

基于 SPME 结合 GC-MS 法测定霉变烟叶中挥发性成分的研究

莫 峰, 杨丽莉, 周 鹏, 黄纲临, 徐 勇, 王勇军, 周 萍, 李 萌 (红云红河烟草(集团)有限责任公司, 云南昆明 650231)

摘要 [目的]采用 SPME 富集霉变烟叶的挥发性成分,再用 GC-MS 对挥发性成分进行分离和鉴定,建立测定霉变烟叶挥发性代谢成分的方法。[方法]对影响 SPME 的因素(萃取头种类、萃取温度、萃取时间和解吸附时间)进行了优化,得到较优的萃取条件,并对方法的重现性进行考察;在上述条件下对样品进行测定,并对所筛选出的挥发性成分进行主成分和聚类分析。[结果]较优的萃取条件:采用固定相为 75 μm Carboxen-PDMS 涂层的黑头萃取头,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取样品 50 min,萃取头在气相色谱进样口的解吸附时间为 2 min。方法的重现性考察显示,6 次测定结果的 RSD 值小于 20%,说明所建立方法具有较好的重现性,满足霉变烟叶中挥发性成分的测定要求。在上述条件下对样品进行测定,从样品中鉴别出醇类、酯类、酮类和醛类等挥发性成分,霉变烟叶与正常烟叶有 8 种化合物具有明显差别,分别是 5-甲基-2-咪唑甲醇、1-辛烯-3-醇、苯甲醇、1,2-二甲氧基-苯、2,4-二氯-1-甲氧基-苯、5-甲氧基-6,7-二甲基-苯并咪唑、十六酸甲酯和十六酸。对所筛选出的 8 种挥发性成分的主成分和聚类分析结果表明,所筛选出的 8 种挥发性成分可作为烟叶霉变的标记成分。[结论]该方法的开发为烟叶早期霉变的识别及有效预防提供借鉴。

关键词 烟叶;霉变;挥发性成分;固相微萃取;气相色谱-质谱

中图分类号 TS41⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)03-0188-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2023.03.043

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the Determination of Volatile Components in Mildew Tobacco Leaves Based on SPME Combined with GC-MS Method

MO Zheng, YANG Li-li, ZHOU Peng et al (Hongyun Honghe Tobacco (Group) Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650231)

Abstract [Objective] The volatile components of mouldy tobacco leaves were enriched by SPME, and then separated and identified by GC-MS to establish a method for determining the volatile metabolic components of mouldy tobacco leaves. [Method] The factors affecting SPME (extraction head type, extraction temperature, extraction time and desorption time) were optimized to obtain better extraction conditions, and the reproducibility of the method was investigated; under the above conditions, the samples were determined, and the selected volatile components were subject to principal component and cluster analysis. [Result] Optimum extraction conditions: 75 μm Carboxen-PDMS for stationary phase coated black head extraction head, the sample was extracted at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 50 min, and the desorption time of the extraction head at the gas chromatography sample inlet was 2 min. The reproducibility of the method showed that the RSD value of six determinations was less than 20%, indicating that the established method had good reproducibility and met the requirements for the determination of volatile components in moldy tobacco leaves. The samples were determined under the above conditions, and the volatile components such as alcohols, esters, ketones and aldehydes were identified from the samples. There were 8 compounds in moldy tobacco leaves that were significantly different from normal tobacco leaves, namely 5-methyl-2-furan methanol, 1-octene-3-ol, benzyl alcohol, 1,2-dimethoxy-benzene, 2,4-dichloro-1-methoxy-benzene, 5-methoxy-6,7-dimethyl-benzofuran, methyl hexadecate and hexadecanoic acid. The results of principal component analysis and cluster analysis of the eight volatile components showed that the eight volatile components could be used as the marker components of tobacco mildew. [Conclusion] The development of this method can provide reference for identification and effective prevention of tobacco early mildew.

