

# Absorbance dans la région ultraviolette du spectre des huiles essentielles de bergamote de Côte d'Ivoire et du Mali

par R. HUET

Institut Français de Recherches Fruitières Outre-Mer.

L'huile essentielle de bergamote qui est extraite, rappelons-le, par abrasion mécanique à froid de l'écorce du fruit de *Citrus aurantium* subsp. *bergamia* (Risso et Poiteau) ENGLER, renferme des substances non volatiles que l'on groupe sous le nom de résidu fixe. Cette fraction constitue 4 à 7 p. cent de l'essence (1).

Le résidu fixe est composé de cires, mais aussi de diverses substances coumarines et psoralènes ayant en commun la propriété d'être fluorescentes. Non volatils, ces composés ne participent pas à l'élaboration du parfum. Certains d'entre eux sont responsables des propriétés photosensibilisantes de l'essence de bergamote. Entre 267 et 350 m $\mu$  ils donnent au spectre d'absorption de cette essence un tracé caractéristique dont la constance est utilisée pour détecter les adultérations (19) (5) (13).

## ABSORBANCE DANS LA RÉGION ULTRAVIOLETTE DU SPECTRE DES HUILES DE BERGAMOTE DE CÔTE D'IVOIRE ET DU MALI

par R. HUET (I. F. A. C.)

Fruits, vol. 25, n° 1, janvier 1970, p. 5 à 10.

**RÉSUMÉ.** — Dans une première partie bibliographique, l'auteur fait le point des connaissances actuelles sur les composés fluorescents non volatils de l'huile essentielle de bergamote. La séparation par chromatographie en couche mince et l'analyse spectrale en lumière ultraviolette ont permis de déterminer les quantités présentes de quatre principaux constituants : le bergaptène, le citroptène, le 7 méthoxy 5 geranoxycoumarine et la bergamottine.

Il expose dans la deuxième partie une étude originale sur les essences de bergamote provenant du Mali et de Côte d'Ivoire.

Les valeurs spectrales  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  et CD de ces essences sont éloignées des normes publiées sur les essences italiennes. La cause paraît en être dans une teneur plus faible en bergamottine.

Cette différence pourrait faire suspecter d'adultération des essences réellement pures.

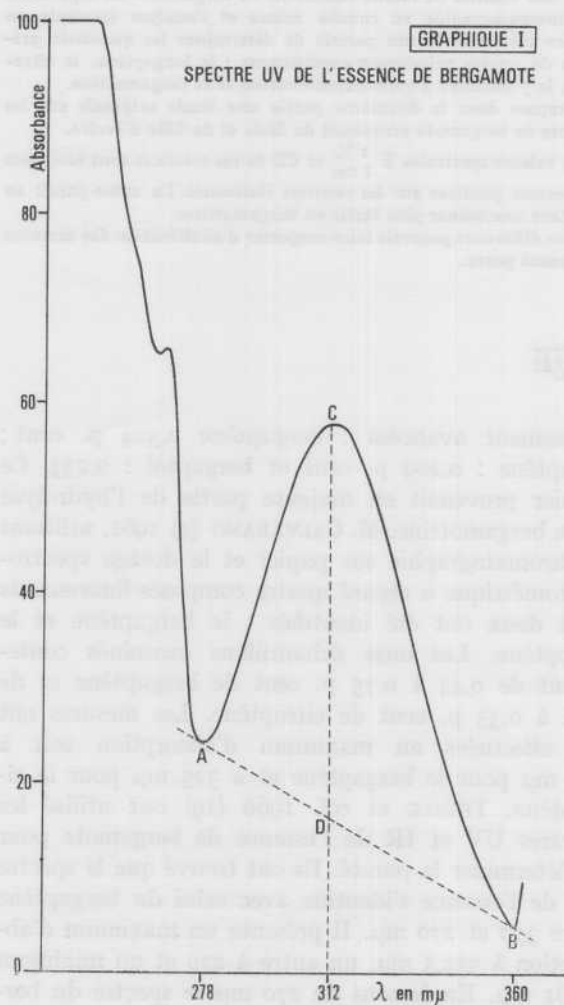
## HISTORIQUE

Dans son traité sur les huiles essentielles (7) E. GUENTHER a mentionné la présence dans l'essence de bergamote du bergaptène, substance blanche qui cristallise et se dépose spontanément dès l'extraction, l'essence en contiendrait 5 p. cent. Le bergaptène a été étudié en 1891 par POMERANZ (11).

