [6], MOHLER et

HELBERG [16], NOTTBOHM [17], BARNICOAT [18], FEIGL [19], TESTONI et CIUSA [20].)

Dans notre étude précédente parue ici même [5] nous avons émis l'opinion que cette méthode, intéressante quand on dose des quantités importantes de diacétyle ou lorsqu'on dose la somme diacétyle + acétylméthylcarbinol après oxydation de ce dernier en diacétyle, ne convient pas lorsqu'on se propose de doser le diacétyle seul dans les beurres. Cette opinion, basée sur les faibles teneurs des beurres en diacétyle, va se trouver ici singulièrement renforcée par la prise en considération des « données » du problème que nous nous proposons de résoudre, c'est-à-dire des conditions mêmes de l'expertise.

Ne perdons pas de vue, en effet, que l'expert doit être à même, avons-nous dit, d'apprécier avec certitude une fraction de milligramme de diacétyle pour une prise d'essai de 100 grammes de beurre. Or, nous verrons plus loin que cette fraction de milligramme ne peut pas être recueillie dans un volume de distillat inférieur à 10 cm³ par entraînement à la vapeur. La « solution » de diacétyle à titrer est donc à une concentration inférieure à 1/10.000^e (ce chiffre est une limite supérieure pratiquement jamais atteinte).

Or quelles sont les possibilités offertes par la méthode au nickel ?

TAPERNOUX [15], qui a étudié en détail l'application de cette méthode au cas des beurres, signale que pour une concentration de 1/2.000^e, la réaction de Lemoigne est très faiblement positive. Le précipité est très faible et très long à se produire. Or, nous avons à opérer sur des solutions 5 à 10 fois plus diluées.

TAPERNOUX, cependant, améliore la sensibilité de la méthode en diluant les solutions de sel de nickel comme l'ont fait VIZERN et GUILLOT [6], TESTONI et CIUSA [20] et en procédant à l'examen microscopique de la solution pour y découvrir de très fins cristaux de diméthylglyoximate de nickel. Mais on reste là dans le domaine des appréciations qualitatives à la limite de sensibilité, et on ne parvient pas à faire apparaître une réaction positive dans des solutions au 1/10.000^e, au 1/20.000^e, etc.

Au point de vue des conditions normales d'un dosage nous avons appliqué à la lettre la technique décrite par TAPERNOUX (*loc. cit.*, p. 1049) et nous n'avons absolument rien obtenu dans le cas de la concentration la plus élevée de celles qui nous intéressent : 1/10.000^e (1 milligramme dans 10 cm³).

Eussions-nous abouti à précipiter intégralement ce milligramme, que le complexe eût seulement pesé 1 mgr. 6. Or la filtration, le lavage, la pesée exacte... d'un si faible précipité ne constituent pas des opérations sans danger pour la sécurité des résultats.

D'ailleurs le précipité ne se forme pas à ces dilutions et il faut réserver cette méthode à des concentrations plus élevées. La

technique de Tapernoux ne fournirait une réponse positive (en opérant sur 100 grammes de beurre) que si celui-ci renfermait 50 mgr. de diacétyle par kilogramme, et encore nous serions à l'extrême limite inférieure de la sensibilité de cette méthode.

VIZERN et GUILLOT [6], en modifiant assez sensiblement le processus opératoire, parviennent à faire apparaître un précipité en partant d'un milligramme de diacétyle ou même d'une fraction de milligramme. Nous avons expérimenté cette méthode dont la limite inférieure de sensibilité paraît être 0 mgr. 4 de diacétyle dans 10 cm³ d'eau (1/25.000^e). Cette sensibilité est encore très insuffisante ; d'ailleurs le fin précipité ainsi obtenu ne peut pas être pesé avec certitude à moins de faire appel aux micro-méthodes, ce qui ne serait évidemment pas impossible, mais compliquerait singulièrement le problème. Enfin, cette limite de sensibilité nous arrête, en opérant sur 50 gr. de beurre comme l'indiquent les auteurs, à la détection de 8 mgr. de diacétyle par kilogramme laissant la zone inférieure inexplorable.

D'ailleurs VIZERN et GUILLOT, dans l'application au cas du beurre de leur technique, n'envisagent pas d'effectuer des dosages, mais seulement de faire apparaître une réaction colorée permettant de dire que, dans les conditions de l'essai, le beurre contient au moins 20 mgr. de diacétyle par kilogramme. C'est une « réaction limite » et les auteurs estiment que cette précision est suffisante. Nous croyons avoir montré au contraire que ce sont des doses beaucoup plus faibles qui doivent être recherchées dans les beurres, même falsifiés, et cette amélioration de la méthode Lemoigne ne nous fournit pas encore la solution recherchée, puisqu'elle déclarerait exempts de diacétyle les beurres fraudés avec discernement.