Key words Tobacco leaves; Mildew; Volatile component; Solid phase microextraction (SPME); GC-MS

烟叶在储存过程中受微生物、温度和湿度等影响极易发生霉变。烟叶霉变使其色泽变暗,香气遗失,吃味变差,刺激性增大,使用价值降低甚至丧失,给烟草加工企业造成经济损失^[1],早期烟叶霉变的快速识别已成为烟草行业亟待解决的关键问题。目前霉变烟叶的研究多集中于烟叶霉变原因探索和预防措施开发,如改变环境温湿度,使霉菌不宜生长等^[2-3],以及研究烟叶霉变微生物^[4-6]。但由于烟叶储存堆码的原因,即使控制仓储环境的温湿度,小部分烟叶仍会霉变。烟叶霉变过程中使其挥发性代谢产物(MVOCs)发生变化,因此可通过监测烟叶霉变的挥发性代谢产物来判断烟叶霉变情况。研究显示,采用顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱(HS-SPME-GC-MS)方法检测挥发性代谢产物是一种较为理想的技术^[7]。此技术在预测烟叶霉变报道甚少^[8],但在其他行业已有应用报道。在玉米霉变研究中采用挥发性成分作为霉变标记物已有报道^[4,9]。在谷物霉变研究中已有报

道,谷物在储藏过程中醇类^[10]、酯类^[11]、酮类^[12]、醛类^[13-14]、脂肪酸^[11]等物质的变化可能导致谷物发生霉变或劣变,对谷物品质产生严重影响。因此,测定烟叶霉变前后挥发性成分测定和筛查具有重要意义,可实现烟叶早期霉变的筛查,对烟叶霉变的提前预测和实时监控提供一种技术措施。该研究采用 SPME 结合 GC-MS 技术测定烟叶霉变特征标记物,建立烟叶霉变挥发性成分的测定方法,以期对霉变烟叶的识别及有效预防提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试材 由云南中烟烟叶仓储库中随机抽取 4 份烟叶(包括 2 份 K326 和 2 份红花大金元烟叶,即 K326 1#、K326 2#、红大 1#、红大 2#),将各烟叶平均分为 2 份,其中一份用于后续模拟霉病试验,一份自然醇化,共计 8 份。

1.2 仪器与试剂 7890B-5975B 气相-质谱联用仪,美国安捷伦(Agilent)科技有限公司;HP-5MS 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm),美国安捷伦(Agilent)科技有限公司;AB-204 电子分析天平,美国梅特勒(Mettler)公司;固相微萃取手柄,美国 Supelco 公司;75 μm Carboxen-PDMS 固相萃取头(黑头)、85 μm PDMS/DVB 固相萃取头(白头)、100 μm

基金项目 红云红河烟草(集团)有限责任公司科技项目(HYHH2019-YL01)。

作者简介 莫峰(1988—),男,云南昆明人,工程师,从事原料仓储物流及烟叶霉变防治技术研究。

收稿日期 2022-04-11; **修回日期** 2022-09-28

PDMS 固相萃取头(红头)、7 μm PDMS 固相萃取头(绿头)、65 μm PDMS/DVB 固相萃取头(蓝头)、30 μm PDMS/DVB 固相萃取头(黄头),美国 Supelco 公司;22 mL 顶空瓶,美国安捷伦(Agilent)科技有限公司;LIDA 加热搅拌台,广东科力达仪器有限公司;LHS 恒温恒湿箱,上海一恒科技有限公司;萘,99%,美国百灵威科技有限公司;乙醇,色谱纯,美国迪马公司。萘内标溶液:取 0.100 g 萘用乙醇自主配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标溶液。

1.3 GC-MS 条件

1.3.1 气相色谱条件。进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$,载气为 He,流速为 1 mL/min;升温程序:初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$ (保持 2 min),以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 140 $^{\circ}\text{C}$ (保持 1 min),再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$ (保持 1 min)。