Un alcool, dérivé du bergaptène, le bergaptol a été séparé par SPATH et SOCIAS en 1934 (17). En 1937 SPATH et KAINRATH (16) ont découvert un étheroxyde de geraniol et de bergaptol : la bergamottine. Ce composé avait probablement déjà été séparé en 1901 et il avait été baptisé bergaptine par SODEN et ROYAHN (15). SPATH et KAINRATH (16) ont identifié également une coumarine, appelée depuis citroptène ou limettine que l'on trouve dans les essences de citron et de lime. RODIGHIERO et CAPORALE (12) 1953-1954 analysant les substances fluorescentes de l'essence de bergamote ont trouvé des quantités sensiblement différentes de celles qui étaient pré-

cédemment avancées : bergaptène 0,324 p. cent ; citroptène : 0,209 p. cent et bergaptol : 0,233. Ce dernier provenait en majeure partie de l'hydrolyse de la bergamottine. M. CALVARANO (4) 1961, utilisant la chromatographie sur papier et le dosage spectrophotométrique a séparé quatre composés fluorescents dont deux ont été identifiés : le bergaptène et le citroptène. Les onze échantillons examinés contenaient de 0,44 à 0,75 p. cent de bergaptène et de 0,25 à 0,35 p. cent de citroptène. Les mesures ont été effectuées au maximum d'absorption soit à 310 m $\mu$  pour le bergaptène et à 325 m $\mu$  pour le citroptène. THEILE et col. 1960 (19) ont utilisé les spectres UV et IR de l'essence de bergamote pour en déterminer la pureté. Ils ont trouvé que le spectre UV de l'essence s'identifie avec celui du bergaptène entre 370 et 270 m $\mu$ . Il présente un maximum d'absorption à 312,5 m $\mu$ , un autre à 270 et un minimum à 281 m $\mu$ . En-dessous de 270 m $\mu$  le spectre du ber-

gaptène est masqué par celui de l'acétate de linalyle, principal constituant volatil de l'essence. Ces auteurs ont trouvé que l'absorbance  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  à 312 m $\mu$  varie de 10 à 13 pour les essences pures. Ils ont indiqué par ailleurs que les essences d'origine africaine présentaient un maximum non pas à 312 mais à 298 m $\mu$ . L. PEYRON (1963) (19) a séparé les substances fluorescentes des huiles essentielles de divers citrus par chromatographie en couche mince. L'essence a été prélevée directement dans les glandes oléifères de l'écorce. Avec des plaques recouvertes de silice G Merck sur une épaisseur de 0,3 à 0,5 mm et un mélange éluant d'acétate d'éthyle (25) et de cyclohexane (75) il a obtenu 14 taches visibles en lumière UV à 365 m $\mu$ . Il a identifié le citroptène à  $rf = 0,22$  formant une tache de couleur bleu-violet et le bergaptol à  $rf = 0,08$  couleur beige. Cet auteur n'a pas mentionné la présence de bergaptène.



E. SUNDT et col. (1964) (18) au cours d'une analyse des parties acides de l'essence de bergamote saponifiée ont isolé le bergaptol, la limettine, le bergaptène et la bergamottine qu'ils ont identifiés par l'analyse élémentaire, les spectres IR, UV et de masse. M. CALVARANO et I. CALVARANO ont utilisé, comme THEILE le spectre UV de l'essence de bergamote pour en déterminer la pureté. L'intervalle 275-314 m $\mu$  du spectre leur a permis d'établir les valeurs spectrales qui correspondent aux essences pures. Ils ont choisi la valeur  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  au maximum d'absorption à 312 m $\mu$  et la valeur  $CD = CD$  (graphique I) étant la longueur du segment, parallèle à l'axe des absorbances joignant le maximum du spectre à 312 m $\mu$  à la tangente AB au spectre au minimum d'absorption 278 m $\mu$ , et au minimum au point de départ 360-370 m $\mu$ . L'utilisation de la valeur  $CD$  a été introduite par SALE (14) 1952 pour déterminer la pureté de l'essence de citron.  $CD$  est mesuré sur le spectre en unité d'absorbance. Mais alors que l'absorbance se calcule suivant la formule  $A = 2 - \log T$  et pour une solution à 1 p. cent en poids/vol,  $CD$  se rapporte à une solution à 1 p. mille en poids/vol. Rappelons que :

