

COMPOSITION EN ACIDES GRAS, STEROLS ET TOCOPHEROLS DE L'HUILE VEGETALE NON CONVENTIONNELLE EXTRAITE DES GRAINES DE *JATROPHA CURCAS* (EUPHORBIACEAE) DU BENIN

S. T. Djenontin¹, J. Dangou¹, D. V. Wotto¹,
K.C. D. Sohounlhoue^{1*}, P. Lozano², D. Pioch²

1- Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée (LERCA), Ecole Polytechnique
d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 2009 Cotonou

(République du Bénin; ksohoun@bf.refer.org)

2- UMR CIRAD T64 Génie des Procédés d'Elaboration des Bioproduits (GPEB), 13 rue J.F. Breton
BP 5035 34398 Montpellier Cedex 5 (France).

(Reçu le 23/09/2005 – Accepté après révision le 2/10/2006)

Summary : The physico-chemical characterization of the vegetable oil extracted from seeds of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) collected in south of Benin (Savalou) is reported. Unsaturated fatty are in majority with the preponderance of oleic and linoleic acids (42.3 and 36.6% respectively). The study of the insaponifiable fraction (0.8%p) permitted to identify the sterols and tocopherols contents (130 mg/100g and 19,9 mg/100g respectively). The major sterol and tocopherol are β -sitosterol (86.1 %) and γ -tocopherols (76.9%) respectively of total sterols and tocopherols. The phospholipids (0.6g/100g) were quantified on the basis of phosphorus content. These physicochemical data of oil were compared with those of others conventional vegetable oils common use in Benin.

Key words: non edible oil, *Jatropha curcas*, Euphorbiaceae, fatty acids, sterols, tocopherols.

Résumé : La caractérisation physico-chimique de l'huile végétale extraite de graines de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) récoltées dans le sud du Bénin (Savalou) est rapportée. Les acides gras insaturés sont majoritaires avec la prédominance des acides oléique et linoléique (42,3 et 36,6% respectivement). L'étude de la fraction insaponifiable (0,8%p) a permis de révéler que l'huile de *Jatropha curcas* contient 130 mg/100g de stérols (dont 86,1% de β -sitostérol) et 19,9 mg/100g de tocophérols (dont 76,9% de γ -tocophérol). Les phospholipides (0,6g/100g) ont été quantifiés sur la base de la teneur en phosphore. Ces données physico-chimiques de l'huile ont été comparées à celles d'autres huiles végétales conventionnelles de grande consommation au Bénin.

Mots clés: huile végétale non conventionnelle, *Jatropha curcas*, Euphorbiaceae, acides gras, stérols, tocophérols.

I- INTRODUCTION

La flore béninoise riche et diversifiée, regorge d'innombrables plantes oléagineuses que l'on utilise pour l'alimentation, la savonnerie, l'éclairage etc. (Noix de palme, graines de coton, graines d'arachide etc.).

Il serait intéressant dans un souci d'innovations de cibler d'autres oléagineux d'importance économique pour l'instant faible mais néanmoins dignes d'intérêts scientifique et technologique (*Jatropha curcas*, *Azadirachta indica*, *Blighia sapida*)

[1].

Encore appelé pignon d'Inde, *pourghère*, "*physic nut*", le *Jatropha curcas* est connu en langue nationale *Fon* au sud du Bénin sous la dénomination de «*Kpotin*» ce qui signifie «bois de clôture». Il est de la famille des Euphorbiacées.

Il se présente sous un arbuste de près de quatre mètres de hauteur à latex translucide, avec des rameaux épais, à écorce bronze verdâtre. Les feuilles sont glabres, entières ou à cinq lobes peu profonds et à longs pétioles. Les fruits sont des capsules ovoïdes,

légèrement trilobées ou anguleuses, à deux ou trois graines. Ses graines qui contiennent de l'huile ne sont pas encore valorisées au Bénin.

