شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و ریزپوشانی کردن اسانس رزماری کشت شده در شیراز

محمدهادی امین‌افشار[1]، پیمان مهستی[2*]، زهرا امام جمعه[3]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار و عضو هیأت علمی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استاد و عضو هیأت علمی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، انتهای اتوبان شهید ستاری، خیابان سیمون بولیوار، میدان دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی
تلفن: ۰۹۱۲۱۳۰۸۹۲۲، نمابر: ۴۸۳۶۲۹۴۵ (۰۲۱)
پست الکترونیک: Peymanmahasti@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۸ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۵/۲۶

چکیده

مقدمه: رزماری یا اکلیل کوهی با نام علمی لاتین *Rosmarinus officinalis* L. گیاهی است متعلق به خانواده نعناییان که به دلیل ویژگی‌های ضدمیکروبی، ضداکسیدانی و ضدموتاژنیک به طور گسترده در صنایع پزشکی، دارویی و غذایی استفاده می‌شود.

هدف: در این پژوهش شناسایی و تعیین مقادیر ترکیبات تشکیل‌دهنده و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس رزماری و مشخص کردن کارایی ریزپوشانی کردن آن در پوشش کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: جهت استحصال اسانس از روش تقطیر با آب توسط کلونجر استفاده شد و پس از به دست آوردن اسانس، جداسازی ترکیبات توسط کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) و شناسایی ترکیبات توسط اندیس کوآتس و زمان بازداری انجام شد، همچنین جهت ریزپوشانی کردن در پوشش کیتوزان از روش امولسیون کردن استفاده شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس رزماری از روش رقیق‌سازی در محیط کشت جامد مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری به دست آمده از برگ‌ها و ساقه گیاه کشت شده در شیراز، ایران و برداشت شده در ماه خرداد عبارت بودند از: آلفا پینن با ۱۲/۳ درصد، ۱و۸- سینئول با ۱۲/۰۲ درصد و کامفن با ۹/۲ درصد. همچنین بازده استحصال محاسبه شده برای اسانس به دست آمده ۱/۴ درصد و کارایی ریزپوشانی کردن اسانس در پوشش کیتوزان ۳۹/۳۳ درصد محاسبه شد همچنین میزان حداقل غلظت بازدارنده از رشد اسانس رزماری در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب mg/mL ۸/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

نتیجه‌گیری: رزماری به دلیل داشتن ترکیبات ترپنی مانند آلفا پینن و لینالول در ساختار خودش دارای خواص ضدباکتری و ضداکسیدانی مناسبی می‌باشد از سوی دیگر ازدیاد مقادیر ترکیبات فعال بیولوژیکی و روغن‌های فرار آن باعث بالا رفتن بازده استحصال اسانس این گیاه می‌شود.

گل‌واژگان: رزماری، ریزپوشانی کردن، کروماتوگرافی، کیتوزان

مقدمه

روغن‌های ضروری (که روغن‌های اتری یا فرار نیز نامیده می‌شوند)، روغن‌های مایع بوداری هستند که از اجزای اصلی گیاه مثل گل، دانه، برگ، ساقه، ریشه و سرشاخه‌ها توسط روش‌های مختلفی نظیر تخمیر و تقطیر، استحصال می‌شوند [۱]. روغن‌های فرار و ترکیبات دیگر موجود در گیاه معمولاً به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی استفاده می‌شوند ولی اخیراً از خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی و ضداکسیدانی آنها نیز استفاده می‌شود. نخستین ترکیبات سازنده روغن‌های فرار، ترپنوئیدها و ترپن‌ها می‌باشند همچنین این روغن‌ها شامل هیدروکربن‌های آلیفاتیک، اسیدها، الکل‌ها، آلدهیدها و استرها می‌باشند [۲]. روغن‌های فرار در دسته مواد مجاز GRAS توسط اداره غذا و دارو آمریکا (USFDA) طبقه‌بندی می‌شوند. در اتحادیه اروپا، روغن‌های فرار با غلظت کمتر از ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز به عنوان افزودنی مجاز و ایمن شناخته می‌شوند [۳]. از آنجا که استفاده از ضداکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی به شدت مورد انتقاد قرار گرفته است، استفاده از ضداکسیدان‌های طبیعی رو به افزایش است. از میان ضداکسیدان‌های طبیعی استفاده از گیاه رزماری به عنوان نگهدارنده با توجه به خواص مفید آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴].

رزماری (*Rosmarinus officinalis*) متعلق به خانواده نعناییان گیاهی است که علاوه بر اینکه به عنوان یک طعم‌دهنده غذا استفاده می‌شود، به دلیل خواص ضدباکتری، ضداکسیدانی و ضدموتاژنیک، به عنوان عامل نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی نیز استفاده می‌شود [۵]. ترکیبات فرار موجود در اسانس‌های روغنی به عوامل محیطی نظیر نور و درجه حرارت به شدت حساس می‌باشند، لذا به منظور کنترل عوامل خارجی و درک بهتر اثرات تدریجی این ترکیبات استفاده از تکنیک‌های نوینی مانند روش ریزپوشانی کردن توصیه می‌شود [۶].