En vérité, plus on étudie la question du dosage du diacétyle dans les beurres, plus on s'aperçoit que tout le problème tient dans la sensibilité des réactions ; nous avons déjà dit l'an dernier (et nous en sommes de plus en plus convaincus) que la solution de ce problème ne peut pas être obtenue par la formation de complexes insolubles ; seule la voie des réactions colorées peut mener à une solution satisfaisante.

3° Notre première méthode colorimétrique à la toluilènediamine.

C'est en appliquant ce principe général que nous avons eu l'idée de faire entrer le diacétyle dans des combinaisons colorées stables et chimiquement définies.

Nous avons indiqué [5] une première solution qui consiste à combiner le diacétyle à des diamines aromatiques : l'orthophénylènediamine, ou mieux son homologue supérieur, la toluilènediamine ou

diaminotoluidine (méta, para) réactif que nous avons préparé et adopté. Il se forme une quinoxaline de couleur jaune facile à colorimétrer.

Ce réactif nous a servi pendant plusieurs mois et nous a permis de nombreuses déterminations. Grâce à lui, nous avons pu constater que les beurres naturels ne contiennent que de très faibles quantités de diacétyle et nous avons pu le doser avec précision en travaillant sur 1.000 ou même 500 grammes de beurre.

Mais les conditions du travail d'expertise qui exigent la mise en œuvre de 100 ou même 50 grammes de beurre nous ont montré que notre méthode initiale était insuffisamment sensible.

Sa limite inférieure de sensibilité se situait pratiquement aux environs de $1/50.000^e$, en dessous, certes, de la limite supérieure que le problème actuel nous impose, mais trop près d'elle et dans des conditions qui ne permettent pas de fouiller avec exactitude la zone des fraudes les plus à redouter, c'est-à-dire celles qui se limitent à quelques milligrammes de diacétyle par kilogramme. Prenons l'exemple d'un beurre falsifié par addition de 3 mgr. par kilogramme. En opérant sur 100 grammes, le distillat de 10 cm^3 contiendra 0 mgr. 3 de diacétyle ; concentration : $1/30.000^e$, c'est-à-dire bien près de la limite de sensibilité de notre première réaction.

Si on opère sur 50 grammes de beurre, on dépasse cette limite pratique.

En matière d'enquête sur des beurres purs, en opérant sur 500 grammes par exemple (ce qui est un maximum pratique) un beurre à 0 mgr. 4 par kilogramme — dose très courante — fournira un distillat de 10 cm^3 renfermant 0 mgr. 2 de diacétyle ; concentration $1/50.000^e$. Nous sommes encore à la limite de sensibilité.

C'est pourquoi nous avons pu dire dans notre précédente étude que certains beurres paraissaient exempts de diacétyle (nous savons maintenant qu'ils en contiennent tous). Une méthode plus sensible devenait donc nécessaire.

Notons en passant que ce souci d'une sensibilité toujours plus grande des méthodes d'analyses ne doit pas être considéré comme un simple exercice de laboratoire ou un jeu de l'esprit. Il se rencontre à chaque pas en chimie et en biologie. Loin d'être puéril, ce souci de la sensibilité et de l'exactitude est à l'origine des plus remarquables progrès de la toxicologie et de la biochimie. Ici, il apparaît également comme nécessaire et utile puisqu'il va nous permettre d'aboutir à la répression de fraudes difficiles à découvrir, protégées jusqu'alors par le manque de sensibilité de nos méthodes d'analyse.

II. Mise au point d'une nouvelle méthode

1° Principe d'une méthode plus sensible.

Devant l'insuffisance pratique de cette première méthode —

pour le but précis poursuivi ici : l'expertise — nous avons repris la question et étudié de nouvelles combinaisons colorées du diacétyle.

Nous avons pensé, conformément à un principe chimique bien connu, que l'introduction dans la combinaison diacétyle-diamine de plusieurs noyaux benzéniques au lieu d'un, se traduirait par une augmentation de l'intensité de la couleur.

Plusieurs essais ont été tentés dans des voies diverses. Sans entrer dans le détail de ces recherches, disons seulement qu'il nous était nécessaire, dans tous les cas, de disposer de diamines aromatiques dont les NH^2 soient situés sur des carbones contigus (pour réaliser la condensation avec les 2 CO contigus du diacétyle).

Finalement, nous nous sommes arrêtés à la solution suivante qui nous a paru être la meilleure au point de vue simplicité des techniques et sensibilité de la réaction :

Nous avons préparé une *diaminobenzidine* (comme nous avons préparé une diaminotoluidine pour notre première méthode).

Ce corps nouveau possède deux noyaux aromatiques au lieu d'un, et, conformément aux prévisions, la coloration obtenue pour un même poids de diacétyle est *beaucoup plus intense* qu'avec la diaminotoluidine (environ de 10 à 20 fois).

2° Préparation de la diaminobenzidine (1).

Elle est calquée exactement sur celle de la toluilènediamine que nous avons publiée.