1.3.2 质谱条件。离子源为 EI 源,电子能量为 70 eV,质量扫描范围为 35~350 amu。

1.4 数据检索 采集的质谱数据经 NIST 标准谱库进行检索并鉴定,采取峰面积归一化法计算各物质的相对含量。

1.5 烟叶样品制备 模拟烟叶自然霉变,将仓储烟叶放在恒温恒湿箱中,在适宜温湿度条件下(温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 60%)进行霉变试验,放置 21 d 后,得到霉变烟叶。将对应的正常烟叶与霉变烟叶分别置入旋风磨中,粉碎过 40

目筛,备用。

1.6 试验方法 选取红花大金元同一份正常烟叶为对象;每次称取 0.5 g 烟叶粉末样品置于 22 mL 顶空瓶中,同时在顶空瓶中加入 10 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的萘作为内标,及时封盖后将顶空瓶放置于加热搅拌台。将萃取头插入 GC 进样口于 300 $^{\circ}\text{C}$ 老化 1 h,直至无杂峰出现,并对条件进行优化:①对萃取头种类(黑头 75 μm Carboxen-PDMS、黄头 30 μm PDMS/DVB、白头 85 μm PDMS/DVB、绿头 7 μm PDMS)的优化;②对萃取温度(50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$)的优化;③对萃取时间(30、40、50、60 min)的优化;④对解吸附时间(1、2、3、4 min)的优化。将萃取的挥发性成分在 GC 进样口进行解吸附后,成分进入气相色谱-质谱联用仪,在“1.3”条件下分离与鉴定,以出峰数目和峰面积总量作为试验条件优化依据。采用 NIST 标准谱库进行检索,以萘内标作为参考,对挥发性化合物进行相对定量,正常烟叶与霉变烟叶总离子流图见图 1 所示。

根据优化条件,对不同品种(包括红大和 K326)正常烟叶和霉变烟叶中挥发性成分种类进行测定,并采用 Excel 和 SIMCA P+14.0 软件对挥发性成分类型及标志性成分进行统计和筛选。

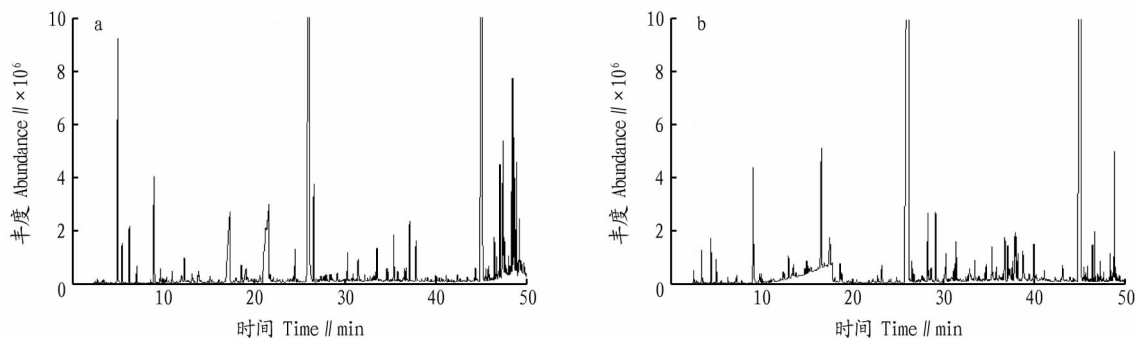


图 1 正常烟叶(a)和霉变烟叶(b)总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagram of normal tobacco(a)and mouldy tobacco(b)

2 结果与分析

2.1 萃取头的选取 通过考察同一样品不同极性涂层的萃取头(黑头、白头、绿头和黄头)对烟叶挥发性成分的萃取效率的影响,结果显示,黑头(固定相为 75 μm Carboxen-PDMS 涂层)萃取出的化合物最多,为 58 个,其他极性固定相涂层萃取头的化合物检出数分别为白头 35 个、绿头 13 个和黄头 23 个,因为黑色萃取头的出峰数目较多,最后选择黑头(固定相为 75 μm Carboxen-PDMS 涂层)作为检测霉菌代谢挥发性物质的萃取头。