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{A - f}{bc}$$

- A : absorbance lue (comprise entre 0 et 2).
- b : épaisseur de la colonne liquide en cm.
- c : concentration de la substance analysée dans la solution, exprimée en g/100 ml.
- f : facteur de correction résultant de l'étalonnage de l'échelle des absorbances du spectrophotomètre.

Pour 74 échantillons d'essence pure analysée,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  était compris entre 9,95 et 15,90 et  $CD$  entre 0,83 et 1,04. Ces intervalles ont été confirmés en Calabre au cours des campagnes 64-65, 66-67, 68-69 (2) (3) (8). Par ailleurs sur 46 échantillons d'essences adultérées ou altérées, 35 ne se classaient pas dans ces intervalles.

ROTONDARO (1964) (13) a caractérisé aussi la pureté des essences de bergamote par l'étude de leur spectre UV. Les valeurs  $CD$  des essences italiennes garanties authentiques qu'il a mesurées sont peu différentes des valeurs publiées par M. CALVARANO. Il a suggéré d'utiliser la différence  $\Delta A$  313-A 277, également significative.

Les progrès réalisés dans la connaissance qualitative et quantitative des composés fluorescents de l'essence de bergamote laissent cependant

dans l'ombre des questions que l'analyste ne pouvait pas ne pas se poser. Il restait à identifier des composés séparés par chromatographie sur papier ou sur couche mince. D'autre part, si l'absorbance à 310-312 m $\mu$  de l'essence était due au bergaptène, comment se faisait-il que l'on attribue une certaine constance à cette absorbance puisque le bergaptène précipite dès l'extraction de l'essence et continue à précipiter si l'on modifie les conditions d'entreposage ? MULLER (9) considère le citroptène comme responsable du spectre de l'essence à cette longueur d'onde. Mais le citroptène à la concentration existante absorbe peu et son maximum d'absorbance se situe à 325 m $\mu$ . Nous avons dans notre laboratoire, séparé sur couche mince, suivant la technique de L. PEYRON (10) une substance fortement fluorescente, présentant le même spectre que le bergaptène, dont le maximum d'absorption est beaucoup plus élevé, mais que nous n'avons pas identifiée. Un récent travail de U. R. CIERI (6) 1969 répond clairement à ces questions. Cet auteur a séparé sur couche mince quatre composés fluorescents. L'un formant une tache verte à rf = 0,33, le second

une tache bleue à rf 0,41, le troisième une tache bleue à rf 0,71 et le quatrième une tache verte à rf : 0,80. Ces quatre composés ont été identifiés par comparaison des rf et des spectres UV d'une solution de ces taches, avec des substances pures que l'auteur s'était procurées ou avait synthétisées. De plus les spectres UV ont permis un dosage quantitatif au moyen de solutions étalons. C'est ainsi que l'auteur a identifié et dosé dans les essences pures de bergamote provenant de la Station expérimentale de Reggio de Calabre :

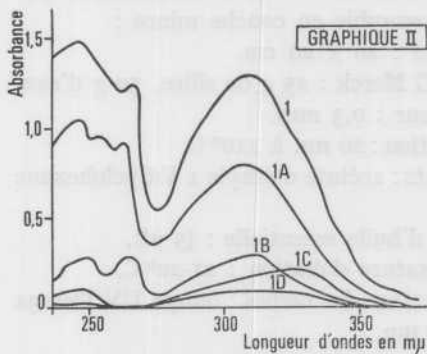
- le bergaptène 0,30 à 0,36 p. cent,
- le citroptène 0,24 à 0,30 p. cent,
- la 7-methoxy-5-geranoxycoumarine 0,04 à 0,06 p. cent,
- la bergamottine 1,5 à 1,9 p. cent.

Le bergaptol n'a été trouvé que dans les vieilles solutions chloroformiques de la bergamottine et sa présence a été attribuée à la décomposition de ce composé.