Les précédentes recherches effectuées sur le *Jatropha curcas* [2,3,4,5] se sont limitées à la détermination de sa composition en acides gras et n'ont pas abordé le dosage des stérols et tocophérols de la fraction insaponifiable objet des présentes études.

Ces études visent donc la valorisation de la graine de *Jatropha curcas* par l'étude de la valeur nutraceutique de son huile.

II- PARTIE EXPERIMENTALE

2-1 Matériels

2-1-1 Graines

La récolte du lot de graines analysées a été effectuée dans le Centre du Bénin à Savalou (Afrique de l'Ouest). Elles ont été convenablement séchées au soleil jusqu'à ce que les graines «sonnent».

Les graines ont été séparées des enveloppes, convenablement triées et débarrassées de toutes les impuretés, puis décortiquées et broyées finement. Les amandes ont été enfin conditionnées à 25°C dans des papiers aluminium avant l'extraction de l'huile.

2-1-2 Huile

L'huile non conventionnelle de *Jatropha curcas*, a été obtenue par extraction des graines (finement broyées), au Soxhlet pendant 6 heures à la température de 70°C. Les traces d'hexane ont été éliminées au rotavapor. L'huile extraite a été conditionnée dans des bouteilles sombres et sous atmosphère inerte de diazote.

2-2 Méthodes

2-2-1 Caractérisation physico-chimique de l'huile

La teneur en eau et en matières volatiles est déterminée selon la norme NF T 60-201 et les matières extractibles à l'hexane (teneur en huile) par la norme NF V03-924. L'acidité, l'indice de peroxyde, l'indice de saponification sont déterminés

respectivement suivant le protocole des normes NF T60-204, NF T60-220, NF ISO 3657.

L'indice d'iode est calculé selon la formule suivante sur la base de la composition en acide gras déterminée en chromatographie en phase gazeuse.

$$I_I = M(I_2) \sum_i \%AGI_i / MAGI_i$$

Où

%AGI_i : pourcentage en acide gras insaturé obtenu par CPG ;

MAGI_i : masse molaire moléculaire de l'acide gras insaturé correspondant ;

M(I₂) : masse molaire moléculaire du diode = 254 g/mol.

2-2-2 Dosage des éléments minéraux de l'huile de *Jatropha curcas*.

Les éléments minéraux (N, P, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Na) ont été dosés par ICP (plasma à Couplage Inductif) après minéralisation de l'échantillon. Le principe de l'ICP repose sur l'émission atomique et les phénomènes d'émission ayant lieu dans un plasma. La température très élevée du plasma (7000 à 10000 K) par rapport à celle d'une flamme (1000 K) permet une meilleure dissociation des espèces chimiques. Les échantillons sont mis en solution selon la procédure de minéralisation par voie sèche. Le spectromètre, de marque Varian Vista, est équipé du détecteur CCD (Coupled Charge Device). L'appareil (Jobin Yvon JY) était aux longueurs d'onde suivantes : $\lambda = 214,914$ nm pour le phosphore et $\lambda = 589,592$ nm pour le sodium. Les dosages ont été effectués en réalisant un étalonnage qui respecte les conditions du milieu analysé (matrice, acidité). Les calculs ont été effectués par interpolation par rapport à la gamme d'étalonnage.

La validation des résultats analytiques repose sur l'analyse d'échantillons de référence internes (témoins), dont la teneur en éléments minéraux est connue.

2-2-3 Détermination de la composition en acides gras par CPG

a- Préparation des esters méthyliques des acides gras

Les esters méthyliques ont été préparés selon le protocole de norme NF T60-233.

b- Composition massique en acides gras

Pour déterminer la composition en acides gras, 1 µL d'une solution hexanique d'esters méthyliques a été injectée dans un CPG Agilent 6890 HP series (Agilent, USA) équipé d'une colonne de type INNOWAX (Agilent, USA), de 30m de long, 0,32mm de diamètre interne et un film d'épaisseur 0,25 µm. L'injecteur était en mode split, ratio 1/80 à la température de 250°C. Le gaz vecteur était l'Hélium de débit 1,5 mL/mn. Le détecteur à ionisation de flamme était à 270°C. La programmation de la température du four était la suivante: 150°C pendant 3mn suivi d'une augmentation de 3°C/mn jusqu'à 220°C (26,3mn) qui était maintenue constante jusqu'à la fin de l'acquisition (35,3mn).

