

SUR LE MICRODOSAGE DU DIACÉTYLE DANS LES BEURRES (1)

par

JEAN PIEN

Ingénieur-Chimiste, Docteur ès sciences,
Directeur des Laboratoires de la Laiterie des Fermiers Réunis

Nous avons antérieurement démontré (*Le Lait*, 1937, t. XVII, p. 673) que le dosage du diacétyle dans les beurres nécessite une méthode d'analyse très sensible permettant d'apprécier moins de 0 mgr. 1 de cette substance dans une prise d'essai de 100 grammes de beurre, ce qui revient à dire (si l'on opère sur un distillat de 10 cm³) qu'il faut pouvoir détecter quantitativement le diacétyle dans des solutions où la concentration est inférieure à 1/100.000. Nous avons également montré que les méthodes utilisées dans ce but (notamment la méthode de Lemoigne au diméthylglyoximate de nickel et les nombreuses autres méthodes qui en dérivent) ne possèdent pas une sensibilité suffisante dans le cas de leur application au microdosage du diacétyle dans les beurres (2).

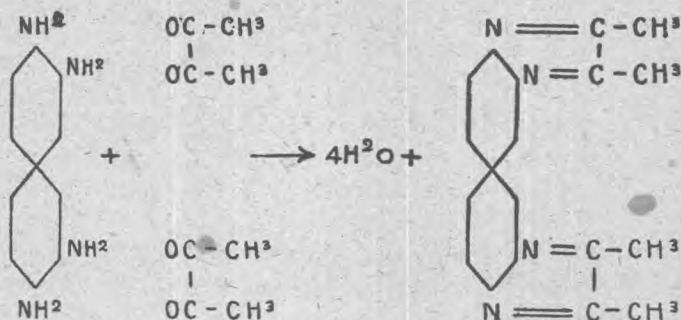
C'est pourquoi nous avons étudié et proposé de nouvelles méthodes purement colorimétriques, basées sur la formation de quinoxalines, c'est-à-dire sur la condensation des dicétones avec les orthodiamines. Les corps colorés obtenus permettent des réactions extrêmement sensibles. Nous avons d'abord proposé l'utilisation de la m.p.toluilènediamine. Ultérieurement nous avons envisagé la création d'une diamine du diphenyle que nous avons appelée (un peu improprement d'ailleurs) : diaminobenzidine et qui est en réalité le tétramino-3-4-3'-4' biphenyle.

Cette dernière substance, condensée avec deux molécules de diacétyle donne une diphenylquinoxaline qui permet de déceler quantitativement le diacétyle à des concentrations inférieures à 1/200.000. Aucune méthode connue actuellement ne permet d'atteindre cette sensibilité.

Selon nous, la réaction de condensation serait la suivante :

(1) Communication présentée au XI^e Congrès international de Chimie pure et appliquée, Londres, juillet 1947 ; texte revu et complété par l'Auteur en avril 1949.

(2) Des études plus récentes (Congrès de Laiterie de Berlin, 1937) ont montré que la sensibilité de ces méthodes pouvait être accrue. Mais elle ne parvient pas à atteindre celle qui est nécessaire dans l'analyse des beurres, et, d'autre part, les techniques proposées sont délicates et compliquées si on les compare à la méthode extrêmement simple et rapide que nous avons proposée.



Cette méthode n'a pas jusqu'ici reçu le développement que sa grande simplicité et sa haute sensibilité nous permettaient d'espérer, parce que le réactif que nous avons créé et préconisé (diaminobenzidine) n'existe pas dans le commerce. Préparé suivant les indications que nous avons initialement données, il n'est pas stable et se colore spontanément en violet-brun plus ou moins foncé. En quelques mois il devient inutilisable. Cet inconvénient tient à une purification imparfaite du produit et à la présence de substances étrangères qui catalysent son oxydation.

Ayant repris la question ces dernières années, avec nos collaborateurs Jacques MORIZE, puis Jean DESIRANT, nous avons pu modifier le processus de préparation et notamment améliorer la purification au point que le réactif reste stable et parfaitement blanc.