Une autre précision a été apportée par U. R. CIERI de ces quatre composés fluorescents, seul le bergaptène possède une action photosensibilisante.

TABLEAU I  
Coumarines et psoralènes isolés de l'essence de bergamote

Nom chimique	Nom commun	Structure
5-méthoxy-psoralène	bergaptène	<chem>COC1=CC=C2C(=O)C=C1C2=O</chem>
5-hydroxy-psoralène	bergaptol	<chem>Oc1ccc2c(c1)C(=O)C=C2=O</chem>
5-geranoxypsoralène	bergamottine	<chem>CC(C)C=CCOC1=CC=C2C(=O)C=C1C2=O</chem>
5-7-diméthoxycoumarine	citroptène	<chem>COC1=CC(OC)=CC=C2C(=O)C=C1C2=O</chem>
7-méthoxy-5-geranoxycoumarine		<chem>CC(C)C=CCOC1=CC(OC)=CC=C2C(=O)C=C1C2=O</chem>



(d'après U.R. Cieri) (6) - COURBES D'ABSORBANCE EN UV DE L'ESSENCE DE BERGAMOTE ET DES QUATRE COMPOSÉS FLUORESCENTS SÉPARÉS EN COUCHE MINCE, DISSOUS DANS LE CHLOROFORME.

- 1 - huile essentielle de bergamote
- 1A - bergamottine
- 1B - bergaptène
- 1C - citroptène
- 1D - 7-méthoxy-5-geranoxycoumarine

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les substances fluorescentes d'essences de bergamote africaine ont été séparées et identifiées et les valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD de leur spectre UV ont été mesurées. Les résultats ont été comparés à ceux que l'on obtient avec les essences de Calabre.

Échantillonnage : nous avons réuni au laboratoire les échantillons suivants :

1. Un échantillon en provenance de la Station expérimentale de Reggio de Calabre qui nous a été fourni grâce à l'obligeance de son directeur Monsieur le professeur LA FACE.

2. Quatorze échantillons provenant du Centre malien de Recherches fruitières dirigé par M. de Laroussilhe (I. F. A. C.).

Les échantillons expérimentaux ont été préparés par grattage de l'écorce au touret.

3. Sept échantillons en provenance de Sassandra, Côte d'Ivoire, extraits à la machine provenant de plantations privées.

Nous avons également analysé le filtrat d'une suspension dans l'éthanol du précipité blanc se trouvant dans les échantillons maliens et ivoiriens.

Séparation des composés fluorescents par chromatographie en couche mince :

plaques :  $20 \times 20$  cm,  
silice G Merck : 25 g de silice, 50 g d'eau,  
épaisseur : 0,3 mm,  
activation : 20 mn à  $110^{\circ}\text{C}$ ,  
solvants : acétate d'éthyle 1 V Cyclohexane

3 V,

dépôt d'huile essentielle : (5  $\mu\text{l}$ ),  
température d'éluion :  $21-22^{\circ}\text{C}$ ,

observation des taches : lampe UV Desaga  
 $d = 366 \text{ m}\mu$ .

Identification des taches : après observation de leur couleur et mesure de leur rf et de leur surface, les taches sont grattées et mises en suspension dans 10 ml d'éthanol. Au bout d'une demi-heure et après agitation la suspension est filtrée et le spectre UV de la solution tracé avec un spectrophotomètre enregistreur Beckmann DK entre 360 et 200  $\text{m}\mu$ . Le rf des taches et leur spectre UV sont comparés à ceux qui ont été publiés par U. R. CIERI (6).