L'identification des pics a été faite par comparaison des temps de rétention d'esters méthyliques d'acides gras d'huiles végétales comme l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile de palme, injectées dans les mêmes conditions opératoires.

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, chaque injection était reprise trois fois dans les mêmes conditions opératoires.

2-2-4 Détermination des stérols totaux de l'huile

a- Détermination de la teneur en insaponifiable

La teneur en insaponifiable a été déterminée selon la méthode de l'IUPAC [6].

b- Préparation de la fraction stérolique

Pour déterminer les stérols totaux, 0,5 g d'huile, 1mL de cholestérol et 5mL de KOH alcoolique ont été introduits dans un ballon avec 2 grains de pierre ponce et mis en reflux pendant 15 min. 5ml d'éthanol

sont alors introduits dans le ballon par le haut du réfrigérant. 10mL de cette solution sont introduits dans une colonne de chromatographie remplie d'oxyde d'aluminium ($0,063 < I < 0,2\text{mm}$). Les éluions ont été faites successivement avec 5ml d'éthanol et 30 mL de diéthyldéther. La fraction obtenue a été après évaporation du solvant, redissoute dans 1mL de chloroforme.

c- CCM préparative de la fraction stérolique

20 µL d'une solution étalon de cholestérol et 400 µL de la fraction insaponifiable de huile ont été successivement déposés à l'aide d'un déposeur Linomat IV-Y CAMAG (Merck, Réf. 022-786) sur une plaque de silice 60 (Alltech, 20 x 10 cm, 250µm d'épaisseur). L'éluion était faite par un mélange chloroforme/diéthyldéther (90/10, %v/v). La partie contenant le dépôt de cholestérol a été révélée par nébulisation d'un mélange $\text{Cu}^{++}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (1/1, %v/v) et un passage au four à 180°C pendant 10 min.

La bande de stérols correspondant au spot de cholestérol a été grattée et les stérols ont été désorbés dans du chloroforme (10mL/g de silice) à température ambiante sous agitation magnétique pendant 5min. Une fois la silice devenue transparente une filtration sur filtre Millipore (0,45µm, Réf. SLFH 013 NL) a permis de récupérer les stérols totaux sans contaminant solide.

a- Composition et teneur en stérols

1 µL de cette fraction stérolique a été injecté en CPG pour déterminer la teneur en stérols de l'huile.

L'analyse des stérols a été faite dans des conditions isothermes (285°C) dans un appareillage de CPG GC 8000 (Fisons Instruments) équipé d'une colonne de type SAC-5 (Sigma-Aldrich, USA), (longueur 30m, 0,25mm de diamètre interne et 0,25µm d'épaisseur de film). La température du détecteur à ionisation de flamme est maintenue à 300°C et celle de l'injecteur en mode split, ratio 1/100 à

300°C. L'intégration des pics a été faite grâce à un intégrateur Merck D2000. Le gaz vecteur était l'hélium (1,5 mL/min).

Pour identifier les pics, nous avons injecté des standards de cholestérol, de β -sitostérol et de stigmastérol (produits de qualité Sigma, concentration de 1mg/mL). Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, chaque injection a été reprise trois fois dans les mêmes conditions opératoires.

Les stérols totaux ont été calculés de la façon suivante :

$$\text{Stérols totaux (mg / g)} = \sum_x \frac{(A_x \times m_s \times K \times 100)}{(A_s \times m)}$$

Où :

A_x = Aire du pic du stérol X

A_s = aire du pic de cholestérol

m_s = masse de cholestérol ajouté

m = masse d'huile

K = facteur de réponse du stérol calculé en fonction de l'aire de l'étalon interne pour une concentration identique.