On part de la benzidine NH^2 NH^2 dont on bloque les fonctions amines par acétylation. On nitre cette benzidine acétylée ; la fixation des NO^2 se fait en ortho par rapport aux NH^2 puisque la position para est prise. On libère les NH^2 bloqués par saponification, et on réduit les NO^2 fixés. D'où formation d'un deuxième NH^2 contigu à chacun des NH^2 primitifs. On obtient :

La réduction a lieu en milieu chlorhydrique. De sorte que finalement, après purification, concentration, etc..., on obtient, en fins cristaux, le chlorhydrate de diaminobenzidine pur.

3° Théorie de la réaction nouvelle.

Elle est, en principe, la même que celle de la réaction à la diaminotoluidine : les deux groupements cétoniques du diacétyle se

(1) La Société Prolabo, 12, rue Pelée, à Paris (11^e), a bien voulu accepter de préparer industriellement sur nos indications ce réactif nouveau. Dès à présent on peut se le procurer en demandant du *chlorhydrate de diaminobenzidine*.

quantités les plus faibles de diacétyle. La réaction se fait entièrement à froid.

On connaît donc le résultat du dosage moins de 5 minutes après la récolte du distillat (qui, elle-même, ne demande que 10 à 15 minutes).

Remarques

a) Il est indispensable de ne pas trop s'écarter des quantités de réactif et d'acide chlorhydrique indiquées ci-dessus.

Des doses de réactif de 0 cm³ 4 à 0 cm³ 6 conviennent aussi bien que 0 cm³ 5, mais 0 cm³ 2 donnerait une coloration trop faible d'environ 10 %, alors que 1 cm³ tendrait au contraire à fausser légèrement la coloration (trop grand excès de réactif).

De même, on peut impunément mettre 0 cm³ 3 à 0 cm³ 6 d'acide chlorhydrique au lieu de 0 cm³ 5. Mais avec 1 cm³ on détermine une acidité un peu trop forte qui fait légèrement fléchir la coloration.

S'en tenir donc à environ 0 cm³ 5 de réactif et d'acide.

D'autre part, nous recommandons l'usage de tubes à essais en verre mince, incolore, de 20 mm. de diamètre.

b) La solution aqueuse du réactif doit être préparée au moment de l'emploi. Elle s'oxyde et brunit à l'air. Le lendemain, elle est inutilisable. Nous la préparons pour une demi-journée. Il est d'ailleurs facile de conserver pendant plusieurs heures tous les distillats d'une même journée (voir ci-après) et de les titrer tous ensemble avec un réactif dont on vient de préparer 5 ou 10 cm³.

Même venant d'être préparée la solution aqueuse du réactif possède une très légère coloration brune qui ne gêne pas : un essai à blanc sans diacétyle sur 10 cm³ d'eau ne présente aucune coloration.

c) La teinte définitive de la réaction est acquise, avons-nous dit, en une ou deux minutes. Elle est parfaitement stable, pendant quelques heures. Mais passé ce délai, l'excès de réactif présent dans le mélange s'oxyde légèrement et fait virer au jaune brunâtre la tonalité de la réaction. Aucune erreur ne peut en résulter car ce virage fournit une teinte différente qui ne peut plus se comparer aux gammes. Il est d'ailleurs inutile de conserver ces tubes puisque la réaction s'apprécie immédiatement. Mieux vaudrait, en cas de nécessité (litige, confrontation), conserver les distillats non additionnés de réactif, car la chose est possible.

5° Sensibilité de la réaction.

Des quantités de diacétyle inférieures à 0 mgr. 05 dans 10 cm³ (concentration inférieure à 1/200.000^e) fournissent une coloration qui se distingue nettement d'un tube témoin ne contenant pas de diacétyle.

Pratiquement nos gammes commencent à 0 mgr. 05 dans 10 cm³.

Des quantités égales à 0 mgr. 1- 0 mgr. 2 (concentration : 1/100.000, 1/50.000^e) donnent des colorations très nettes, de l'ordre de celle de la bière. Au-dessus, on a des tons plus foncés et l'intensité.

de la couleur devient et reste rigoureusement proportionnelle à la concentration en diacétyl (la courbe est une droite).

Nous arrêtons nos gammes à 1 mgr. dans 10 cm³ car la pratique nous a montré qu'on n'a jamais besoin de monter si haut. En opérant sur 100 grammes de beurre cette concentration correspond à 10 milligrammes de beurre par kilogramme, ce qui représente, à notre avis, à peu près la limite supérieure des fraudes « commerciales » possibles.

Rien ne s'oppose d'ailleurs à poursuivre les gammes au delà de 1 mgr. (ou à effectuer le dosage sur 50 gr. de beurre).

En comparant rigoureusement cette méthode à notre premier procédé (à la toluilènediamine) on s'aperçoit que cette nouvelle technique est environ 10 à 20 fois plus sensible que la première — complètement abandonnée depuis.