Mesure des valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  : par ailleurs, on pèse avec précision environ 16 mg d'huile essentielle de tous les échantillons que l'on dilue dans 25 ml d'éthanol absolu. Après agitation et mélange les solutions sont analysées en absorbance au spectro-

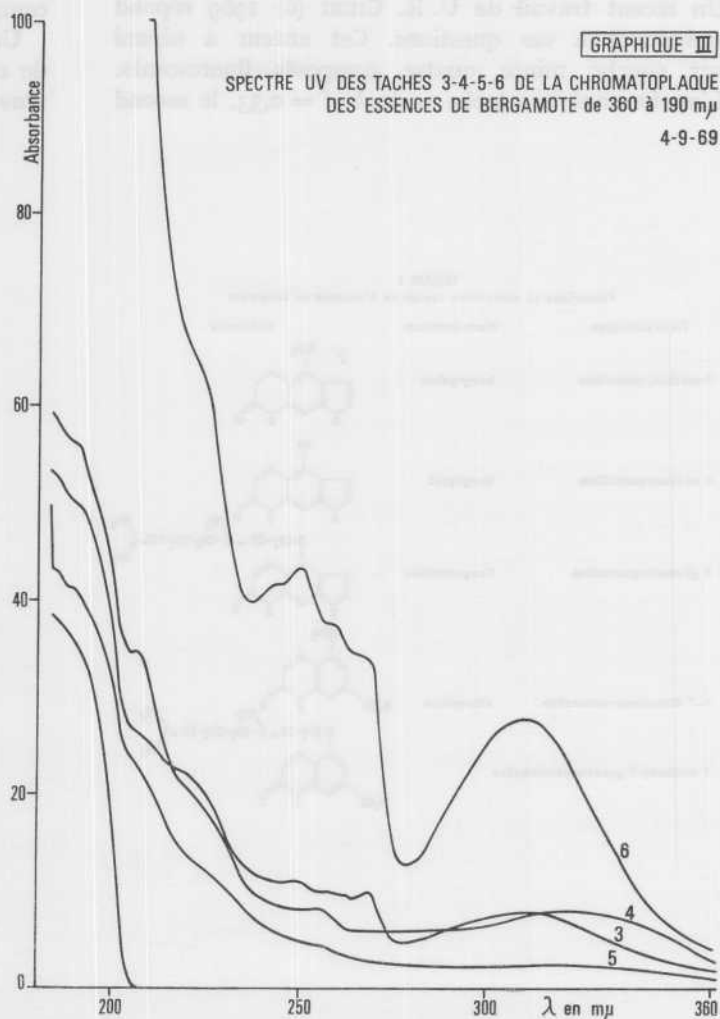


TABLEAU II  
Chromatographie en couche mince des divers  
échantillons d'huile essentielle de bergamote

Taches	Couleur	Rf	Estimation de la surface en $\text{mm}^2$			
			C	RCI	M	P
1	blanc-jaune	0,13	10	5	10	
2	violet	0,21	7	7	7	
3	rose-brun	0,26	30	20	20	30
4	bleu	0,31	50	30	30	7
5	bleu	0,54	50	30	40	
6	jaune	0,63	150	80	80	

C = huile essentielle de bergamote de Calabre

RCI = huile essentielle de bergamote de Côte d'Ivoire

M = huile essentielle de bergamote du Mali

P = solution éthanolique du précipité blanc trouvé dans RCI ou M.

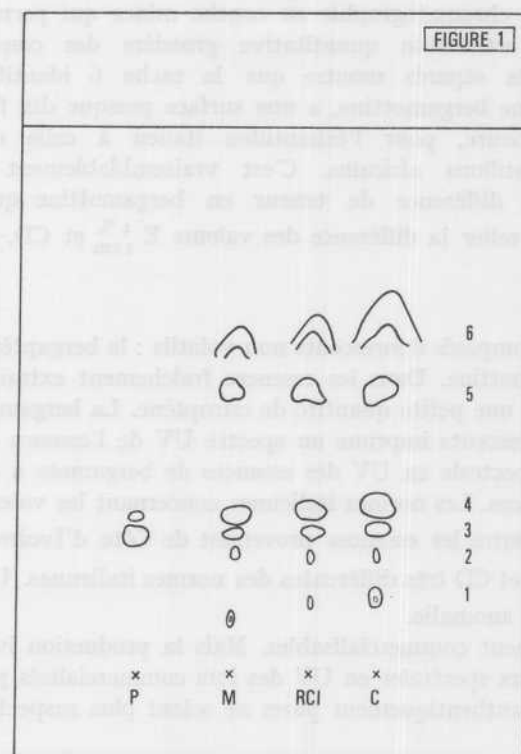


TABLEAU III  
Caractères analytiques d'huiles essentielles  
de bergamotes africaines