2-2-5 Détermination de la composition et de la teneur en tocophérols par HPLC-UV

L'analyse des tocophérols des huiles a été réalisée par HPLC en phase normale [7,8,9,10]. Une solution à 20mg d'huile par mL d'hexane et d'isopropanol (99:1) a été filtrée à l'aide d'un filtre millipore de 0,45 μ m de diamètre. L'appareil et ses accessoires (pompe, injecteur, détecteur) sont des produits de Agilent Séries 1100 (France), comportant une pompe quaternaire, un injecteur manuel muni d'une boucle d'injection de 20 μ L et un détecteur DAD (à barrettes diodes). La colonne était de type Luna Si 60, 5 μ m, 4,6 x 250mm (Phenomenex, France). Le mélange de solvants dans les conditions isocratiques était composé d'hexane et d'isopropanol pour HPLC (99:1, % v:v). Le débit de la colonne était de 1 mL/mn et la pression de 33 bars avec un détecteur DAD à la longueur d'onde de 295nm. Les pics ont été identifiés par injection de standards de tocophérols (produits Sigma aldrich). Les courbes d'étalonnage étaient

tracées en procédant à une gamme de dilution de 0,3 à 8 μ L/mL.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

3-1 Caractérisation physicochimique de l'huile de *Jatropha curcas* comparée à celles d'huiles végétales de grande consommation au Bénin.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de *Jatropha curcas* sont présentées dans le Tableau I. Elles sont comparées à d'autres huiles couramment utilisées au Bénin pour des applications diverses. L'huile est de couleur jaune clair. La teneur en huile (49%) du *Jatropha curcas* est supérieure à celles d'huiles de coton et d'arachide.

Par comparaison avec les standards et avec quelques paramètres de ces huiles (TableauI), il ressort que l'huile de *Jatropha curcas* répond à tous les critères de qualité qui lui confèreraient une bonne application dans des conditions moins onéreuses de raffinage. La viscosité (17 cSt) est relativement plus faible que celle de certaines huiles végétales, de coton (36cSt), de soja (31cSt). Il en résulte que l'huile de *Jatropha curcas* du Bénin pourrait être utilisée comme biocarburant [11].

3-2 Composition chimique de huile de *Jatropha curcas*

3-2-1 Eléments minéraux et teneur en phospholipides.

Le dosage du phosphore permet d'avoir une estimation de l'ensemble des phospholipides présents dans l'huile.

Sur le Tableau II sont reportés les éléments minéraux et la teneur en phospholipides contenus dans l'huile de *Jatropha curcas* du Bénin.

Les cations divalents (Ca, Mg) sont en forte proportion (148 ppm et 116 ppm respectivement) comparativement au cation monovalent (Na, 33,9 ppm). Les phospholipides (0,6g/100g), sont quantifiés sur la base de la teneur en phosphore. Au regard des teneurs en Ca, Mg et Na, on pourrait déduire que l'huile de *Jatropha*

Tableau I: Données physico-chimiques de l'huile de *Jatropha curcas* du Bénin comparée à celles d'huiles végétales de grande consommation au Bénin.

Paramètres Physico-chimiques	Huile de <i>Jatropha curcas</i>	huile de Coton	Huile d'arachide	Huile de palme	huile d'olive vierge
Teneur en huile (%)	49	22,9	45 – 53	67 – 89	20-27
Indice de réfraction (20°C)	1,468	1,470	1,470	1,453	1,468
Viscosité (en cSt à 20°C)	17,1	36,0	77 – 82	25 – 51	75 - 79
Gravimétrie spécifique (20°C)	0,919	0,917	0,914	0,895	0,910
Acidité oléique (%)	1,5	36,0	-	2,9 - 10,8	-
Indice de peroxyde (meq/kg)	0,3	-	-	-	≤ 20,0
Indice d'iode calculé (mg d'I ₂ pour 100g d'huile)	100	105	85 – 90	51 – 54	75 - 94
Indice de saponification (mg KOH/100g d'huile)	199	195	189 - 196	195 - 205	184 - 196
Phospholipides totaux (g/100g)	0,6	-	-	-	-
Insaponifiable (%)	0,8	-	0,6 - 1,0	0,5 - 1,2	0,4 - 0,8
Stérols totaux (mg/100g d'huile)	130	292-308	147-171	66-93	119-268 ^[12,13]
Tocophérols totaux (mg/Kg d'huile)	199	-	-	880,0	110