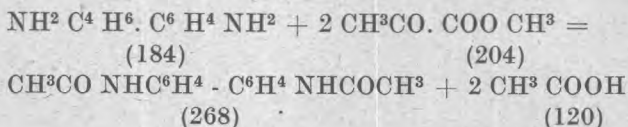
Nous croyons donc devoir faire connaître maintenant ce mode opératoire nouveau qui permettra la fabrication d'une diaminobenzidine stable et de bonne qualité et autorisera, nous l'espérons, la diffusion d'une méthode très simple et extrêmement sensible de microdosage du diacétyle.

* * *

PRÉPARATION DE LA DIAMINO BENZIDINE (nouveau mode opératoire)

1^o Acétylation de la benzidine :

a) *Principe.* On bloque les deux fonctions amine de la benzidine par acétylation pour les protéger contre l'oxydation pendant la nitration subséquente. On utilise pour cela de l'anhydride acétique que l'on fait agir sur la benzidine. La réaction est la suivante :



b) *Réalisation.* 25 gr. de benzidine pure sont empâtés avec 50 cm³ d'acide acétique glacial puis traités peu à peu par 30 grammes d'anhydride acétique. L'empâtage préalable à l'acide acétique est indispensable car la réaction de l'anhydride acétique sur la benzidine est extrêmement violente. La masse s'échauffe fortement.

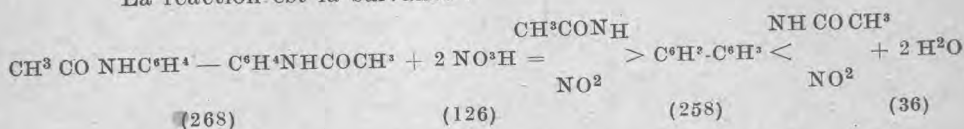
Le produit acétylé est insoluble dans l'alcool chaud. Après l'avoir essoré à la trompe, on le purifie en le mettant en suspension dans l'alcool bouillant, laissant refroidir, filtrant, lavant à l'alcool chaud et séchant à l'étuve.

Théoriquement on doit obtenir 36 grammes de produit acétylé.

2° Nitration de la benzidine acétylée :

a) *Principe.* La benzidine acétylée est traitée par l'acide nitrique dans le but de fixer deux groupements NO² sur la molécule.

La réaction est la suivante :



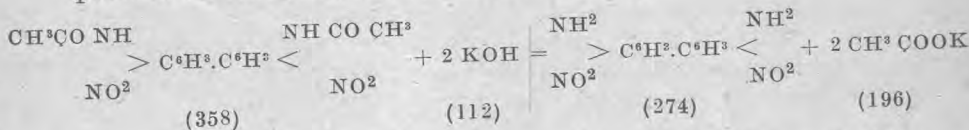
b) *Réalisation.* La benzidine acétylée obtenue (30 à 35 gr.) est introduite par petites portions de 1 à 2 grammes dans quatre fois son poids (soit 120 à 140 gr.) d'acide nitrique fumant (d = 1,48) contenu dans un ballon refroidi par un courant d'eau. La nitration doit se faire à une température aussi basse que possible (au-dessous de 40°).

Conduire l'opération rapidement. Dès la dernière dose introduite, verser le liquide obtenu dans un grand excès d'eau froide (2 à 3 litres). La nitrobenzidine acétylée précipite. Ce précipité jaune est séparé au Büchner, lavé à l'eau froide et séché.

Théoriquement on doit obtenir (pour 36 gr. de benzidine acétylée) 48 gr. 5 de nitrobenzidine acétylée.