6° Gammes de comparaison.

La meilleure manière d'apprécier la valeur en diacétyl de la coloration obtenue serait de constituer extemporanément des gammes à l'aide de solutions titrées de diacétyl. De telles gammes ne se conservent pas au delà d'une journée et ce procédé n'est pas à recommander. Néanmoins pour certains contrôles il peut être utile de préparer des tubes témoins avec diacétyl véritable. Il est donc indispensable d'avoir toujours sous la main une solution titrée de diacétyl.

Nous recommandons la solution au 1/1.000^e dans l'eau distillée. Le titre de cette solution se maintient intégralement pendant plusieurs semaines si elle est *conservée dans un flacon de verre jaune* ou dans l'obscurité.

En flacons de verre blanc le titre ne reste stable que pendant trois ou quatre jours. En une semaine, à la lumière diffuse, on a déjà un fléchissement du titre de l'ordre de 10-20 %.

Pour la constitution d'un tube témoin on introduira dans un tube à essai de 20 mm. de diamètre, la fraction de centimètres cubes de solution au 1/1.000^e correspondant à la fraction de milligramme que l'on veut prélever ; on ajoutera le complément à 10 cm³ d'eau distillée pour se replacer dans les conditions d'un distillat de 10 cm³. Puis on ajoutera 0 cm³ 5 de réactif, 0 cm³ 5 d'acide chlorhydrique ; on agitera et on attendra 1 ou 2 minutes avant de comparer un distillat de 10 cm³ traité de la même manière.

Beaucoup plus avantageuse est la constitution d'une gamme artificielle au bichromate. Voici comment il convient d'opérer :

On prépare une dizaine de tubes de verre incolore tous bien calibrés (20 mm. intérieur par exemple). On les fait séjourner quel-

ques heures dans de l'acide sulfochromique (1) pour détruire les matières organiques qui réduiraient ultérieurement le bichromate de la gamme et feraient légèrement verdier les teintes les plus faibles. après quelques mois de séjour. Rincer à fond à l'eau distillée. Bien égoutter. *Ne pas sécher.*

Dans ces tubes on introduit, à l'aide de pipettes dégraissées à l'acide chromique, les volumes d'eau et de bichromate de potassium pur à 1 % indiqués au tableau ci-dessous. Aussitôt après, on ferme les tubes au chalumeau le plus haut possible, on les étiquète définitivement et on les range à l'obscurité.

Une gamme bien préparée dans des tubes exempts de matières organiques conserve ses tonalités sans altération pendant des mois. On a d'ailleurs la faculté de contrôler certains tubes de la gamme à l'aide d'essais au diacétyl. Mais il faut également redouter une altération possible du diacétyl pur qu'il faut conserver à l'obscurité dans ses tubes scellés d'origine (10 gr.) et renouveler au besoin tous les 3 ou 6 mois.

CONSTITUTION DE GAMMES AU BICHROMATE

Richesse des solutions de diacétyl à titrer (en milligrammes de diacétyl dans 10 cm ³ d'eau)	Composition des tubes de la gamme (10 cm ³)	
	Nombre de centimètres cubes de bichromate à 1 %	Nombre de centimètres cubes d'eau distillée
0,05	0,12	9,88
0,10	0,18	9,82
0,20	0,30	9,70
0,30	0,50	9,50
0,40	0,75	9,25
0,50	1,00	9,00
0,60	1,25	8,75
0,70	1,50	8,50
0,80	1,75	8,25
0,90	2,00	8,00
1,00	2,25	7,75

On remarquera que lorsque la réaction est effectuée, le tube contenant les 10 cm³ de distillat aura reçu 0 cm³ 5 de réactif et 0 cm³ 5 d'HCl, d'où un volume total de 11 cm³. C'est bien ce volume de 11 cm³ qui est à comparer à la gamme de bichromate (dont les

(1) Préparation de l'acide sulfochromique : Dissoudre à chaud 100 gr. de bichromate de potassium ordinaire dans 500 cm³ d'eau. Refroidir. Verser dans cette solution, en agitant, 100 gr. d'acide sulfurique à 66° Bé. Plonger les tubes dans ce mélange chaud en les immergeant complètement.

tubes ne contiennent que 10 cm³ de solution colorée.) La gamme a été établie sur ces bases. Cette différence de volume ne gêne évidemment pas.

Pour la comparaison des tubes on peut utiliser un comparateur en carton noir facile à construire ; mais avec un peu d'habitude on peut se contenter d'examiner les deux tubes placés l'un près de l'autre, par transparence, *à la lumière du jour*.

La meilleure méthode (et la plus rapide) consiste à comparer le tube à titrer à un tube nettement plus coloré, puis à un tube nettement plus clair et à resserrer de proche en proche l'intervalle qui « enferme » le chiffre réel plutôt qu'à rechercher du premier coup le tube le plus voisin de la tonalité à déterminer.