curcas du Bénin serait plus riche en phospholipides non hydratables qu'en phospholipides hydratables.

Tableau II : quantité relative (ppm) des éléments minéraux de l'huile de *Jatropha curcas* du Bénin

Eléments minéraux (ppm)	<i>Jatropha curcas</i>
Phosphore	350
Calcium	148
Magnésium	116
Sodium	33,9
Cuivre	Traces (<0,03)
Fer	1,0
Manganèse	0,6
Zinc	1,2
Phospholipides (g/100g)	0,6

3-2-2 Composition en acides gras de l'huile de *Jatropha curcas* comparée à celles des huiles végétales de grande consommation au Bénin.

La composition en acides gras de l'huile de *Jatropha curcas* est reportée dans le Tableau III. Elle est conforme aux valeurs reportées dans la bibliographie [2,3,4,5]. Ces valeurs ont été ensuite comparées à celles d'huiles végétales de grande consommation au Bénin. Cette huile se rapproche de certaines huiles de grande consommation (huile de table) dont l'indice d'iode est compris entre 80 et 110 à savoir l'huile d'olive, d'arachide (tableau III) [12,13,14].

L'huile de *Jatropha curcas* est de type insaturé (80% d'acides gras insaturés) et peut être classée dans la catégorie oléique-linoléique.

Elle est composée majoritairement d'acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique respectivement de 15,0%, 6,3%, 42,3% et 36,6%. L'acide linoléique (C18:2, n-6) et l'acide linoléique (C18:3, n-3) sont appelés acides gras essentiels indispensables à la croissance et à l'activité

physiologique de tous les tissus. Ils interviennent dans la régulation des troubles cardio-vasculaires. L'huile de *Jatropha curcas* pourrait constituer une source d'acide linoléique (omega-6).

Cependant, malgré son potentiel lipidique élevé, l'huile de *Jatropha curcas* est toxique à cause de la présence des esters de phorbol [15]. Il faudrait donc développer des technologies adéquates comme l'extraction sélective au CO₂ supercritique (pour l'instant onéreuse) ou assistée par enzyme [16,17,18] afin de favoriser son utilisation probable comme huile de table au Bénin.

3-2-3 Composition de la fraction stérolique comparée à celle d'huiles végétales de grande consommation au Bénin.

Cette famille de composés (figure 1), surtout le β -sitostérol permet de lutter contre les maladies cardiovasculaires par la réduction de l'adsorption intestinale du cholestérol [19]. Le β -sitostérol constitue le stérol majoritaire (86,1%) suivi du stigmastérol (8,0%) et du campestérol (4,1%) des stérols totaux. Cette teneur en stérols totaux (130 mg/100g d'huile) a été comparée à celle de l'huile d'olive (119-268 mg/100g) [11,12], d'arachide et de palme (147-171 et 66-93 mg/100g respectivement) [11] (Tableau IV). Il ressort que l'huile de *Jatropha curcas* semble avoir une teneur en stérols totaux et individuels proche de celle de l'huile d'olive et d'arachide marquée par la prédominance du β -Sitostérol (58 -79,7%).

3-2-4 Composition de la fraction tocophérolitique comparée à celles des huiles végétales de grande consommation au Bénin.

Il n'y a pas dans la littérature consultée, de données relatives à la teneur en tocophérols d'huile de *Jatropha curcas*. Les tocophérols (figure 2) [20,21] qui constituent la classe des vitamines E ont un pouvoir antioxydant grâce à leur capacité à inhiber les peroxydations lipidiques [22].