2.2 萃取温度对萃取效果的影响 在萃取温度为 50、60、70、80 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 下进行测定,以“2.1”优化出的黑头为萃取头,挥发性成分の出峰数目分别为 55、76、88、108 和 106 个,各成分的峰面积归一化百分含量总量分别为 70.55%、72.05%、73.33%、76.95%和 77.05%,80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测得的化合物最多,总峰面积归一化百分含量与 90 $^{\circ}\text{C}$ 检出的化合物相应的峰面积归一化百分含量相差不大,最终选择检出峰最多的 80 $^{\circ}\text{C}$

作为萃取温度条件。

2.3 萃取时间对萃取效果的影响 根据“2.1”和“2.2”优化的条件,进一步考察不同萃取时间(30、40、50 和 60 min)对萃取效果的影响。结果表明,不同萃取时间下,出峰化合物数目分别为 108、120、122 和 118 个,峰面积归一化百分含量分别为 83.18%、80.33%、82.67%和 80.59%,50 min 时出峰数目最多,总峰面积归一化百分含量比 30 min 的略低,综合考虑后选择 50 min 作为萃取时间。

2.4 解吸附时间对解析效果的影响 根据“2.1”“2.2”和“2.3”优化条件,分别在解吸附时间为 1、2、3 和 4 min 的条件下进行测定。结果表明,不同解吸附时间下,挥发性成分の出峰数目分别为 95、98、96 和 92 个,说明解吸附时间对测定影响不大,综合考虑后选择 2 min 作为解吸附时间。

2.5 方法重现性 在 22 mL 顶空瓶中加入相同量的萘内标溶液,采用 HS-SPME-GC-MS 平行测定 6 次,6 次测定的相对标准偏差(RSD)小于 20%,说明所建立的测定方法的精密

度满足霉变烟叶中挥发性成分的测定。

2.6 正常烟叶与霉变烟叶样品检测 根据“2.1~2.5”优化结果,通过对不同品种正常和霉变烟叶中挥发性成分进行测定,对挥发性成分种类进行综合统计,结果见图2;并对正常和霉变烟叶中差异标志物进行对应分析,筛选出霉变烟叶的标志成分,结果如表1所示。

由图2可知,正常烟叶和霉变烟叶所检测出的挥发性成分中检测出的种类均超过95种,其中酮类和醛类均较多,分别为22、18种和20、16种。

由表1可知,对正常烟叶和霉变烟叶挥发性成分的含量进行对比分析,筛选出8种挥发性成分,分别为5-甲基-2-呋喃甲醇、1-辛烯-3-醇、苯甲醇、1,2-二甲氧基-苯、2,4-二氯-1-甲氧基-苯、5-甲氧基-6,7-二甲基-苯并呋喃、十六酸甲酯和十六酸,这些挥发性成分在正常烟叶和霉变烟叶中差异较大。

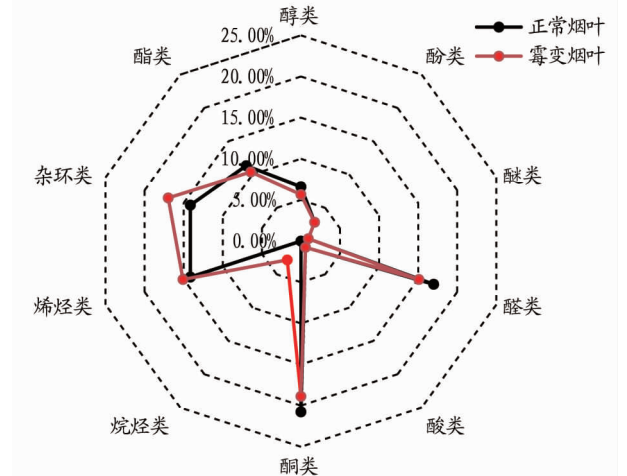


图2 正常烟叶与霉变烟叶挥发性成分种类占比统计

Fig.2 Statistics of the percentage of the types of volatile components in normal and mouldy tobacco leaves