ریزپوشانی کردن شامل پوشش دادن و یا محصور کردن یک ماده مفید (جزء فعال) در داخل یک ماده ثانویه (پوسته یا دیواره) برای جلوگیری و یا به تأخیر انداختن رهاسازی ماده مفید تا یک زمان و مکان مشخص و یا دست یافتن به مجموعه‌ای از شرایط مناسب است [۷]. توسط این روش مواد فعال زیستی در طول فرآیند و نگهداری تا زمان رسیدن به محل آزاد شدن و همچنین از فرآیندهای تخریبی مانند اکسیداسیون و هیدرولیز قابل حفاظت شدن هستند. این تکنیک همچنین سدی بین مواد فعال زیستی حساس و محیط فراهم می‌کند تا طعم و مزه مناسب احساس شده و عطر و طعم نامطلوب، پوشانده شود و در اختیار بودن زیستی مواد در زمان و مکان مناسب، تأمین شود. در برخی موارد، مواد فعال زیستی با سایر مواد موجود در محصول غذایی واکنش‌های ناخواسته می‌دهند که در این موارد و همچنین در مواردی که هدف، دستیابی به غلظت مناسب و پراکنده شدن یکنواخت ماده فعال باشد، از روش ریزپوشانی کردن استفاده می‌شود [۶]. در این روش شیمیایی از هیدروکلوئیدهایی مثل آلژینات، کاراگینان و کیتوزان و ... به عنوان مواد دیواره استفاده می‌کنند [۸].

کیتوزان بیوپلیمری است که با توجه به خواص آن، بسیار مورد توجه می‌باشد. کیتوزان پلی‌ساکاریدی خطی است با واحدهای تکرار شونده (۱ به ۴) - ۲- دئوکسی-۲- استوآمید و β-D- گلوکز که در آب نامحلول می‌باشد و از دی‌استیلاسیون کیتین به دست می‌آید. این ترکیب غیرسمی، فعال زیستی و زیست تخریب‌پذیر می‌باشد. کیتوزان به دلیل داشتن خواص ضدمیکروبی و جذب فلزات سنگین، می‌تواند به عنوان پوشش برای مواد غذایی زیستی و مفید استفاده شود [۹]. از ترکیبات و فیلم‌های ضدمیکروبی مجاز و پوشش‌هایی که در تماس مستقیم با مواد غذایی هستند به عنوان یک روش و تکنولوژی نوین که قادر به افزایش ایمنی و مدت زمان ماندگاری محصولات غذایی می‌باشد، یاد می‌شود [۱۱، ۱۰].

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه

گیاه رزماری موردنیاز در ماه خرداد از شیراز تهیه شد و در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران از لحاظ گونه و نام علمی مورد تأیید قرار گرفت. به منظور اسانس‌گیری، قسمت‌های هوازی گیاه یعنی برگ‌ها و ساقه برای مدت کوتاهی جهت از بین بردن گرد و خاک چسبیده به آن در معرض جریان آب

قرار گرفت و سپس به مدت ۲ روز در دمای اتاق خشک شدند. در نهایت جهت حصول اطمینان از رسیدن رطوبت به حداقل ممکن جهت بررسی درصد بازدهی استحصال اسانس، گیاه خشک شده به مدت چند ساعت در داخل آون با دمای ثابت ۳۳ درجه سلسیوس قرار گرفت [۱۲].

استخراج اسانس

به منظور استخراج اسانس رزماری از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر (ساخت شرکت Heidolph آلمان مدل laborota 4003) استفاده شد. به این منظور ۱۰۰ گرم از گیاه خرد شده را در بالن ۲۰۰۰ میلی‌لیتر ریخته و به آن حدود ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و عمل استخراج اسانس در مدت زمان ۳ ساعت انجام پذیرفت. در این مدت ترکیبات فرار همراه با بخار آب خارج شده و پس از سرد شدن به صورت لایه‌ای متمایز بر روی سطح آب در لوله مدرج دستگاه کلونجر قابل مشاهده بودند. برای جمع‌آوری اسانس، شیر مربوط به لوله مندرج را باز کرده و پس از خروج آب‌های اضافی از لوله، اسانس در ظرف جداگانه‌ای جمع‌آوری شد. جهت جلوگیری از تجزیه اسانس بوسیله نور و حرارت، از ظروف شیشه‌ای و تیره رنگ استریل به منظور نگهداری اسانس استفاده شد [۱۳].