Tableau III : Composition massique des principaux acides gras de l'huile de *Jatropha curcas* du Bénin comparée avec celles d'huile de grande consommation au Bénin.

Acides gras (%)	<i>Jatropha curcas</i>	Coton	Arachide	Palme	huile d'olive vierge
Acide palmitique C16:0	15,0	23,1	9,6	47,5	7,5 - 20,0
Acide stéarique C18:0	6,3	2,2	3,7	5,2	0,5 - 5,0
Acide oléique C18:1	42,3	17,4	54,0	36,0	55,0 - 83,0
Acide linoléique C18:2	36,6	54,0	22,0	9,3	3,5 - 21,0

Tableau IV : Composition en stérols totaux de *Jatropha curcas* du Bénin comparée avec celle d'huile végétale de grande consommation au Bénin.

Stérols	<i>Jatropha curcas</i>	Coton	Arachide	Palme	huile d'olive
Campestérol (%)	4,1 ± 1,8	4 - 8	12 - 15	19 - 21	2,9
Stigmastérol (%)	8,0 ± 1,1	<1	8 - 11	11 - 23	0,7
β-sitostérol (%)	86,1 ± 2,5	86 - 93	58 - 66	56 - 59	79,7
Δ ⁵ -avénastérol (%)	0,3 ± 0,1	2 - 3	9 - 14	2 - 3	13,5
Stérols totaux (mg/100g)	130,0 ± 7,3	292-308	147-171	66-93	119-268

Tableau V : Composition en tocophérols totaux de *Jatropha curcas* du Bénin comparée avec celle d'huile végétale de grande consommation au Bénin.

Tocophérols	<i>Jatropha curcas</i>	Coton	Arachide	Olive vierge	Huile de palme
α-tocophérol (%p)	10,2 ± 0,1	32- 49	42 - 59	52 - 87	23,9 ± 0,3
β-tocophérol (%p)	12,9 ± 0,2	-	2 - 5	10 - 25	32,5 ± 0,2
γ-tocophérol (%p)	76,9 ± 0,7	31 - 57	32 - 52	7 - 23	40,2 ± 0,4
δ-tocophérol (%p)	-	1 - 8	2 - 4	-	3,3 ± 0,1
Tocophérols totaux (mg/Kg)	199,0 ± 16, 7	-	-	110-183	718 – 818

