

Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* cultivées dans la région de Skikda - Algérie.

Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lavandula officinalis* grown in the region of Skikda - Algeria.

Manuscrit reçu le 26 avril 2017 et accepté le 22 juin 2017

Hicham BOUGHENDJIOUA

Département des sciences naturelles, l'école normale supérieure d'enseignement technologique de Skikda (ENSET), 21000, Algérie.

Adresse électronique pour la correspondance : boughendjioua.hicham@yahoo.com

Résumé :

Cette étude a pour objectif de déterminer la composition chimique et d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des sommités fleuries sèches de la lavande (*Lavandula officinalis*). L'analyse de l'huile essentielle par CG/SM a permis d'identifier 20 composés terpéniques dont les principaux sont : Linalyl acétate (32,98 %), Linalool (28,92 %), β -caryophyllène (4.62 %), Acétate de lavandulyle (4.52 %), Z- β -ocimène (4.44 %), terpinène-4-ol (4,32 %), E- β -ocimène (3.09 %) et β -farnésène (2.73 %). L'évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* sur trois cocci Gram+ : *streptocoque β -hémolytique du groupe A*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, souvent cause de la majorité des infections cutanées ont révélé un pouvoir antibactérien.

Mots clés : Huile essentielle, *Lavandula officinalis*, CG/SM, activité antibactérienne.

Abstract:

This study aims to determine the chemical composition and evaluate the antibacterial activity of the essential oil of flowers dry lavender buds (*Lavandula officinalis*). The analysis of the essential oil by GC / MS identified 20 terpenic compounds, the main ones: Linalyl acetate (32,98 %), Linalool (28,92 %), β -caryophyllene (4.62 %), Lavandulyl acetate (4.52 %), Z- β -ocimene (4.44%), terpinene-4-ol (4,32 %), E- β -ocimene (3.09 %) and β -farnesene (2.73 %). The evaluation of the antibacterial activity *in vitro* on three Gram + cocci: *β -hemolytic streptococcus group A*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* often caused the majority of skin infections showed an antibacterial power.

Keywords: Essential oil, *Lavandula officinalis*, GC/MS, antibacterial activity.

1. Introduction :

Les infections microbiennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives (Hulin *et al.*, 2005). D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduit à la sélection de

souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments. Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de multiples études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses. Le traitement des mycoses cutanées bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces. Malgré cela, le problème des résistances de plus en plus nombreuses à un ou plusieurs antifongiques persiste encore. Par ailleurs, le problème des récurrences n'est pas résolu et on sait qu'il n'y a pas d'immunité vis-à-vis des champignons, mais plutôt d'un terrain favorable aux mycoses. Ce problème de mycoses à répétitions a été soulevé et il semblerait s'agir beaucoup plus d'une absence d'éradication du germe que d'une infestation (Ouraini *et al.*, 2007).

La Lavande est un sous-arbrisseau de la famille des Labiées, Le genre se compose d'environ 28 espèces, qui sont dans la plupart d'origine méditerranéenne. Ce sous-arbrisseau est à tige et feuilles persistantes, il peut atteindre une longueur de 1 mètre, étroit vert pâle, s'étend du gris bleuâtre profond au vert à brun pâle, fleurs de couleur bleu – violet. D'autres variétés sont à fleurs blanches et roses (Chu et Kemper, 2001 ; Allaby, 1992). L'ensemble de la plante est très aromatique comprenant fleurs et feuilles La Lavande est employée comme expectorant, antispasmodique, désinfectant des plaies, contre les problèmes dermatiques, possède des propriétés antimicrobiennes et anti-carcinogènes, sédatif, antidépresseur, antioxydant, anti-inflammatoire et insecticide. (Chu et Kemper, 2001 ; Gören *et al.*, 2002). Notre objectif dans ce travail est d'étudier l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la Lavande sur la croissance de trois souches bactériennes qui sont à l'origine de plusieurs infections cutanées.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les échantillons de *La Lavandula officinalis* provient de la région d'Azzaba willaya de Skikda (Algérie), la récolte a été réalisée au mois de Mai 2013. Les sommités fleuries récoltées sont séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 10 jours.

2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928) où l'on place 100 g des sommités fleuries séchées avec un litre d'eau distillée. L'huile essentielle obtenue est stockée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4 °C et à l'ombre en présence de sulfate de sodium anhydre.