Remarques

- a) La gamme au bichromate doit être conservée à l'obscurité.
- b) Les tubes qui renferment les 10 cm³ de solution à titrer doivent être exactement du même verre et du même diamètre que ceux de la gamme au bichromate.

III. Application de la nouvelle méthode au dosage du diacétyl dans les beurres

Le dosage du diacétyl dans les beurres, quelles que soient les conditions imposées, comporte deux stades bien distincts : d'abord l'extraction du diacétyl par entraînement à la vapeur, puis le titrage du distillat obtenu.

1° Extraction du diacétyl des beurres.

La plupart des auteurs estiment que la meilleure manière d'extraire le diacétyl soit de solutions aqueuses, soit de levains lactiques, de crèmes ou de beurres est l'entraînement à la vapeur. Nous avons déjà exprimé la même opinion [5].

Toutefois nous croyons pouvoir affirmer que l'étude systématique de cette extraction n'a pas encore été faite et qu'elle comporte deux difficultés principales dont nous devons parler brièvement.

Ces deux difficultés correspondent d'une part à la nécessité d'extraire intégralement tout le diacétyl de l'échantillon, d'autre part à la nécessité de ne pas le perdre pendant cette extraction.

a) Conditions à remplir pour tout extraire.

Nous avons préconisé l'an dernier [5] la récolte de deux portions successives de 50 cm³ de distillat parce que nous avons reconnu que l'extraction de tout le diacétyl est une opération plus pénible qu'on ne le pense généralement et qui exige un volume de vapeur relativement important. Ces deux distillats de 50 cm³ étaient redistillés séparément dans un petit ballon et, de chacun d'eux, on recueillait 10 cm³ d'un distillat nouveau sur lequel on

effectuait la réaction. En utilisant un simple courant de vapeur et un réfrigérant ordinaire sans déflegmateur, cette technique est indispensable.

Mais cette nécessité d'effectuer 4 distillations (ou tout au moins 2) pour un seul échantillon nous paraît être une complication gênante et particulièrement condamnable dans le cas de l'expertise qui nous préoccupe plus spécialement ici.

Nous nous sommes donc posé le problème suivant : réussir à extraire tout le diacétyle d'un beurre (quel que soit le poids de l'échantillon et quelle que soit la dose de diacétyle) en une seule distillation et rassembler tout ce diacétyle du premier coup dans le plus petit volume, 10 cm³ par exemple.

Nous croyons avoir réussi à résoudre ce problème nouveau en nous basant sur les considérations suivantes :

Remarquons d'abord que l'extraction du diacétyle par la vapeur d'eau n'est pas à proprement parler un « entraînement », ce terme devant être réservé à l'extraction de substances à point d'ébullition élevé ou non miscibles à l'eau. Nous sommes ici dans le cas d'une substance plus volatile que l'eau (point d'ébullition du diacétyle : 88°) et soluble dans l'eau. Il s'agit donc de réaliser une *distillation fractionnée* exactement comme dans le cas de solutions d'alcool dans l'eau.

En fait, cette distillation fractionnée se réalise à l'aide d'un apport de vapeur extérieure parce que la masse de beurre n'amène pas avec elle assez d'eau et parce que cet apport réalise un brassage énergétique favorable à une bonne extraction.

Cette opération est, comme on le sait, conditionnée par la différence des tensions de vapeurs de l'eau et de la substance dissoute à une température donnée. Si on se contente d'atteler le ballon de distillation (porté à 100°) au réfrigérant, on vaporise et on condense à la fois beaucoup de substance dissoute, mais aussi beaucoup d'eau. Le « titre » du distillat est faible et si l'on parvient à extraire entièrement la substance c'est au prix d'une abondante condensation d'eau. C'est ce qui se passait dans la technique préconisée l'an dernier et qui nécessitait la récolte d'un ou de deux distillats de 50 cm³.

Or, nous voulons absolument réduire ce volume pour éviter une deuxième distillation. Il faut que le distillat soit d'un titre plus élevé. Seule la distillation fractionnée permet d'y parvenir.

Mais l'application de cette technique ne doit pas être livrée au hasard. Si nous prolongeons verticalement le tube de sortie des vapeurs avant de le relier au réfrigérant, une partie de ces vapeurs va se condenser et retomber dans le ballon alors que le diacétyle, plus volatil, donc moins facilement condensable, va tendre à continuer sa route avec la vapeur non condensée. La portion de vapeur qui revient au ballon est appauvrie en diacétyle tandis que la portion qui se rend au réfrigérant est enrichie.

C'est le principe du fractionnement, sur lequel sont basées la plupart des colonnes dites rectificatrices. Les déformations que l'on fait subir à la paroi de ces colonnes n'ont pas d'autre objet que de faciliter la condensation, le retour de l'eau condensée au ballon et de multiplier les points de températures différentes où le phénomène s'amplifie au fur et à mesure qu'on s'éloigne du ballon. Mais ces déflegmateurs sont loin d'être parfaits. Nous les avons expérimentés et ils ne résolvent qu'imparfaitement le problème posé.