تولید پوشش کیتوزان و ریزپوشانی کردن اسانس در آن

در این مطالعه از کیتوزان خریداری شده از شرکت Acros با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰ دالتون استفاده شد. جهت تهیه محلول کیتوزان ابتدا محلول ۱ درصد حجمی - حجمی اسید استیک را تهیه و سپس ۲ گرم کیتوزان به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محلول اضافه شد و در ۴۰ درجه سلسیوس عمل همزدن به آرامی روی همزن مغناطیسی (ساخت شرکت Snijder با مدل 34533) انجام شد تا کیتوزان به طور کامل حل شود. پس از ۳ ساعت کیتوزان به طور کامل در اسید استیک حل شد (که برای بهبود فرآیند انحلال ابتدا کیتوزان را در ظرف موردنظر ریخته سپس کم کم محلول یک درصد حجمی- حجمی اسید استیک را به آن اضافه می‌کنیم به طوری که خوب مخلوط شوند و محلول قهوه‌ای کم‌رنگی حاصل شود). در این مرحله گلیسرول به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان (یعنی ۱ میلی‌لیتر برای ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول یک درصد حجمی - حجمی اسید استیک) به عنوان نرم‌کننده افزوده شد و از توئین ۸۰ به میزان ۰/۰۲ درصد به عنوان امولسیفایر استفاده شد. پس از آن، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس عمل همزدن به آرامی به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت تا امولسیفایر به طور یکنواخت در داخل محلول پخش شود [۱۴]. پس از آن محلول فوق توسط روش امولسیون و به کمک همزن اولتراسونیک با قدرت ۱۶۰ وات، پالس ۱۵ ثانیه به ۷ ثانیه روشن به خاموش به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط می‌شود تا کپسول‌ها تهیه شوند (لازم به ذکر است که برخی اصلاحات بر روی شرایط همزن اولتراسونیک در حین کار انجام شد) [۱۵]. در نهایت محلول تهیه شده توسط خشک‌کن فریزری (Freeze Drier) (ساخت شرکت CHRIST آلمان مدل Alpha 1,4 LD plus)، خشک و در ظرف‌های مناسب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. شرایط اعمال شده توسط دستگاه خشک کن فریزری عبارت بود از: برودت ایجاد شده در دمای ۵۵ درجه سلسیوس زیر صفر و فشار خلأ ۰/۰۵ بار.

بررسی مورفولوژی ذرات ریزپوشانی شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Scanning Electron (SEM) Microscopy

جهت بررسی مورفولوژی ذرات ریزپوشانی شده از میکروسکوپ الکترونی ساخت شرکت KYKY مدل EM-3200 استفاده شد. روش کار میکروسکوپ الکترونی روبشی تابش پرتو الکترونی به نمونه می‌باشد [۱۵].

کارایی ریزپوشانی کردن ((Encapsulation Efficiency (EE))

اندازه‌گیری کارایی ریزپوشانی کردن اسانس با تقطیر ۱۰ گرم پودر ریزپوشانی شده به مدت ۳ ساعت در دستگاه کلونجر انجام شد. برای استخراج اسانس روغنی از آب، از دی اتیل اتر استفاده شد و پس از تبخیر حلال در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، روغن به دست آمده

توزین شد و کارایی طبق فرمول مقدار اسانس ریزپوشانی شده/ مقدار کل اسانس محاسبه شد [۱۶].

بازده استحصال اسانس

جهت به دست آوردن بازده استحصال اسانس، ظروف شیشه‌ای موردنظر را بعد از شست و شو و خشک کردن توزین و پس از جمع‌آوری اسانس، وزن شیشه مذکور را که محتوی اسانس است، توزین کرده و پس از کسر نمودن وزن شیشه خالی، وزن اسانس حاصل محاسبه شد و به این ترتیب، بازده استحصال اسانس به درصد محاسبه شد [۱۷].

جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس رزماری

از آنجایی که ترکیبات موجود در روغن‌های اسانسی به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت به عنوان مواد فرار شناخته می‌شوند از این رو، عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله روغن‌های اسانسی به دست آمده از رزماری توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)) انجام شد. رزماری توسط حلال هگزان نرمال به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق و به دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی، تزریق شد [۱۸]. به این منظور از دستگاه کروماتوگرافی با مدل HP-5890 شرکت Hewllet Packard آمریکا، دارای ستون HP-5MS (5% methyl silicon-cross link) با ابعاد ستون ۵۰ متر طول، ۰/۲۰ میلی‌متر قطر، ۰/۲۵ میکرون ضخامت فیلم استفاده شد. برنامه دمایی ستون به صورت دمای اولیه معادل ۱۰۰ درجه سلسیوس، دمای نهایی معادل ۲۵۰ درجه سلسیوس، با گرادیان دمایی ۴ °C/min، محل تزریق نمونه Split/Split less (نسبت ۱ به ۲۰)، دمای محل تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس و گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹۹۹ درصد با شدت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه بود. مدل دستگاه طیف‌سنج جرمی مدل HP-5970 شرکت Hewllet Packard آمریکا استفاده شد. برای دستگاه طیف‌سنجی جرمی از دستگاهی با انرژی یونیزاسیون دستگاه ۷۰ الکترون ولت، دمای محفظه یونش ۲۵۰ درجه سلسیوس، تجزیه‌گر جرمی کوآدروپل و دمای تجزیه‌گر جرمی ۱۸۰ درجه سلسیوس استفاده شد. در نهایت با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری، اندیس کوآتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه‌ای، طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس شناسایی شدند.

اندیس کوآتس

اندیس کوآتس ((Kovats Index (KI) اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط اروین کوآتس به عنوان یک پارامتر برای شناسایی مواد حل شده با استفاده از کروماتوگرام‌ها تعریف شد. اندیس بازداری کوآتس هر ترکیب را می‌توان از کروماتوگرام مخلوطی از چند جسم مورد نظر با حداقل ۲ آلکان نرمال که زمان بازداری آنها در ۲ طرف زمان بازداری ماده موردنظر قرار دارد، محاسبه نمود. آلکان‌های نرمال استانداردهایی هستند که درجه‌بندی اندیس کوآتس بر آنها نهاده شده است و بنابر تعریف اندیس بازداری کوآتس یک آلکان نرمال، ۱۰۰ برابر تعداد کربن‌های موجود در آن است. اندیس بازداری کوآتس به طریقه زیر محاسبه شد:

$$KI=100n+100(Tx-Tn/Tn+1-Tn)$$

Tx: زمان بازداری نمونه مجهول، Tn: زمان بازداری آلکان نرمال قبلی، Tn+1: زمان بازداری آلکان نرمال بعدی،