2.3. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par CG/SM

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée au niveau du laboratoire central de la police scientifique de Alger à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Perkin Elmer modèle Clarus 500, équipé d'une colonne capillaire PE, Elite série 5 % phenyl dimethylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm) avec une épaisseur du film de 0,25 µm, d'un injecteur split - splitless réglé à 250 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Les échantillons sont dilués dans le méthanol (1/20 v/v), 2 µl est injecté manuellement. Le gaz utilisé est l'Hélium avec un débit de 1 ml/min. La température de la colonne est programmée de 60 à 275 °C. La

fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV, avec un balayage de 80 - 600 uma, un analyseur quadripôle et un délai de solvant : 5.90 mn. L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

2.4. Évaluation de l'activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatogramme (NCCLS,1997). L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle (Vincent,1991). Trois concentrations d'huile essentielle ont été testées, l'extrait naturel brut ainsi que deux dilutions au un-demi et au un-quart de celui-ci. Ces huiles ont été diluées dans le DMSO (Diméthyle sulfoxyde).

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine (Infections cutanées) et pour leur résistance aux antibiotiques. Les souches bactériennes sont : *streptocoque β -hémolytique du groupe A*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Ces souches nous ont été fournies aimablement par le responsable de laboratoire de Microbiologie de centre hospitaliers Universitaires (CHU) Ibn Rochd d'Annaba, (Algérie).

Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* puis déposé au milieu d'une boîte de Petri de 90 mm de diamètre contenant un milieu gélosé « Mueller Hinton » de 4 mm d'épaisseur, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum. Ce dernier est préparé à une concentration de 0,5 Marc Ferland, de 106 à 108CFU.mL⁻¹ pour chaque souche. Un disque imprégné avec le DMSO (Diméthyle sulfoxyde) est appliqué dans les boîtes témoins, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boîtes de Petri sont incubées pendant 24 h à 37°C, la lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque disque ; la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits testés ; selon une échelle de notation symbolique allant de - à +++ et dont la lecture d'après (Meena et Sethi, 1994 ; Jeovetz *et al.*, 2000) se fait comme suit :

- $\emptyset < 10$ mm : huile essentielle (HE) sans action inhibitrice (-)
- $16 > \emptyset \geq 10$ mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire (+)
- $25 > \emptyset \geq 16$ mm : HE à une action inhibitrice importante (++)
- $\emptyset \geq 25$ mm : HE à une action inhibitrice très efficace (+++)

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement

Les résultats obtenus indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation est de $1,50 \pm 0,2$ %. La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite au bout des 90 premières minutes.

Les résultats obtenus par Laïb et Barbat (2011) et Mohammadi *et al.*, (2011) indiquent que les fleurs sèches de la lavande provenant de deux régions d'Algérie présentent des teneurs en huile essentielle respectivement 1.36% et 2.01 %.

Bouguerra et Zeghou (2009) ont trouvé que les fleurs de *Lavandula officinalis* collecté du même lieu ont présenté un rendement de 3.41 %.

De même, les résultats obtenus par Sidi Boulenouar et Ziane (2003) indiquent que les fleurs sèches de la lavande provenant de la région d'Ouchba et Zarifet ont donné des teneurs en huile essentielle équivalentes respectivement à 0.94 % et 0.70 %.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment le degré de maturité des fleurs de *Lavandula officinalis*, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction (Botton *et al.*, 1990).

3.2. Composition chimique

L'analyse qualitative et quantitative par (GC/SM) de l'huile essentielle a permis d'identifier 20 composés qui représentent un total de 91,84 % (Tableau 01). L'essence de *Lavandula officinalis* est constituée principalement de : Linalyl acétate (32,98 %), Linalool (28,92 %), β -caryophyllène (4.62 %), Acétate de lavandulyle (4.52 %), Z- β -ocimène (4.44%), terpinène-4-ol (4,32 %), E- β -ocimène (3.09 %), β -farnésène (2.73 %) totalisant environ 85,62 %.