La véritable solution de la rectification est fournie par des appareils du type « colonnes à plateaux » dont le principe est meilleur que celui des déflegmateurs précédents. Dans ces derniers, on n'utilise que le fait d'une condensation partielle de la vapeur ; une grande partie de cette vapeur se rend directement au réfrigérant et son enrichissement en substance volatile est faible. Dans les colonnes du type « à plateaux », on ménage sur le trajet des vapeurs, un barbotage dans de l'eau condensée chaude. Toute la vapeur doit entrer en contact avec ce liquide. Il en résulte d'une part une « condensation provoquée » plus importante et, d'autre part, un retard au départ de la substance volatile qui, au lieu de rester très diluée dans la vapeur, se concentre ici dans l'eau condensée.

Ce réservoir d'eau condensée chaude fonctionne alors comme le ballon initial, avec cette différence que le titre de la solution est ici beaucoup plus riche. La vapeur d'aval est donc également beaucoup plus riche que la vapeur d'amont et sa condensation fournira un distillat à titre plus élevé. Si au lieu de conduire tout de suite cette vapeur au réfrigérant, on lui faisait traverser un deuxième « plateau » de condensation, le résultat serait encore meilleur et l'on sait que c'est en accumulant ainsi les plateaux que l'on parvient à obtenir dans la distillation de l'alcool des titres élevés que n'autoriserait pas un déflegmateur ordinaire.

Les appareils de laboratoire vraiment basés sur ce principe sont très rares. Pour que le principe soit respecté, en effet, il faut que la vapeur soit réellement amenée à traverser par barbotage une réserve d'eau condensée. Il ne suffit pas que la vapeur lèche des gouttes d'eau réparties sur des obstacles même nombreux. Il faut créer une veine liquide transversale qui constitue une sorte de deuxième « ballon de distillation » à contenu plus riche que le premier et parcouru par la vapeur qui émane de celui-ci.

Après maints tâtonnements, nous avons créé un dispositif fort simple qui remplit très exactement cette condition : un petit réservoir est ménagé sur le trajet de la vapeur ascendante. Ce réservoir doit être assez volumineux pour permettre un barbotage réel et être précédé d'un étranglement qui facilite la retenue du liquide condensé sans s'opposer au passage de la vapeur.

Pratiquement, nous avons réalisé le dispositif de la manière suivante : dès la sortie du ballon de distillation, la vapeur chemine dans un tube très étroit (pour faciliter la condensation) et parvient dans une petite boule B où elle achève de se condenser (voir le croquis). Le liquide ainsi formé s'enrichit sans cesse et cède au réfrigérant une vapeur riche qui fournit un distillat à haut titre ou bien, ce qui revient au même, toute la substance volatile contenue dans le ballon est recueillie dans un distillat de faible volume.

Nous avons expérimenté en parallèle ce dispositif et les colonnes rectificatrices classiques en usage dans les laboratoires. Les résultats se sont montrés très supérieurs avec notre dispositif qui permet de recueillir avec la même facilité 0 mgr. 05 ou 1 mgr. de diacétylène dans un unique distillat de 10 cm³. Les autres appareils exigent la récolte de 20, 30 et même 50 cm³ de distillat pour entraîner la totalité du diacétylène présent — ce qui est parfaitement conforme à la théorie (1).

(1) Nous avons pu dans certains cas obtenir d'assez bons résultats en superposant deux très bonnes colonnes rectificatrices comportant par exemple de nombreuses

Nous disposons donc du moyen de recueillir des quantités de diacétyle quelconques (dans le cadre de nos données) et intégralement, dans un seul distillat de 10 cm³.

b) Conditions à remplir pour ne rien perdre.

Une cause d'erreur importante peut intervenir dans la récolte du diacétyle d'un beurre (et surtout d'une solution aqueuse) : Au début de la distillation

(la boule rectificatrice étant encore vide), la vapeur qui arrive dans le ballon en réchauffe le contenu et provoque une sortie d'air par la sortie du réfrigérant. Cet air est chargé de diacétyle surtout si on expérimente sur des solutions aqueuses (expériences de contrôle).

Il est donc nécessaire de faire plonger le tube de sortie dans un peu d'eau pour que l'air barbotte dans ce liquide et y abandonne son diacétyle. Comme ce volume doit être faible pour ne pas trop diluer le distillat, nous utilisons un tube à pointe plongeant dans le fond d'un tube conique (tube d'Esbach) où on introduit, avant de commencer à chauffer, un demi-centimètre cube d'eau environ.