KI: شاخص بازداری کوآتس، n: تعداد اتم کربن آلکان نرمال قبلی

آماده‌سازی میکروارگانیسم‌ها

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین بیست و چهار ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار نوترینت آگار تلقیح انجام شد، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شست و شو و سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد [۱۹]. برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از ATCC 29213،

برای باکتری اشریشیاکلی از ATCC 8739 استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد توسط اسانس رزماری

با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط کشت جامد (Agar dilution) انجام گرفت. برای اندازه‌گیری MIC برای هر عصاره، رقت ۱ تا ۵ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) از اسانس رزماری با دی متیل سولفواکسید ۱۰ درصد آماده شد و بوسیله عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آن به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت آگار برای دو باکتری استافیلوکوکوس ارئوس و اشرشیاکلای اضافه شد و روی شیکر لوله قرار داده شد و بعد از همگن شدن، در داخل پلیت‌ها ریخته و اجازه می‌دهیم تا محیط کشت بسته شود. سپس تلقیح با روش نقطه‌گذاری که ۱ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند توسط میکروپیپت به مرکز پلیت انتقال داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه زمان داده شد، سپس پلیت‌های حاوی استافیلوکوکوس و اشرشیاکلی به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. بررسی رشد و عدم رشد نمونه‌ها با شاهد صورت گرفته شد. در آزمایش‌های MIC برای کنترل مثبت از میکروارگانیسم بدون حضور ترکیب ضدمیکروبی و از دی متیل سولفواکسید برای کنترل منفی استفاده شده [۲۰].

نتایج

کارایی ریزپوشانی کردن

کارایی ریزپوشانی اسانس رزماری در پوشش کیتوزان برابر با ۳۹/۳۳ درصد بود.

بازده استحصال اسانس

پس از استخراج اسانس، وزن اسانس خالص و بدون آب به دقت محاسبه شد و با توجه به مقادیر گیاه اولیه و ظرف شیشه‌ای، بازده وزنی- وزنی استخراج اسانس برابر با ۱/۴ درصد درصد محاسبه شد.

شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

بعد از تزریق اسانس به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی، با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری (Retention Index) و ضرایب کوآتس برای ترکیبات محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص‌های مرجع، طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده اسانس، شناسایی شدند. جدول شماره ۱ درصد فراوانی هر یک از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس را به همراه شاخص بازداری و ضریب کوآتس آنها را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، میزان، شاخص بازداری و اندیس کوآتس

شماره (ترتیب خروج)	نام ترکیب	مقدار (درصد)	اندیس کواتس	زمان بازداری (دقیقه)	رتبه (در کل)
۱	Tricyclene	۰/۶۵	۹۲۷	۷/۸۶	۲۴
۲	α-Pinene	۱۲/۳	۹۳۹	۸/۱۴	۱
۳	Camphene	۹/۲	۹۴۵	۸/۱۵	۳
۴	Verbenene	۰/۵۵	۹۶۸	۸/۵۸	۲۶
۵	Octen-3-ol	۲/۵۸	۹۷۹	۸/۸۴	۱۳
۶	3-Octanone	۰/۹۹	۹۸۴	۹/۰۵	۲۱
۷	Myrcene	۰/۹۱	۹۹۱	۹/۱۸	۲۲
۸	α-Phellandrene	۱/۸۷	۱۰۰۳	۹/۶۵	۱۵
۹	α-Terpinene	۰/۴۹	۱۰۱۷	۹/۹۲	۲۷
۱۰	β-Cymene	۱/۰۱	۱۰۲۵	۱۰/۱۰	۲۰
۱۱	Limonene	۸/۱	۱۰۲۹	۱۰/۲۳	۴
۱۲	1,8-Cineole	۱۲/۰۲	۱۰۳۱	۱۰/۳۶	۲

ادامه جدول شماره ۱-

شماره (ترتیب خروج)	نام ترکیب	مقدار (درصد)	اندیس کواتس	زمان بازداری (دقیقه)	رتبه (در کل)
۱۳	(E)-β-Ocimene	۰/۷۵	۱۰۵۰	۱۰/۸۵	۲۳
۱۴	n. i.	۰/۱۷		۱۱/۱۱	۳۰
۱۵	Linalool	۱/۰۴	۱۰۹۷	۱۱/۶۶	۱۹
۱۶	n. i.	۰/۳۲		۱۲/۳۷	۲۸
۱۷	Camphore	۷/۱۲	۱۱۴۶	۱۳/۰۸	۵
۱۸	Borneol	۶/۱	۱۱۶۹	۱۳/۵۱	۷
۱۹	Terpinen-4-ol	۱/۳	۱۱۷۷	۱۳/۶۶	۱۶
۲۰	α-Terpineol	۳/۷۱	۱۱۸۹	۱۳/۹۳	۹
۲۱	n. i.	۲/۱۷		۱۴/۱۷	۱۴
۲۲	Verbenone	۵/۲	۱۲۰۵	۱۴/۵۳	۸
۲۳	Linalyl acetate	۲/۷۶	۱۲۵۷	۱۵/۱۵	۱۲
۲۴	n. i.	۰/۶۳		۱۵/۶۶	۲۵
۲۵	Bornyl acetate	۶/۱۷	۱۲۸۹	۱۵/۹۱	۶
۲۶	n. i.	۱/۱		۱۶/۷۹	۱۸
۲۷	(E)-Caryophyllene	۲/۹۳	۱۴۱۹	۱۸/۸۱	۱۰
۲۸	Neryl acetate	۰/۲۱	۱۴۳۶	۱۸/۹۲	۲۹
۲۹	4-terpineol	۲/۸۷	۱۴۴۱	۱۹/۱۳	۱۱
۳۰	α-Humulene	۰/۱۵	۱۴۵۵	۱۹/۴۵	۳۱
۳۱	n. i.	۱/۲		۱۹/۸۹	۱۷