Des études réalisées également en Algérie par Laib et Barbat (2011) pour la région de Constantine ont donné : Linalyl acétate (15.26 %), Linalool (10.68 %), 1,8- cineole (10.25 %), γ -terpinene (11.2 %) et camphor (11.25 %). Nos résultats et ceux de Laib et Barbat (2011) sont différents de ceux indiqués par certains auteurs. Kulevanova *et al.* (2000) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *Lavandula officinalis* collectées de la montagne de Kozjak (Macedonia), ils ont trouvé 32 constituants avec une prédominance de linalool (25,7 %), linalyl acétate (23,2 %) et lavandulyl acetate (12,4 %) avec une dominance des composants mono terpéniques et la présence des hydrocarbures sesquiterpéniques et ses dérivés oxygénés. Verma *et al.* (2009) ont étudié la composition de l'huile essentielle des fleurs de *Lavandula officinalis* cultivées à Uttarakand (Inde), ils ont identifié 37 composés monoterpéniques. Les composés majeurs étaient : linalyl acétate (47,56 %), linalool (28,06 %), lavandulyl acétate (4,34 %) et α - terpineol (3,7 %).

Sun Kim et Sun Lee (2002) ont comparé la composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula officinalis* obtenues par différentes méthodes d'extraction. Ils ont trouvé que le linalyl acétate (35,44 %) et le linalool (18,70 %) sont prédominants dans les huiles essentielles obtenues par distillation à la vapeur tandis que leurs valeurs étaient respectivement de 2,63 et 4,04 % dans le cas d'extraction par solvants ; 36,80 et 43,47 % dans le cas d'extraction par microonde.

D'après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Lavandula officinalis* cultivée à Constantine est différente de celles obtenues dans de nombreux travaux sur la même espèce, avec une prédominance des composés mono terpéniques dans la plupart des cas, mais à des proportions différentes.

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction (Svoboda et Hampson, 1999).

Tableau 01 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

N°	Composé	Indice de Kovats	(m/m)%
01	Octanone-3	1140	0.72 %
02	Acétate d'octène-3-yle	1165	0.65%
03	α -terpinéol	1169	0,90 %
04	β -phellandrène	1177	0.12 %
05	Acétate de néryle	1189	0,32 %
06	Linalol	1202	28,92 %
07	Camphre	1212	0.85 %
08	terpinène-4-ol	1223	4,32 %
09	Nérol	1250	0,20 %
10	Acétate de lavandulyle	1269	4.52 %
11	Acétate de géranyle	1287	0,60 %
12	Myrcène	1290	0.46 %
13	β-caryophyllène	1298	4.62 %
14	Germacrène	1362	0.27 %
15	E-β-ocimène	1374	3.09 %
16	Z-β-ocimène	1391	4.44 %
17	Cryptone	1411	0,35 %
18	β-farnésène	1418	2.73 %
19	Lavandulol	1439	0,78 %
20	Acétate de linalyle	1454	32,98 %
	Total		91,84 %

3.3. Activité antibactérienne

Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition selon la méthode de diffusion sur les disques stériles. Nous avons testé l'effet de l'huile essentielle brute de la lavande, sur trois souches bactériennes (*streptocoque β -hémolytique du groupe A*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). Les résultats expérimentaux présentés dans le **Tableau 02** montrent que l'huile essentielle de la lavande extraite présente une activité importante. Plusieurs travaux (Xianfei *et al.*, 2007 ; Sandri *et al.*, 2007 ; Zarai *et al.*, 2011 ; Al-Bayati, 2008) ont rapporté que les bactéries Gram (+) sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram (-) attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopoly saccharide.

L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram (+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (Sandri *et al.*, 2007 ; Zarai *et al.*, 2011 ; Al-Bayati, 2008 ; Randrianarivelo *et al.*, 2009).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Chahboun *et al.* (2015) et Jianu *et al.* (2013) qui ont observé une sensibilité importante chez *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'huile essentielle de la lavande.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de notre huile essentielle peut aussi, être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles ; les interactions synergiques

entres les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires. Ceci est confirmé par plusieurs études (Al-Bayati, 2008 ; Randrianarivelo *et al.*, 2009 ; Hmamouchi *et al.*, 2001).

Tableau 02 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *lavandula officinalis*.

Souches	HE	HE'	HE''	PIP	CAZ	OX
<i>streptocoque β -hémolytique du groupe A</i>	+++	++	+	S	R	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	R	R	nd
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	++	+	R	R	nd

HE: huile essentielle brute; HE': HE diluée à ½ (v/v); HE'': HE diluée à ¼ (v/v); CAZ: ceptazidine; PIP: piperacilline; OX: oxacilline; R: résistante; S: sensible; nd: non déterminée.