表1 相对定量检测结果对比

Table 1 Comparison of relative quantitative test results

单位:μg/g

保留时间 Retention time//min	成分名称 Ingredient name	正常烟叶 Normal tobacco leave				霉变烟叶 Mouldy tobacco leave			
		红大 1# Hongda 1#	红大 2# Hongda 2#	K326 1#	K326 2#	红大 1# Hongda 1#	红大 2# Hongda 2#	K326 1#	K326 2#
8.47	5-甲基-2-呋喃甲醇 5-methyl-2-furanol	0.056	0.029	0.029	0.038	0.014	0.019	0.007	0.031
9.57	1-辛烯-3-醇 1-octene-3-ol	—	—	—	—	0.073	0.057	0.027	0.294
11.80	苯甲醇 Benzyl alcohol	0.019	0.195	0.206	0.134	0.004	0.133	0.006	0.010
16.70	1,2-二甲氧基-苯 1,2-dimethoxy-benzene	—	—	—	—	0.142	0.049	0.151	0.031
23.03	2,4-二氯-1-甲氧基-苯 2,4-dichloro-1-methoxy-benzene	—	—	—	—	0.018	0.041	0.012	0.040
30.77	5-甲氧基-6,7-二甲基-苯并呋喃 5-methoxy-6,7-dimethyl-benzofuran	—	—	—	—	0.189	0.461	0.003	0.493
46.00	十六酸甲酯 Methyl hexadecate	0.118	0.133	0.975	0.321	0.295	0.181	0.285	0.429
47.25	十六酸 Palmitic acid	1.174	0.153	0.638	1.450	0.024	0.031	0.040	0.100

注:“—”表示未检出。
Note:“—” means not detected.

进一步将所筛选的挥发性成分进行主成分和聚类分析,对8种标志物筛选的合理性进行分析,结果如图3~4所示。由图3可知,8种挥发性成分可将正常烟叶和霉变烟叶有效

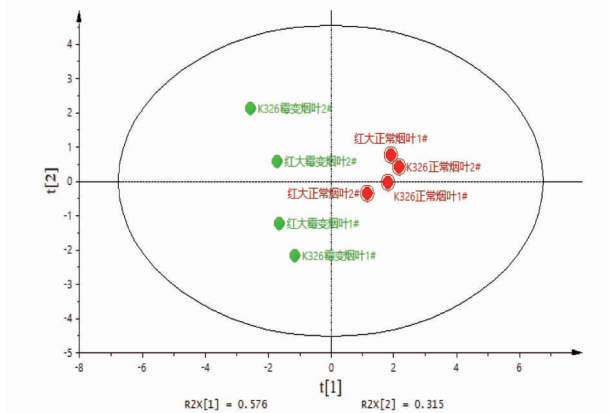


图3 正常烟叶和霉变烟叶8种挥发性成分主成分得分

Fig.3 Main component scores of 8 volatile components in normal and mouldy tobacco leaves

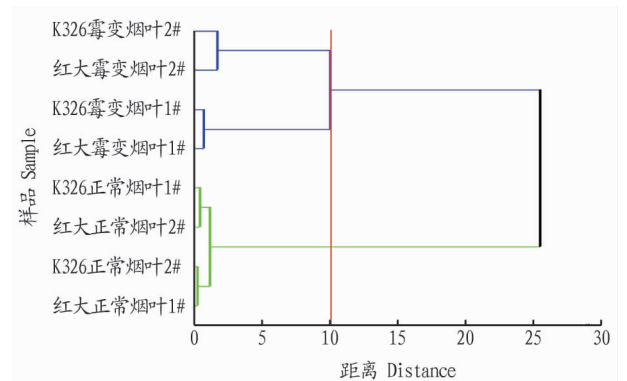


图4 正常烟叶和霉变烟叶8种挥发性成分的聚类图

Fig.4 Cluster diagram of 8 volatile components in normal and mouldy tobacco leaves