	Echantillons	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	CD
Côte d'Ivoire	1	9,2	0,54
	2	11,8	0,74
	3	10,0	0,63
	4	7,8	0,49
	5	8,0	0,43
	6	8,4	0,47
	7	7,6	0,40
Mali	1	8,3	0,52
	2	8,2	0,52
	3	8,7	0,54
	4	7,2	0,45
	5	9,1	0,56
	6	9,8	0,62
	7	8,3	0,53
	8	7,9	0,51
	9	8,8	0,52
	10	8,2	0,55
	11	8,7	0,57
	12	9,5	0,64
	13	9,9	0,63
	14	8,6	0,57

TABLEAU IV  
Limites maximales et minimales des Valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD

Italie	9,95	≤	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	≤	15,90
	0,83	≤	CD	≤	1,04
Côte d'Ivoire	7,6	≤	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	≤	11,8
	0,40	≤	CD	≤	0,74
Mali	7,2	≤	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	≤	9,9
	0,45	≤	CD	≤	0,64

photomètre Beckmann DK et les valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD sont mesurées et calculées suivant la méthode SALE (14) adaptée à la bergamote par CALVARANO (5).

Résultats : tableau II et graphique III.

Les spectres des taches I et II n'ont pas été représentés pour ne pas alourdir le graphique III. Ils ne présentent pratiquement aucune absorption entre 360 et 220 m $\mu$ . II présente un maximum à 207 m $\mu$ .

La couleur des taches n'est pas un critère certain, car, ainsi que le signale PEYRON après d'autres auteurs, ces colorations peuvent varier suivant la phase solide de la plaque, et les éluants. Cependant la comparaison des rf et des spectres UV de chaque tache avec ceux qui ont été publiés par U. R. CIERI (6) nous permet d'identifier sans ambiguïté les taches 3, 4, 5 et 6, comme étant :

3 : bergaptène,

4 : citroptène,

5 : 7 méthoxy 5 géranoxycoumarine,

6 : bergamottine.

Il se vérifie que la bergamottine est, entre 350 et 250 m $\mu$  la principale substance responsable du spectre de l'essence de bergamote (1).

D'après la surface des taches sur la chromatoplaque on remarque que les essences africaines sont moins riches en bergamottine que les essences italiennes. La CCM nous montre de plus que le précipité blanc trouvé dans les essences africaines est composé principalement de bergaptène, mais contient aussi une petite proportion de citroptène.

Il apparaît (tableaux III et IV) que les valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  des essences ivoiriennes sont comprises entre 7,6 et 11,8 et leurs valeurs CD entre 0,40 et 0,74. Pour les essences maliennes  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  est comprise entre 7,2 et 9,9 et CD entre 0,45 et 0,64. La plus grande homogénéité des valeurs maliennes est vraisemblablement due à l'échantillonnage, réalisé sur un verger pilote unique, alors que les essences ivoiriennes proviennent de diverses plantations.

La valeur CD = 0,98 de l'essence italienne qui nous a été fournie a été déterminée au laboratoire de la Station expérimentale de Reggio. L'analyse nous a donné pour cet échantillon :  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 13,8$ , CD = 0,96. La concordance des résultats semble satisfaisante.

La confrontation des valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD, des

(1) En-dessous de 230 m $\mu$  le spectre de la bergamottine est affecté par le linalol qui migre de façon identique sur la chromatoplaque mais dont la tache n'est visible qu'après l'emploi d'un révélateur.

essences italiennes et des essences africaines fait apparaître des différences très importantes. Tableau IV.

Tous les échantillons africains, sans exception, demeurent en dehors des normes italiennes. Un laboratoire non prévenu pourrait conclure à une adultération des essences africaines. Or, nous savons qu'il n'en est rien et que la pureté des essences que nous avons analysées ne saurait être suspectée.