3° Libération du groupement NH² bloqué :

a) *Principe.* La nitrobenzidine obtenue a toujours ses groupements initiaux NH² bloqués. On les libère par saponification par la potasse. La réaction est la suivante :



b) *Réalisation.* Les 48 grammes de nitrobenzidine acétylée obtenus sont mis en suspension dans 300 cm³ d'alcool à 95°. On ajoute 20 grammes de potasse préalablement dissous dans 100 cm³

d'eau. On porte à l'ébullition qu'on maintient 5 minutes. Du liquide rouge foncé obtenu, l'amine nitrée se sépare par refroidissement sous la forme de cristaux d'une belle couleur rouge violacée. Après refroidissement complet on essore, lave sommairement et sèche à l'étuve.

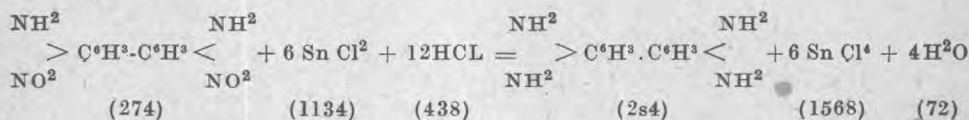
Théoriquement on doit obtenir 37 grammes de nitrobenzidine (pour 25 gr. de benzidine initiale).

4° Réduction du groupement NO^2 :

a) *Principe.* En réduisant les groupements NO^2 qu'on a fixés sur benzidine, on fera apparaître les seconds groupements NH^2 qui caractérisent la diaminobenzidine.

On utilisera dans ce but du chlorure stanneux en milieu chlorhydrique.

La réaction est la suivante :



On fera appel à du chlorure stanneux à 2 molécules d'eau dont le poids moléculaire est égal à 225. Théoriquement, pour 274 gr. de nitrobenzidine on prendra donc 1.350 grammes de chlorure stanneux. Et, comme ce dernier contient souvent, en outre, de l'humidité, du sel basique, etc..., on pourra en prendre jusqu'à 1.500 grammes, c'est-à-dire 5 fois à 5,5 fois le poids de la nitrobenzidine mise en œuvre.

En ce qui concerne l'acide chlorhydrique, la quantité théorique est de 438 grammes de HCl pour 274 grammes de nitrobenzidine, c'est-à-dire 1.200 cm³ d'acide HCl 10 N. On en utilisera en excès.

Théoriquement, on doit obtenir 29 grammes de diaminobenzidine si on est parti de 25 gr. de benzidine (37 grammes de nitrobenzidine).

b) *Réalisation.* Pour 5 grammes de nitrobenzidine, préparer 27 gr. 5 de chlorure stanneux que l'on dissoudra dans 25 cm³ d'acide chlorhydrique 10 N. La dissolution est rapide au bain-marie bouillant. Dans le liquide chaud, ajouter par petites portions et en agitant les 5 grammes de nitrobenzidine préalablement pulvérisée (attendre avant toute nouvelle addition que la réaction se soit calmée et que la portion précédente soit entrée en solution). Il est bon d'opérer dans un récipient assez grand (ballon d'un litre). Quand la dernière dose de nitrobenzidine est introduite, on a une solution brun-jaune, très foncée, à reflets rougeâtres. La réduction n'est pas encore terminée. On maintient encore deux heures

au bain-marie bouillant afin de parachever la réduction. (On peut quadrupler sans inconvénient les chiffres ci-dessus).

5° Séparation du chlorhydrate de diaminobenzidine :

a) *Principe.* Cette séparation est basée sur le fait que le chlorhydrate de diaminobenzidine est insoluble dans HCl concentré. Les petites quantités de chlorure stannique que contiennent encore ces cristaux après filtration seront éliminées par l'hydrogène sulfuré. On terminera par une nouvelle cristallisation dans HCl concentré.

Théoriquement, 5 grammes de nitrobenzidine fournissent 3,9 de diaminobenzidine (base) :

b) *Réalisation.* Dans le ballon où l'on a provoqué à la réduction de 5 grammes de nitrobenzidine, on ajoute, après refroidissement, 50 cm³ d'acide HCl 10 N. Agiter dès l'apparition des premiers cristaux et laisser reposer 5 minutes.