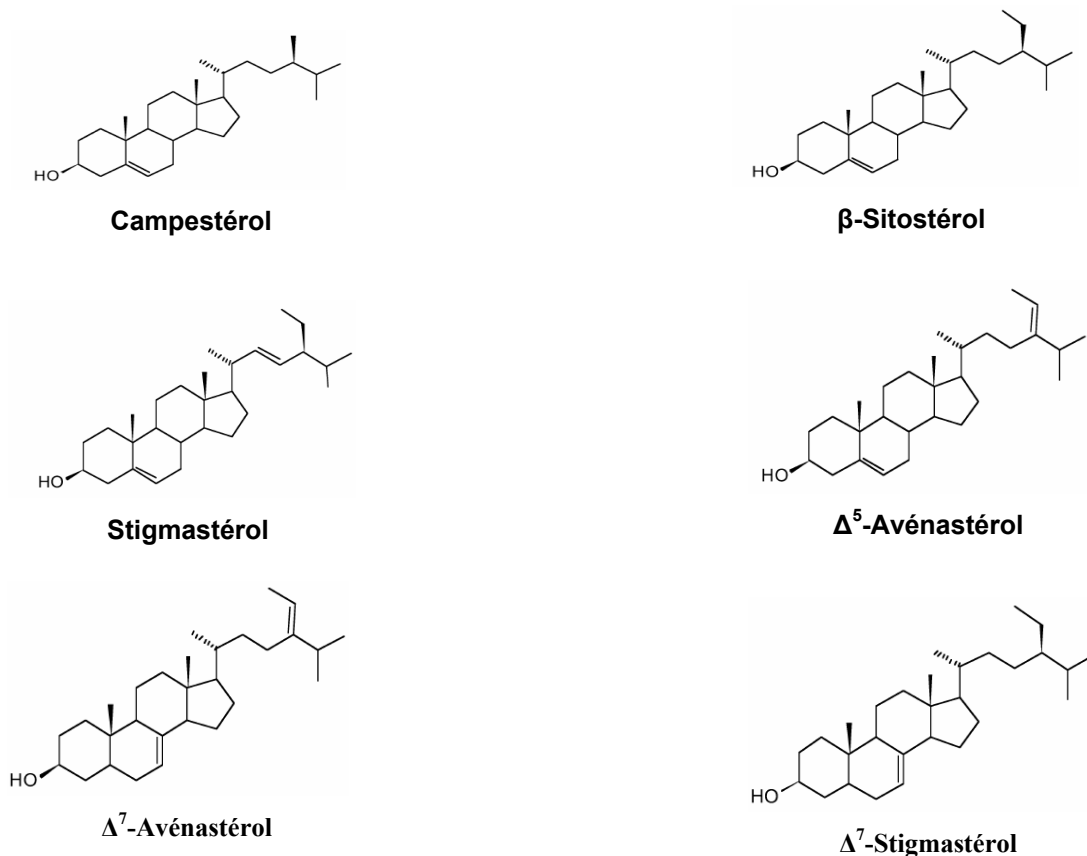


Figure 1 : Structure des principaux stérols dans les huiles végétales [20,21]

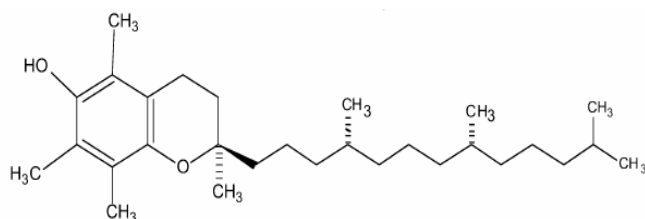


Figure 2 : Structure des tocophérols [20, 21]

L'huile de graines de *Jatropha curcas* a une teneur en tocophérols totaux de 199 mg/Kg. Cette valeur est faible par rapport à celles d'autres huiles végétales telles que le soja (980mg/Kg), maïs (huile 816mg/Kg) et l'huile de palme (718-818 mg/Kg). Elle est cependant plus élevée que celle de l'olive (110-183mg/Kg) [23,24]. L'huile

de *Jatropha curcas* contient seulement les α , β et γ - tocophérols (10,2 ; 12,9 ; 76,9% respectivement des tocophérols totaux). Au vu de cette composition, l'huile de *Jatropha curcas* aurait une activité antioxydante moyenne.

IV- CONCLUSION

Le présent travail qui rentre dans le cadre d'études exploratoires de graines issues d'espèces forestières peu exploitées, a