4. Conclusion

Le présent travail a visé la détermination du rendement, la composition chimique et les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle de la lavande cultivée dans de la région d'Azzaba willaya Skikda.

Les résultats obtenus indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation est de 1,50±0,2 %. La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extrait au bout des 90 premières minutes.

L'analyse de la composition chimique par analysée par GC/MS a permis d'identifier 20 composés terpéniques dont les principaux sont: Linalyl acétate (32,98 %), Linalool (28,92 %), β-caryophyllène (4.62 %), Acétate de lavandulyle (4.52 %), Z-β-ocimène (4.44%), terpinène-4-ol (4,32 %), E-β-ocimène (3.09 %) et β-farnésène (2.73 %).

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est un antibactérien naturel très efficaces et peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les infections dermiques.

Références :

Al-Bayati A.F. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinellaanisum* essential oils and methanol extracts, *Ethnopharmacology*, Vol. 116, 403-406.

Allaby M. (1992). The Concise Oxford Dictionary of Botany, Oxford University Press. y First edition., New York.

Botton B., Bertron A., Fevere M., Gauthier S., Guph D., Plarpent J., Reymond P., Sanglier J.J, Vaysser Y et Veau S. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Ed : Masson collection biotechnologies, Paris.

Bouguerra A et Zeghou K. (2009). Etude des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula stoechas* L. Mémoire d'ingénieur INATAA.

Chahboun N., Esmail A., Abed1 H., Barrahi M., Amiyare R., Berrabeh M., Oudda H et Ouhssine M. Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de *la Lavandula officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques, (2015), 1191.

Chu C.J and Kemper K.J. (2001). Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force. Boston, (2001), p 32.

Clevenger J. F. (1928). Apparatus for volatile oil determination: description of New Type Clevenger. *Am. Perf. Ess. Oil Review*, 467-503.

Gören A.C., Topçu G., Bilsela G., Bilsela M., Aydoğmus Z et Pezzuto J.M.Z. (2002). *Naturforsch*, 57c, 797-800.

Hmamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M et Bessiere J.M. (2001). Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Essential Oil Research*, Vol.13, 298-302.

Hulin A., Deguillaume A.M., Bretagne S et Bézie Y. (2005). Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives - *J Pharm Clin*, Vol.24, N°3, 125-38.

Jeovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A and Metodiev S. (2000). Seasonal depending variations of the composition and biological activities of Douglas fir (*Pseudo tsugamenzlesil*) essential oils from Bulgaria, *Scientia Pharmazeutica*, Vol. 66, 323-328.

Jianu C., Pop G., Gruia A.T and Horhat F.G. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania, *Int. J. Agric. Biol*, Vol. 15, N° 4, 772-776.

Kulevanova S., Stetkov G and Ristic M. (2000). Examination of and essential oils of *Lavandula officinalis* grown on mountain KOZJAK (MACEDONIA). *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 19 (2), 165-169.

Laib I et Barbat M. (2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*, *Revue de génie industriel*, 6, 46-54.

Meena M.R and Sethi V. (1994). Antimicrobial activity of the essential oils from spices, *Food Science and Technology*, Vol. 31, 68-70.

Mohammedi Z et Atik F. (2011). *Nature & Technologie*, 6, 34-39.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth Ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.

Ouraïni D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A et Belabbas M.A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques-Phytothérapie, Vol.1, 6-14.

Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C and Andrianoelisoa H.S, Raherimandimby M. and Danthu P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*, *Food Chemistry*, Vol. 114, 680-684.

Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L and Echeverrigaray S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria, *Food Chemistry*, Vol. 103, 823-828.

Sidi Boulenouar K et Ziane A. (2003). Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieur en biologie. Option : Biochimie. Faculté des Sciences. Univ. ABB. Tlemcen, p 54.

Sun Kim N and Sun Lee D.S. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 982, 31-47.

Svoboda K.P and Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

Verma R.S., Laiq U., Rahman S., Chandan S., Chanotiya K., Rajesh K., Chauhan A., Yadav A and Singh A. (2009). Essential oil composition of *Lavandula officinalis* cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.*, 75 (3), 343-348.

Vincent M.C. (1991). L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6.

Xianfei X., Xiaoqiang C and Shunying Z.G. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomelesspeciosa* from China, *Food Chemistry*, Vol. 100, 1312-1315.

Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A and Gharsallah N. (2011). The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia, *Lipids in Health and Disease*, Vol.10, p 161.