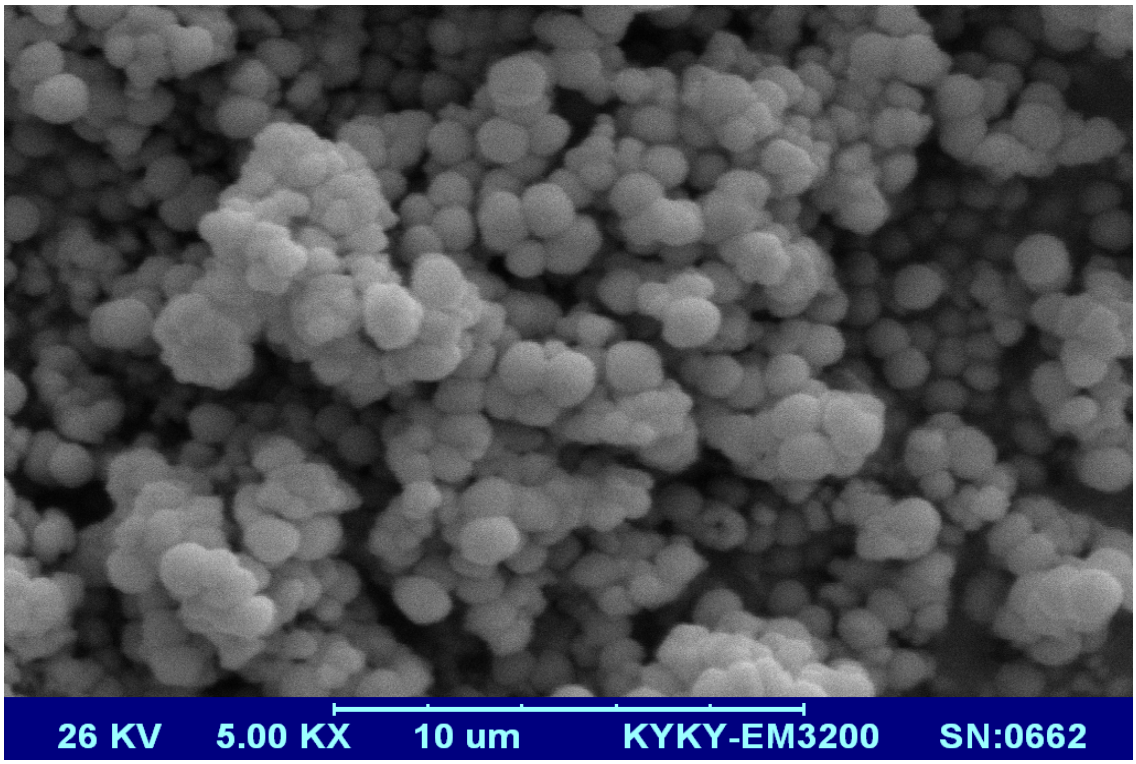
تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد توسط اسانس رزماری

میزان حداقل غلظت بازدارنده از رشد اسانس رزماری در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب با ۸/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

بحث

بحث کارایی ریزپوشانی کردن

به طورکلی این دیدگاه وجود دارد که پایداری ترکیبات با افزایش کارایی، افزایش می‌یابد و برای دستیابی به شرایط بهینه باید تا حد امکان سعی در افزایش کارایی ریزپوشانی کردن نمود [۲۱]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نوع دیواره و هسته، ویژگی‌های امولسیون، شرایط نگهداری امولسیون تشکیل شده و پارامترهای خشک کردن، همه بر کارایی ریزپوشانی کردن اثر می‌گذارند [۲۴ – ۲۲]. طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، کارایی ریزپوشانی کردن ماده در پوشش طبق روش امولسیون بررسی شده و در تیمارهای مختلف برابر با ۶۹ تا ۷۷ درصد به دست آمد [۲۵] که با تحقیق حاضر متفاوت بود همچنین در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، کارایی ریزپوشانی کردن ترکیبات دارویی در پوشش کیتوزان با روش امولسیون سازی بسیار بالا و در گستره ۵۲/۲ تا ۸۰/۱ درصد برای تیمارهای مختلف به دست آمد [۲۶]. طبق نتایج به دست آمده می‌توان اینگونه بیان نمود که ریزپوشانی کردن در پوشش کیتوزان (شکل شماره ۱) توسط روش امولسیون از نظر کارایی نسبتاً موفقیت‌آمیز بوده و بهتر است از این روش‌های در تکنیک ریزپوشانی کردن بهره گرفته شود. از سوی دیگر پایین بودن کارایی ریزپوشانی کردن در این پژوهش را می‌توان به عدم استفاده از ترکیب ایجادکننده پیوند عرضی‌تری سدیم پلی فسفات (Sodium Tri Poly Phosphate (TPP)) مرتبط دانست.