识别,前2个主成分累计贡献率为89.1%。

在阈值为10时,所筛选的8种挥发性成分可将不同品种(包括红大和K326)的正常烟叶和霉变烟叶进行有效聚类。结果表明所筛选的8种挥发性成分可作为霉变烟叶和

正常烟叶的识别依据,为后续早期霉变烟叶的数据化识别提供基础依据。

3 结论

该研究建立基于 SPME 结合 GC-MS 法测定霉变烟叶中挥发性成分的方法,对影响 SPME 萃取效率的因素(萃取头种类、萃取温度、萃取时间和解吸附时间)进行了优化,得到了较优的萃取条件:采用固定相为 75 μm Carboxen-PDMS 涂层的黑头萃取头,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取样品 50 min,萃取头在气相色谱进样口解吸附 2 min 的条件下进行测定。对方法的重现性进行考察,6 次测定结果的 RSD 值小于 20%,说明所建立方法具有较好的重现性。

基于以上方法步骤,对正常烟叶和霉变烟叶的挥发性化合物进行测定,发现有 8 个化合物存在明显的特征,分别为 5-甲基-2-咪喃甲醇、1-辛烯-3-醇、苯甲醇、1,2-二甲氧基-苯、2,4-二氯-1-甲氧基-苯、5-甲氧基-6,7-二甲基-苯并咪喃、十六酸甲酯和十六酸。通过监测这些化合物含量的变化可以用于识别烟叶霉变程度,该研究为判定烟叶霉变程度及烟叶霉变预防提供了技术支撑,可降低烟叶霉变带来的经济损失,同时为霉变烟叶的快速识别提供基础依据。

参考文献

[1] 李小兰,黄善松,黄聪光,等.烟叶仓储管理存在的主要问题与对策初

(上接第 166 页)

提取率的影响大于料液比。由图 6f 可知,固定提取时间为 50 min,料液比为 1:6,随着提取温度的升高和乙醇体积分数的增大,苹果多酚提取率先增加后减少,提取温度对苹果多酚提取率的影响大于乙醇体积分数。

该试验通过研究超声波功率、提取时间、提取温度、乙醇体积分数、料液比对苹果多酚提取率的影响,使用 Design-Expert 8.0.6 软件设计,优化得出超声波辅助提取花牛苹果幼果中多酚的最佳工艺为:超声波功率 100 W,提取时间 50.65 min,乙醇体积分数 70.67%,料液比 1:5.73,提取温度 62.39 $^{\circ}\text{C}$,苹果多酚提取率为 11.620 mg/g。但在实际工艺中为了操作方便,将工艺条件设置为超声波功率 100 W,提取时间 51 min,乙醇体积分数 71%,料液比 1:6,提取温度 62 $^{\circ}\text{C}$,该条件下重复 5 次试验验证工艺的稳定性,幼果多酚平均提取率为 11.586 mg/g,这与理论预测值(11.620 mg/g)接近。可见,试验设计优化得到的花牛苹果幼果多酚提取工艺条件准确、稳定、可行。

3 结论

该研究在单因素试验的基础上,结合响应面法优化微波辅助法提取苹果多酚的工艺,建立苹果多酚得率的二次多项数学模型。该模型极显著,拟合情况良好。最佳工艺参数:超声波功率 100 W,提取时间 51 min,提取温度为 62 $^{\circ}\text{C}$,料液比 1:6,乙醇体积分数 71%,苹果多酚的提取率为 11.586 mg/g。