Le précipité qui se forme est brun-jaune sale (mélange de chlorhydrate de diaminobenzidine et de chlorure stannique). Séparer le précipité sur filtre de Schott ou sur Büchner avec filtres résistant aux acides, puis redissoudre (sans lavage) dans 200 cm³ d'eau distillée. Faire passer un courant d'hydrogène sulfuré. Il se forme un précipité de sulfure-stannique jaune sale. Filtrer sur Büchner. Traiter une deuxième fois à l'hydrogène sulfuré. Un troisième traitement est parfois nécessaire. Le dernier filtrat est limpide et incolore (rester en atmosphère sulfureuse pour éviter l'oxydation).

A la solution aqueuse débarrassée de l'étain, ajouter peu à peu de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à début de précipitation. Puis en ajouter encore un excès. La solution finale doit être au moins 3 N. Agiter. La précipitation totale demande environ une heure, à l'obscurité de préférence.

Le chlorhydrate de diaminobenzidine pur ainsi précipité se présente sous la forme d'aiguilles blanches et soyeuses.

Les cristaux sont recueillis sur filtre Schott ou sur Bücher avec filtres résistant aux acides, lavés à l'acide chlorhydrique au 1/2, à l'alcool, et à l'éther jusqu'à élimination totale de l'acide, essorés et séchés *sous vide*, à basse température.

Remarque. Le produit ainsi obtenu est très blanc, exempt d'étain et de diaminobenzidine oxydée. La solution aqueuse est parfaitement incolore et convient au dosage colorimétrique du diacétyle.

Pour une bonne conservation du produit, il est recommandé de le dessécher parfaitement et de le loger dans des récipients bien secs, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Rappelons, en terminant, la technique de la réaction :

Le distillat de 10 cm³ renfermant le diacétyle à doser est additionné de 0 cm³ 5 de solution aqueuse de chlorhydrate de diamino-benzidine à 2,5% préparée au moment de l'emploi ou quelques heures (au plus) auparavant. Agiter. Ajouter 0 cm³ 5 d'acide chlorhydrique concentré. Agiter. Attendre 2 minutes. Colorimétrer au photomètre préalablement étalonné ou comparer à une gamme de teintes préparées avec des solutions de bichromate de potassium.

Le titrage proprement dit d'une solution de diacétyle ne demande donc que quelques minutes.

Pour tous détails concernant le dosage du diacétyle dans les beurres, l'importance des prises d'essai, la conduite de la distillation, etc., nous renvoyons à notre travail antérieur (*Le Lait*, juillet-août 1937, t. XVII, pages 673 à 698).

INDEX COLORIMÉTRIQUE D'ACIDIFICATION DES LIPIDES DU BEURRE

par

ETIENNE GOIFFON

Ingénieur I.A.N.

On sait que ces corps subissent du fait des oxydations spontanées ou des lipases que leur extraction a entraînées, ou qui ont été développées par certains microbes, des transformations qui sont groupées sous le nom de Rancissement. En réalité, il faut distinguer parmi ces altérations, celles qui consistent en la formation de certains corps volatils (aldéhydes, etc., acides gras volatils), qui donnent un goût et une odeur désagréables aux corps gras alimentaires d'une part, et d'autre part, la mise en liberté des acides gras normalement liés au glycérol.

C'est ce second groupe d'altération qu'on apprécie généralement par le dosage d'acidité et qui seul fait l'objet de nos recherches.

Plusieurs méthodes ont été proposées dans ce but. La plus classique consiste à solubiliser les acides gras formés dans ces graisses et huiles, et à les doser grâce à une solution alcaline titrée en présence de phénolphaléine comme indicateur.

Cette méthode n'est pas très compliquée. Elle demande cependant un minimum d'appareillage et de soin pour l'établissement des liqueurs titrées qui en font plus une méthode de laboratoire qu'un procédé d'appréciation utilisable par le petit industriel.

Une autre méthode toute différente a été proposée récemment