شکل شماره ۱- تصویر SEM کپسول‌های تشکیل شده از پوشش کیتوزان و محتوی اسانس رزماری

بحث بازده استحصال اسانس

روغن‌های فرار یا اسانس‌ها از نظر مقدار و ترکیب‌های سازنده تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و درونی هستند. این پدیده از نظر مقدار تولید اسانس حائز اهمیت است [۲۷]. این نکته با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق و مقایسه آن با دیگر پژوهش‌ها همخوانی دارد و اختلافات موجود در نتایج تحقیقات سایر دانشمندان در میزان اسانس استحصال شده تأییدی بر این مطلب می‌باشد. درصد اسانس استحصال شده از گیاه رزماری کشت شده در الجزایر ۰/۸۲ درصد گزارش شده [۲۸] و یا می‌توان به یافته‌های تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ انجام شد و درصد استحصال اسانس در کرمان را ۳/۲ درصد اعلام کردند، استناد کرد [۲۹]. پژوهشی دیگر در اصفهان انجام شد و میزان استحصال اسانس را ۱/۶ درصد گزارش کرد [۳۰].

تصور ارتباطی منطقی میان پاره‌ای از عوامل مذکور و مقدار و نوع اسانس موجود در بسیاری از موارد قابل قبول است ولی در برخی موارد نیز، چنین باوری را با تردید می‌توان بیان کرد. عوامل بیرونی مانند دما، رطوبت، نور، موقعیت جغرافیایی، خاک و غیره در میزان اسانس تولیدی در گیاه اثر دارند اما ذکر این نکته نیز ضروری است که روشن شدن تأثیر عوامل محیطی، چیزی را از نقش عوامل ژنتیکی که خود نیز ممکن است تحت تأثیر محیط قرار بگیرند، کم نمی‌کند [۲۷].

لازم به ذکر است که در تمامی تحقیقات بیان شده فوق، روش مورد استفاده برای استحصال اسانس، روش تقطیر با آب بوده است. تحقیقات مختلف انجام شده بر روی روش‌های مختلف استخراج و تحقیق به منظور بهینه‌سازی در اغلب موارد بر مزایای این روش تاکید دارند و از طرف دیگر، سهولت و در دسترس بودن، نیاز به امکانات ساده و همچنین بالاترین بازدهی استخراج اسانس در این روش به دست می‌آید. علت انتخاب این روش نیز، تأکید مطالعات انجام شده در گذشته بر نکات مثبت روش مذکور است.

بحث شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

با بررسی و مطالعه کروماتوگرام و طیف‌های جرمی حاصل از دستگاه کروماتوگرافی گازی دارای طیف‌سنج جرمی،

ترکیبات موجود در روغن اسانسی رزماری به دست آمد و در جدول نوشته شد. با مطالعه این داده‌ها و بررسی درصد ترکیبات حاصل می‌توان گفت که به ترتیب بیشترین درصد را آلفا- پینن (α-Pinene) (۱۲/۳ درصد)، ۱ و ۸- سینئول (1,8-cineole) (۱۲/۰۲ درصد) و کامفن (Camphene) (۹/۲ درصد) دارند، این در حالی است که نتایج تحقیقات مختلف در نقاط جغرافیایی مختلف بیانگر این مطلب بوده است که رشد گیاه در مناطق گوناگون، شرایط آب و هوایی و اندام‌های مختلف گیاه در جزئیات تشکیل‌دهنده عصاره مهم است. در تحقیقی که توسط محققین ایرانی بر رزماری ایرانی کشت شده در شمال ایران انجام شده بود، فراوان‌ترین ترکیبات عصاره رزماری ۱ و ۸- سینئول (۲۳/۴۷ درصد)، آلفا- پینن (۲۱/۷۴ درصد)، وربنون (Verbenone) (۷/۵۷ درصد)، کامفور (Camphore) (۷/۲۱ درصد) و ائوکالیپتول (Eo-calypthol) (۴/۴۹ درصد) گزارش شده است [۳۱]. نتایج حاصل از پژوهشی دیگر توسط مقتدر و افضلی (۲۰۰۹) بیان داشت که در شهر کرمان، ۴۱ ترکیب را از دستگاه کرواتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی دریافت کردند که بیشترین درصد ترکیبات آنها آلفا- پینن (۱۵/۵۲ درصد)، کامفور (۱۱/۶۶ درصد) و وربنون (۱۱/۱۰ درصد) بودند. طبق گزارشی دیگر در سال ۲۰۰۷، از بین ۴۹ ترکیب شناسایی شده از عصاره گیاه رزماری کشت شده در فلوریدا، ترکیب ترپنوئیدی کامفور بالاترین مقدار را داشته است [۳۲]. دجدی (Djeddi) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تحقیق خود با به دست آوردن ۳۴ ترکیب در نتیجه آنالیز اسانس رزماری حاصل از رزماری‌های کشت شده در الجزایر، کامفور (۱۴/۶ درصد)، ۱ و ۸- سینئول (۱۲/۲ درصد) و بتا- کاریوفیلن (β-Caryophyllene) (۱۰/۹ درصد) را به عنوان بیشترین درصد ترکیبات در اسانس مذکور بیان داشتند. در تحقیقی دیگر از بین ۲۲ ترکیب شناسایی شده از عصاره رزماری کشت شده در چین ترکیبات ۱و ۸- سینئول (۲۶/۵۴ درصد) و آلفا- پینن (۲۰/۱۴ درصد) را به عنوان فراوان‌ترین ترکیبات گزارش نمودند [۳۳].