(Suite de la note de la page précédente 694).

petites billes de verre qui permettaient d'obtenir « l'effet de plateau » par la constitution d'une réserve de liquide. Mais notre dispositif est moins onéreux, moins encombrant et plus efficace. La Société Prolabo, 12, rue Pelée, à Paris, a accepté de construire notre tube déflegmateur. On peut se le procurer dès maintenant.

Ce dispositif de barbotage présente encore l'avantage suivant : si, pour une raison quelconque, la distillation s'arrête au cours d'un chauffage mal surveillé, il s'en suit une rentrée d'air dans l'appareil. A la reprise du chauffage cet air chargé de diacétyle est chassé et il causerait une nouvelle perte s'il ne barbotait pas dans le distillat.

De même, lors de distillations extrêmement lentes (ce qui par ailleurs est désirable), il nous est arrivé de constater des pertes de diacétyle par suite d'un excès de rectification amenant des gouttes d'un titre relativement trop élevé. Si ces gouttes pénètrent dans le distillat sans prendre contact avec l'air, comme indiqué sur notre croquis, la perte disparaît.

Nous avons expérimenté ces divers accidents, et en l'absence de tube plongeur à l'extrémité du réfrigérant nous avons pu constater des pertes très importantes atteignant 20 %, 30 % et même 80 % dans un cas de distillation trop ralentie !

Ces deux dispositifs fort simples nous ont permis de réaliser des dosages extrêmement rigoureux soit sur des solutions aqueuses de diacétyle, soit sur des beurres privés de diacétyle puis rechargés de quantités connues. Les résultats ont été aussi satisfaisants dans le cas de 0 mgr. 05 de diacétyle que dans le cas de 1 mgr. dans la prise d'essai.

Remarques

1° L'arrivée de la vapeur, qui doit être assez rapide au début pour fondre ou réchauffer le contenu du ballon, doit être ensuite considérablement réduite. Il est indispensable que cette arrivée de vapeur soit bien régulière, sans à-coups (mettre des grains de pierre ponce dans le ballon générateur de vapeur). La distillation ne doit pas être menée rapidement. L'obtention de 10 cm³ de distillat doit durer 10 à 15 minutes (1 cm³ à la minute environ).

2° L'appareil dont nous donnons le croquis coté comporte un ballon A de 300-350 cm³ environ qui convient pour les essais portant sur 50 et 100 gr. de beurre (cas de l'expertise).

Pour les enquêtes sur des beurres purs, et pour le cas où on peut disposer de 250 ou 500 gr. de beurre, il faut utiliser un autre appareillage avec un ballon de 1.500 ou 2.000 cm³ (maximum). Le dispositif déflegmateur devrait alors être plus important également. Mais pour ces cas de quantités importantes de beurre où une erreur présente moins d'importance relative que dans le cas de 50 ou 100 gr., on peut se contenter de deux bonnes colonnes rectificatrices superposées (à anneaux de Raschig de préférence).

Il faut, dans ce cas, recueillir deux distillats successifs de 10 cm³, faire la réaction sur les deux tubes séparément, et additionner les résultats, car la rectification est moins bonne qu'avec le petit appareil d'expertise.

3° Si le distillat est trouble (ce qui ne doit pas arriver quand la distillation est bien conduite), faire la réaction comme d'ordinaire et filtrer le tout sur filtre plat, sec. Le filtrat est limpide et sa tonalité n'est pas altérée.

Nous avons d'ailleurs constaté que même la présence d'un peu de beurre introduit volontairement dans le distillat ne gêne pas la réaction et ne déplace pas la teinte dans l'échelle colorimétrique.

4° Si on a de nombreux beurres à examiner, on peut mettre de côté les distillats et faire toutes les réactions ensemble. Il suffit de boucher au

caoutchouc les tubes renfermant ces distillats. Le titre ne diminue pas, même après une journée d'attente. En revanche, les tubes conservés débouchés voient leur titre en diacétyle fléchir très légèrement après quelques heures.

IV. Résumé de la méthode proposée (Cas de l'expertise)

1° Dans le ballon A de l'appareil décrit plus haut (voir le croquis) introduire 50 gr. ou 100 gr. de beurre. Atteler au tube déflegmateur.

2° Installer à l'extrémité du réfrigérant le tube à pointe C qui plonge dans le fond d'un tube d'Esbach D où on a introduit 0 cm³ 5 d'eau environ.

3° Admettre la vapeur dans le ballon A, rapidement au début. Ce ballon n'est jamais chauffé directement. Dès que la condensation commence à s'effectuer le long du tube déflegmateur qui précède la boule B, diminuer l'intensité de la vapeur.

4° La condensation avec barbotage s'établit alors rapidement dans la boule B et la distillation proprement dite commence peu après. Régler la vapeur pour que le barbotage en B ne s'interrompe pas et ne soit pas trop violent ; dans ces conditions le distillat se forme à raison de 1 cm³ par minute environ. Il vaut mieux aller un peu trop lentement que trop vite.