L'huile essentielle de bergamote renferme quatre principaux composés fluorescents non volatils : le bergaptène, le citroptène, le 7 méthoxy 5 géranoxycoumarine et la bergamottine. Dans les essences fraîchement extraites le bergaptène précipite sous forme de cristaux blancs entraînant une petite quantité de citroptène. La bergamottine en quantité plus importante que les autres composés fluorescents imprime au spectre UV de l'essence ses caractéristiques particulières entre 250 et 340  $\mu$ . L'analyse spectrale en UV des essences de bergamote a été utilisée par divers auteurs pour contrôler la pureté de ces essences. Les normes italiennes concernant les valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD sont vérifiées depuis plusieurs campagnes. Par contre les essences provenant de Côte d'Ivoire et du Mali que nous avons analysées présentent des valeurs  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  et CD très différentes des normes italiennes. Une plus faible teneur en bergamottine paraît être la cause de cette anomalie.

Les essences maliennes sont, pour d'autres raisons, difficilement commercialisables. Mais la production ivoirienne se développe. Une détermination systématique des valeurs spectrales en UV des lots commercialisés permettrait d'établir des normes spécifiques afin que des essences authentiquement pures ne soient plus suspectées d'adultération.

#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) Association française de Normalisation (AFNOR). Huile essentielle de bergamote d'Italie. Feuille de documentation FD T. n° 75-215. 1965.
- (2) BOVALO (F.). — L'industria del bergamotto nella campagna 1966-67. *Ess. Deriv. Agrum.*, XXXVII, n° 1, janv.-mars 1967, p. 17-26.
- (3) BOVALO (F.). — L'industria del bergamotto nella campagna 1968-69. *Ess. Deriv. Agrum.*, XXXIX, n° 1, janv.-mars 1969, p. 3-9.
- (4) CALVARANO (M.). — Sulle cumarine dell'essenza di bergamotto. *Ess. Deriv. Agrum.*, XXXI, n° 4, oct.-déc. 1961, p. 167-176.
- (5) CALVARANO (M.) et CALVARANO (I.). — La composizione delle essenze bi bergamotto Nota II. Contributo all'indagine analitica mediante spettrofotometria nell'UV e gas-cromatografia. *Ess. Deriv. Agrum.*, XXXIV, n° 2, avril-juin 1964, p. 71-92.
- (6) CIERI (U. R.). — Hazardous Substances. Characterization of the Steam volatile Residue of Bergamot Oil and Some other Essential Oils. *J. of the AOAC*, vol. 32, n° 4, 1969, p. 719-729.
- (7) GUENTHER (E.). — The Essential Oils. Vol. III. Oil of Bergamot p. 273. D. van Nostrand Cy, Inc. Princeton, New Jersey ed. 1964.
- (8) LEO (M. de). — L'industria del bergamotto nella campagna 1964-65. *Ess. Deriv. Agrum.*, XXXV, n° 1, janv.-mars 1965.
- (9) MULLER (P. A.). — Oil of Bergamot. Speculation Sophistication. *P et EOR*. Jun. 1967, p. 368-371.
- (10) PEYRON (L.). — Les constituants fluorescents présents dans les cellules oléifères de fruits de Citrus. *C. R. Acad. Sci.*, Jul. 1968, v. 257, n° 1, p. 235-238.
- (11) POMERANZ, d'après GUENTHER (E.), ouvrage cité p. 273.
- (12) RODIGHIERO et CAPORALE, d'après M. CALVARANO, référence n° 4.
- (13) ROTONDARO (F. A.). — Spectrophotometric Characterization of some authentic Oils of Bergamot and a Few Related Oils. *J. of the AOAC*, vol. 47, n° 4, Aug. 1964, p. 611-617.
- (14) SALE (J. W.) et al. — Analysis of Lemon Oils. *J. of the AOAC* vol. 36, n° 1, 1953, p. 112.
- (15) SODEN et ROJAHN, d'après GUENTHER (E.), ouvrage cité p. 273.
- (16) SPATH et KAINRATH, d'après GUENTHER (E.), ouvrage cité p. 273.
- (17) SPATH et SOCIAS, d'après GUENTHER (E.), ouvrage cité p. 273.
- (18) SUNDT (E.), WILLIAM (B.) et STOLL (M.). — Analyse des parties acides de l'essence de bergamote saponifiée. *Helv. Chim. Act.* vol. 47, fasc. 2, n° 51, 1964, p. 408-413.
- (19) THEILE (F. C.), DEAN (D. E.) et SUFFIS (R.). — A Modern Approach to the Evaluation of Bergamot Oil. *P. et EOR* oct. 1960, p. 535-549.