- 探[J].广西农业科学,2007,38(1):84-87.
- [2] 陈越立,肖明礼,杨庆.烟叶霉变及预防[J].广东化工,2011,38(4):49-50.
- [3] 彭清云,易图永.烟叶霉变的原因及其防治研究进展[J].中国农学通报,2007,23(11):146-150.
- [4] 程龙,徐亮,赵晓忠.仓储片烟霉变微生物的研究进展[J].贵州农业科学,2015,43(1):77-80.
- [5] 陈乾雨,汪汉成,梁永进,等.烤后健康烟叶和霉烂烟叶真菌群落结构分析[J].浙江农业学报,2020,32(6):1019-1028.
- [6] 苏家恩,典瑞丽,陈二龙,等.烘烤过程中烟叶霉变研究进展[J].安徽农业科学,2018,46(19):16-18.
- [7] 万立昊,渠琛玲,李慧,等.玉米霉变过程中挥发性物质的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2019,40(2):41-47.
- [8] 杨蕾.环境对烟叶品质的影响分析及霉变预测方法研究[D].昆明:昆明理工大学,2016.
- [9] 徐瑞,李洪军,贺雅非.玉米冻藏过程中挥发性成分变化及主成分分析[J].食品与发酵工业,2019,45(1):210-218.
- [10] FELLMAN J K, MILLER T W, MATTINSON D S, et al. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits[J]. Hort-Science, 2000, 35(6):1026-1033.
- [11] 潘冰燕,鲁晓翔,张鹏,等. GC-MS 结合电子鼻分析 1-MCP 处理对线辣椒低温贮藏期挥发性物质的影响[J].食品科学,2016,37(2):238-243.
- [12] 宋江峰,李大婧,刘春泉.贮藏过程中京甜紫花糯 2 号玉米软罐头的主要挥发性风味成分的变化[J].核农学报,2011,25(5):980-987.
- [13] 程焕.杨梅风味特征组分鉴定及变化规律的研究[D].杭州:浙江大学,2017.
- [14] RANI P R, CHELLADURAI V, JAYAS D S, et al. Storage studies on pinto beans under different moisture contents and temperature regimes[J]. Journal of stored products research, 2013, 52:78-85.

参考文献

- [1] 苏梅.我国苹果产业发展存在的问题及对策[J].现代农业科技,2013(2):306.
- [2] 本刊编辑部.甘肃现代苹果产业蓬勃发展[J].甘肃农业,2015(10):1.
- [3] OSADA K, OGION Y, NAKAMURA S, et al. Effect of dietary apple polyphenol on metabolic disorder of lipid in rats given oxidized cholesterol[J]. Proc Jpn Conf Biochem Lipids, 1997, 39:317-320.
- [4] 孙建霞,孙爱东,白卫滨.苹果多酚的功能性质及应用研究[J].中国食物与营养,2004(10):38-41.
- [5] 姬德衡,孔繁东,侯春青.苹果多酚的开发与应用[J].中国果菜,2001(2):26.
- [6] 郭玉蓉,孙立军,孟永宏,等.从苹果幼果中连续提取总多酚、绿原酸和根皮苷的方法:CN201210190650.8[P].2014-03-05.
- [7] 李建新,王育红,潘泊利,等.苹果多酚的提取技术和应用研究[J].农产品加工,2007(12):62-65.
- [8] 杜岩源,谢晶,王婷,等.超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J].食品与机械,2015,31(1):167-170.
- [9] 王贤萍,张倩茹,尹蓉,等.超声波辅助提取苹果多酚优化条件的研究[J].农产品加工,2014(14):12-15.
- [10] 李珍,哈益明,李安,等.响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J].中国农业科学,2013,46(21):4569-4577.
- [11] 高义霞,陶超楠,周向军,等.微波辅助提取花牛苹果幼果多酚的工艺优化[J].食品工业科技,2017,38(14):209-215,222.
- [12] 李颖琦,吕艳芳,励建荣. Folin-Ciocalteu 法测定不同品种蓝莓叶中多酚含量[J].中国食品学报,2014,14(1):273-278.
- [13] 江楠,李潇彬,顾曼琦,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定头花蓼多酚含量[J].安徽农业科学,2017,45(23):114-115.
- [14] 任文霞,李建科,仇农学,等.超声波辅助提取苹果渣多酚工艺[J].食品与生物技术学报,2008,27(4):20-23.
- [15] 周丽萍. Ralls 苹果多酚分离及抗氧化与脂肪代谢调节作用研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2010.
- [16] 齐娜,李涵,张志宇,等.新疆红肉苹果多酚的超声波辅助提取工艺优化[J].食品与机械,2016,32(9):177-182.
- [17] 白雪莲,岳田利,章华伟,等.响应曲面法优化微波辅助提取苹果渣多酚工艺研究[J].中国食品学报,2010,10(4):169-177.