ترکیب اسانس در مناطق مختلف اکولوژیکی یکسان نیست. مواد تشکیل‌دهنده اندام‌های یک گیاه در زمان‌های مختلف بسیار متفاوت می‌باشد و باید در زمان مناسب اندامی که دارای بیشترین میزان ماده مؤثره است را جمع‌آوری کرد. از جمله عوامل مهمی که در میزان مواد مؤثره گیاهان نقش دارد و می‌بایستی در هنگام جمع‌آوری گیاهان بویژه دارویی و معطر مورد توجه قرار گیرند، زمان برداشت مناسب است [۲۷].

با بررسی این داده‌ها می‌توان به علت تفاوت ترکیبات به دست آمده پی برد. البته با مقایسه مطالعات مختلف، شباهت بیشتر بین نمونه‌های کشت شده در ایران با نمونه الجزایری مشهودتر است. در هر حال، با توجه به این تفاوت‌ها، مقایسه شیمیایی ترکیبات متشکله اسانس در کنار آزمون‌های میکروبی، امری واجب به نظر می‌رسد.

بحث تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد توسط اسانس رزماری

اصولاً اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه دارای ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشند و برای این منظور بسیار مؤثر و مفید می‌باشند. مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص ضدمیکروبی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل است. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی این خواص، منابع تهیه آنها، شرایط کشت گیاه، سویه‌های مختلف میکروبی و حتی غلظت‌های متفاوتی از قارچ یا باکتری که به عنوان مایه تلقیح به کار می‌روند، اشاره کرد [۳۴]. درباره سازوکار اثر اسانس‌ها روی ریز زنده‌ها نظرات مختلفی مطرح است. با توجه به گروه‌های شیمیایی متعدد در اجزای تشکیل‌دهنده اسانس‌ها، احتمالاً فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها به یک سازوکار ختم نمی‌شود و این مواد هدف‌های متعددی را در سلول تحت تأثیر قرار می‌دهند. اصولاً اسانس‌ها ماهیت روغنی و آبگریزی (Hydrophobic) دارند و همین موضوع به آنها کمک می‌کند تا در غشا و میتوکندری سلول نفوذ کنند و آنها را نفوذپذیر کنند و در نتیجه، نقل و انتقال یون‌ها با اختلال مواجه می‌شود و خروج و نشت محتویات سلولی اتفاق می‌افتد و در نهایت، مرگ سلولی رخ می‌دهد. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی

یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد [۲]. به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی‌باکتریال آنها علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود که برخی از این ترکیبات شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول می‌باشند. احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند سایر ترکیبات فنولی شامل مواردی نظیر اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، برهم‌زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می‌باشد. ساختار شیمیایی یک اسانس بر مکانیسم آن اثر می‌گذارد به طوری که اهمیت حضور گروه هیدروکسیل در ترکیب فنولی مانند کارواکرول و تیمول به تأیید رسیده است [۳۵، ۲]. به علاوه پیش از این نیز، خاصیت ضد میکروبی ماده لینالول ثابت شده است. بنابراین لینالول موجود در اسانس رزماری مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند دلیل دیگری برای از بین رفتن باکتری‌ها در این تحقیق باشد. لینالول در گروه الکل‌های آلیفاتیک (Alyphatic) قرار دارد و محققین ویژگی ضدمیکروبی آن را مرتبط با وجود گروه هیدروکسیل در ساختمان آن می‌دانند [۳۷، ۳۶]. همچنین در اغلب مطالعات انجام شده درخصوص اثر اسانس‌های گیاهی بر روی میکروارگانیزم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های غذایی نشان می‌دهد که اثر این گونه اسانس‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اثر ضدباکتری آنها بر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر است. شاید علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی، وجود غشای خارجی در این نوع باکتری‌ها می‌باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزای هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوپلی ساکارید می‌شود [۲]. مقاومت بیشتر باکتری گرم منفی اشرشیاکلای نسبت به گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، به دلیل وجود غشاء دو لایه و پیچیده‌تر در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد باکتری‌های گرم مثبت در دیواره‌شان فقط لایه‌ی پپتیدوگلیکان ضخیم وجود دارد. برعکس، باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه‌ی پپتیدوگلیکان داخلی دارای لایه‌ی خارجی از جنس لیپوپروتئین، فسفوپروتئین و پروتئین در دیواره خود هستند و همین موضوع موجب کمتر شدن اثر عصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی می‌شود [۳۸].

نتیجه‌گیری

رزماری به دلیل داشتن ترکیبات ترپنی و حلقوی در ساختار خودش دارای خواص ضدباکتری و ضداکسیدانی مناسبی می‌باشد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در ساختار رزماری در این تحقیق عبارت بودند از آلفا پینن، ۱ و ۸ سینئول و کامفن که همگی جزو ترکیبات ترپنی می‌باشند. یکی دیگر از مزایای رزماری، زیاد بودن مقادیر ترکیبات فعال بیولوژیکی و روغن‌های فرار آن بوده که باعث بالا رفتن بازده استحصال اسانس آن می‌شود.