5° Quand le tube d'Esbach renferme 10 cm³ de distillat, le remplacer par un autre et recueillir un deuxième distillat de 10 cm³ à titre de contrôle (ce distillat ne doit pas contenir de diacétyle si l'opération a été bien conduite).

6° Le contenu des tubes d'Esbach est transvasé dans des tubes à essai de même diamètre que les tubes de la gamme de teintes au bichromate. Si la réaction ne doit être effectuée que quelques heures plus tard boucher ces tubes au caoutchouc.

7° Pour effectuer la réaction ajouter aux 10 cm³ de distillat : 0 cm³ 5 de solution aqueuse de chlorhydrate de diaminobenzidine à 2,5 % préparée au moment du titrage (ou au plus tôt quelques heures avant). Agiter. Ajouter 0 cm³ 5 d'acide chlorhydrique concentré. Agiter. Attendre 2 minutes et comparer à la gamme de teintes.

Le chiffre porté sur les tubes de la gamme représente en milligrammes, la quantité de diacétyle contenue dans 10 cm³ de distillat, c'est-à-dire dans la prise d'essai. On ramène à 1 kilogramme de beurre.

8° La même réaction est effectuée sur le deuxième distillat de 10 cm³ qui ne doit fournir aucune coloration. S'il apparaît une teinte légère c'est que la distillation a été mal conduite. Il suffit alors d'ajouter au résultat précédent celui qui est fourni par ce second tube. Le résultat final reste correct.

Les opérations de distillation ne demandent qu'un quart d'heure (ou une demi-heure pour deux distillats). Le titrage des distillats demande 3 minutes.

Cette méthode, en opérant sur 100 grammes de beurre, permet de chiffrer avec certitude des quantités de diacétylène égales ou supérieures à 0 mgr. 5 par kilogramme.

En opérant sur 500 grammes de beurre dans l'appareil plus grand qui a été décrit, on peut, de la même manière, doser le diacétylène avec exactitude à partir de 0 mgr. 1 par kilogramme.

* * *

Nous pensons que cette technique nouvelle est appelée à rendre quelques services dans l'étude des beurres et dans la répression de la fraude.

Nous souhaitons voir d'autres auteurs l'essayer et nous serions heureux de recevoir leurs observations et, éventuellement, leurs critiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MICHAELIAN, FARMER et HAMMER. Bulletin de recherches n° 155 de la Station d'Essais agricoles du Collège d'Agriculture de l'Etat d'Iowa, Ames, Iowa, janvier 1934.
- [2] MICHAELIAN et HAMMER. Bulletin de recherches n° 179 de la Station d'Essais agricoles du Collège d'Agriculture de l'Etat d'Iowa, Ames, Iowa, janvier 1935.
- [3] HAMMER, STAHLY, WERMAN et MICHAELIAN. Bulletin de recherches n° 191 de la Station d'Essais agricoles du Collège d'Agriculture de l'Etat d'Iowa, Ames, Iowa, décembre 1935.
- [4] VIRTANEN et TARNANEN. *Suomen Kemistilehti*, t. IX, n° 1, B, 1936, p. 2 (an. dans *Le Lait*, 1936, p. 424).
- [5] PIEN, BAISSE et MARTIN. *Le Lait*, février 1936, p. 119, et mars 1936, p. 243.
- [6] VIZERN et GUILLOT. *Annales Falsifications et Fraudes*, 1932, p. 459.
- [7] HARDEN et NORRIS. *Journal Physiology*, 42, 333, 1911.
- [8] O'MEARA. *British Journal Exp. Pathology*, 12, 346, 56, 1931, et *Journal of Pathology and Bacteriology*, 34, 401, 06, 1931.
- [9] WERKMANN. *Journal Bacteriology*, 20, 121, 5, 1930.
- [10] LEIFSON. *Journal Bacteriology*, 23, 353, 4, 1932.
- [11] BEDFORD. *Journal Bacteriology*, 18, 93, 4, 1929.
- [12] BARRITT. *Journal Pathology and Bacteriology*, 42, 441, 54, 1936.
- [13] RITTER. *Schweizerischen Milchzeitung*, n° 77-79, 1936.
- [14] LEMOIGNE. *Comptes rendus*, 170, 131, 1920.
- [15] TAPERNOUX. *Le Lait*, 1932, p. 1043.
- [16] MOHLER et HELBERG. *Mitteilungen Geb. Lebensmittel und Hygiene*, t. XXIV, 1934, p. 274.
- [17] NOTTBOHM. *Molkerei Zeitung*, t. XLVII, 1933, p. 317.
- [18] BARNICOAT. *Analyst*, t. LX, 1935, p. 653.
- [19] FEIGL. *Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft*, 57, 758, 1924.
- [20] TESTONI et CIUSA. *Ann. Chim. Applicata*, 21, 147, 50, 1931.
- [21] RITTER. *Schweizerischen Milchzeitung*, n° 103, 1936.