porté sur la composition chimique de l'huile extraite de graines de *Jatropha curcas* récoltées à Savalou (Bénin). Cette investigation révèle que l'huile de *Jatropha curcas* contient en grande proportion des acides gras insaturés (acide oléique, acide linoléique). Elles ont en outre, permis pour la première fois, de déterminer la teneur en tocophérols totaux par HPLC de cette huile. Les teneurs en stérols et tocophérols sont proches de celles des huiles d'olive et d'arachide qui sont des huiles de grande consommation au Bénin. La viscosité de l'huile étudiée est plus faible que celle des huiles de coton, de soja, ce qui offre des possibilités de son utilisation comme biocarburant. L'huile de *Jatropha curcas* est de la classe oléique-linéique. En plus de sa teneur en composés nutraceutiques (stérols et tocophérols), elle pourrait servir d'huile de table si elle n'était pas toxique. Cependant des méthodes appropriées d'extraction comme l'extraction par voie enzymatique pourraient permettre de contourner ce problème.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance au Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) pour son appui financier à ses travaux de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. FOIDL, P. ELDER, G.M. Gübitz, M. Mittelbach, M. Trabi; (Eds), (1997); 88-91, DBV. Graz;
- [2] E.T. AKINTAYO; *Bioresource Technology* (2004) 92; 307-310;
- [3] S.D.S. KPOVISSI, C. G. ACCROMBESSI, C. KOSSOUOH, M.M. SOUMANOU, M. MOUDACHIROU; *C.R. Chimie*, (2004) 7, 1007-1012;
- [4] G.M. GUBITZ, M. MITTELACH, M. TRABI; *Bioresource Technology*; (1999) 67 73-82;
- [5] J. MARTINEZ-HERRERA, J. P. SIDDHURAJU, G. FRANCIS, G. DAVILA-ORTIZ, K. BECKER; *Food Chemistry*, (2006) 96, 80-89;
- [6] IUPAC; Blackwell, Oxford, (1987) 7th Ed, Method 2432;
- [7] Dave B. OOMAH, D. DUMOND, A. C. MARTINEZ, D.V. GODFREY; *Food Chemistry*, (2006) 96, 304-312;
- [8] A. CERT, W. MOREDA, M.C. PEREZ-CAMINO; *J. of Chromatogr. A*, (2000) 881, 131-148;
- [9] F.J. RUPEREZ, D. MARTIN, E. HERRERA, C. BARBAS; *J. Chromatogr. A*, (2001) 935, 45-69;
- [10] S.L. ABIDI; *J. of Chromatogr. A*, (2000) 881, 197-216;
- [11] J. CONNEMANN; *Fat. Sci. Technol.*, (1994) 96, 536-550;
- [12] K.M. PHILLIPS, D.M. RUGGIO, J.I. TOIVO, M.A. SWANK, A.A. SIMPKINS; *J. of Food Comp., Anal.*, (2002) 15, 123-142;
- [13] L. CERCACI, M.T. RODRIGUEZ-ESTRADA, G. LERCKER; *J. of Chromatogr. A*, (2003) 985, 211-220;
- [14] R.N. GROSSO, V. NEPOTE, C. A. GUZMAN; *J. Agric. Food Chem.*, (2000) 48, 806-809;
- [15] A.A. LIBERALINO, E.A. BAMBIRRA, T. MORAES-SANTOS, E.C. VIEIRA; *Arq. Biol. Technol.*, (1988) 31, 539-550;
- [16] N.A. NIK NIRULAINI, I.S. MD ZAIDUL, O. ANUAR, A.K. MOHD OMAR; *Separation and Purification Technology*, (2004) 35, 55-60;
- [17] E. WINKLER, N. FOILD, G.M. GUBITZ, R. STAUBANN, N. STEINER; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (1997) 63-65, 449-456;
- [18] S. SHWETA, S. APARMA, M.N. GUPTA, *Industrial Crops and Product*, (2004) 20(3), 275-279;
- [19] P. BOUIC, J.H. LAMPRECHT; *Alter. Med. Rev.*, (1999) 4, 170-177;
- [20] J. BEARE-ROGERS, A. DIEFFENBACHER, V. HOLM; *Pure and Appl. Chem.*, (2001) 73, 4, 685-744;
- [21] D.G. LINDSAY, S.B. ASTLEY; *Molecular Aspect of Medicine*, (2002) 23, 1-38;
- [22] C. CUVELIER, O. DOTREPPE, L. ISTASSE; *Ann. Med. Vét.*, (2003) 143, 315-324.
- [23] J.M. AL-SAGER, J.S. SIDHU, S.N. AL-HOOTI, H.A. AL-AMIRI, A. AL-OTHMAN, L. AL-HAJI, A. NISSAR I.B. MANSOUR, J. MINAL; *Food Chemistry*, (2004) 85, 579-583;
- [24] C. YAN-HWA, K. YU-LANG; *Food Chemistry*, (1998) 62, 2, 191-195.