تشکر و قدردانی

از صنایع غذایی ابتهاج، آقای محمد رضوانی، خانم مهندس پوروطن‌دوست و سرکار خانم مریم هدایت که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Pavelková A, Kačániová M, Horská E, Rovná K, Hleba L and Petrová J. The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. *Anaerobe* 2014; 29: 128 - 33.

2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiol*. 2004; 94 (3): 223 - 53 .

3. Anonymous. Available at: Scientific opinion of the panel on the use of oregano and lemon balm extracts as a food additive. *EFSA Journal* 2010; 8 (2): 1514.

4. Peng Y, Yuan J, Liu F and Ye J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 39 (3): 431 - 37.

5. Oluwatuyi M, Kaatz GW and Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus officinalis. *Phytochem*. 2004; 65 (24): 3249 - 54.

6. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S and Bugarski, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci*. 2011; 1: 1806 - 15.

7. Kailasapathy K and Lam S. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy J*. 2005; 15 (6): 929 - 39.

8. Burgain J, Gaiani C, Linder M and Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 2011; 104 (4): 467 - 83.

9. Elsabee MZ and Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering C*. 2013; 33 (4): 1819 - 41.

10. Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi SMA, Yasaghi SAS and Hasansaraei AG. Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 2008; 8 (16): 2895 - 900.

11. Fernández-Pan I, Royo M and Ignacio Maté J. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *Journal of Food Sci*. 2012; 77 (7): 383 - 90.

12. Ghadami F. The effect of antimicrobial coating of chitosan and thyme oils in increasing the shelf life of chicken fillets. Master thesis of food engineering. College of Agriculture and Natural Resources of Tehran University. 2011.

13. SamsamShariat H. Extraction and extracting active ingredients from medicinal plants and methods of identifying and evaluating them. Mani Publications. 1994, pp: 293.

14. Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH and Hosseini SMH. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem*. 2010; 120 (1): 193 - 8.

15. Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M and Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 2013; 95 (1): 50 - 6.

16. Dima C, Cotârlet M, Alexe P and Dima S. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2014; 22: 203 - 11.

17. Maleki Douzzadeh M, Khadivparsi P, Rezazadeh Sh, Abolghasemi H and Piralihamedani M. Review process of extracting volatile oils of rosemary plant distillation of water. *Journal of Medicinal Plants* 2007; 24: 101 - 10.

18. Li XM, Tian SL, Pang ZC, Shi JY, Feng ZS and Zhang YM. Extraction of Cuminum cyminum essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chem*. 2009; 115 (3): 1114 - 9.

19. Valero M and Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International Journal Food Microbiol*. 2007; 85 (1): 73 - 81.

20. Collins CH. Microbiological methods. Microbiological methods. 1964.

21. Drusch S and Berg S. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem*. 2008; 109 (1): 17 - 24.

22. Baik MY, Suhendro E, Nawar W, McClements D, Decker and Chinachoti P. Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *Journal of the*

American Oil Chemists' Society 2004; 81 (4): 355 - 60.

23. Jafari SM, He Y and Bhandari B. Role of powder particle size on the encapsulation efficiency of oils during spray drying. *Drying Technol.* 2007; 25 (6): 1081 - 89.

24. Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker EA and McClements DJ. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International* 2006; 39 (4): 449 - 57.

25. Cilek B, Luca A, Hasirci V, Sahin S and Sumnu G. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technol*. 2012; 235 (4): 587 - 96.

26. Ajun W, Yan S, Li G and Huili L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 2009; 75 (4): 566 - 74.

27. Ebrahiminejad S. Study and identify compounds essential oils of *Ziziphora clinopodioides, Stachys schschegleevii, Salvia sahendica* and *Stentonia nudicalu* and biological properties of essential oils and various extracts. Master thesis of chemistry engineering. Medicinal Plants and Drugs Research Institute. Shahid Beheshti University. 2004.

28. Djeddi S, Bouchenah N, Settar I and Skaltsa HD. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 2007; 43 (4): 487 - 90.

29. Moghtader M and Afzali D. Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sci.* 2009; 5 (3): 393 - 7.

30. Ghanadi AR, Sajjadi A and Almoslemi MAM. Phytochemical study of flavonoids and volatile oils of rosemary plants cultivated in Iran. *Medical Journal of Ahvaz* 2002; 34: 33 - 40.

31. Jalali-Heravi M, Moazeni RS and Sereshti H. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218 (18): 2569 - 76.

32. Quinn BP, Bernier UR and Booth MM. Identification of compounds from Etonia rosemary (Conradina etonia). *Journal of Chromatography A*. 2007; 1160 (1): 306 - 10.

33. Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ and Liu XL. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacol*. 2011; 32 (1): 63 - 8.

34. Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei and Shigella flexneri*. *Food Microbiol*. 2004; 21: 33 - 42.

35. Tajkarim MM, Ibrahim SA and Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 2010; 21: 1188 - 99.

36. Liu XM, Tian SL, Pang ZC, Shi JY, Feng ZS and Zhang YM. Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chem*. 2009; 115 (3): 1114 - 9.

37. Shan B, Cai YZ, Brooks JD and Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiol*. 2007; 117: 112 - 9.

38. Shahnia M and Khaksar R. Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technol*. 2013; 7 (5): 949 - 55.