Check for updates

Journal of Sensor Science and Technology
Vol. 31, No. 3 (2022) pp. 175-179
http://dx.doi.org/10.46670/JSST.2022.31.3.175
pISSN 1225-5475/eISSN 2093-7563

단일 나노입자의 다중 물리량의 평가를 위한 입자 모션 트랙킹 알고리즘

박예은[1] · 강지윤[1] · 박민수[1] · 노효웅[1] · 박홍식[1,+]

Particle-motion-tracking Algorithm for the Evaluation of the Multi-physical Properties of Single Nanoparticles

Yeeun Park[1], Geeyoon Kang[1], Minsu Park[1], Hyowoong Noh[1], and Hongsik Park[1,+]

Abstract

The physical properties of biomaterials are important for their isolation and separation from body fluids. In particular, the precise evaluation of the multi-physical properties of single biomolecules is essential in that the correlation between physical and biological properties of specific biomolecule. However, the majority of scientific equipment, can only determine specific-physical properties of single nanoparticles, making the evaluation of the multi-physical properties difficult. The improvement of analytical techniques for the evaluation of multi-physical properties is therefore required in various research fields. In this study, we developed a motion-tracking algorithm to evaluate the multi-physical properties of single-nanoparticles by analyzing their behavior. We observed the Brownian motion and electric-field-induced drift of fluorescent nanoparticles injected in a microfluidic chip with two electrodes using confocal microscopy. The proposed algorithm is able to determine the size of the nanoparticles by i) removing the background noise from images, ii) tracking the motion of nanoparticles using the circular-Hough transform, iii) extracting the mean squared displacement (MSD) of the tracked nanoparticles, and iv) applying the MSD to the Stokes-Einstein equation. We compared the evaluated size of the nanoparticles with the size measured by SEM. We also determined the zeta-potential and surface-charge density of the nanoparticles using the extracted electrophoretic velocity and the Helmholtz-Smoluchowski equation. The proposed motion-tracking algorithm could be employed in various fields related to biomaterial analysis, such as exosome analysis.

Keywords: Multi-physical properties, Single-nanoparticle, Motion-tracking algorithm, Brownian motion, Mean-squared displacement

1. 서 론

나노입자의 물리적, 화학적, 생물학적 특성 등은 다양한 연구 분야에 널리 활용되고 있고, 특히 엑소좀(exosome)을 포함한 세포외소포체(extracellular vesicle)와 같은 생체 나노입자의 화학적, 생물학적 특성은 약물 전달, 질병 진단 및 치료 등과 같은 의료 분야에 활용되고 있다. 최근 들어 단일 나노입자의 크기, 제타전위(zeta-potential), 표면전하밀도(surface-charge density) 등과 같은 물리적 특성은 생체 나노입자의 물리적-생물학적 특성 간 상관관계를 규명하기 위한 중요한 파라미터(parameter)로서 잠재력이 입증되고 있다 [1,2].

나노입자의 물리량을 평가하기 위한 기존 상용화된 기술로는 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM), 저항 펄스 감지 (resistive pulse sensing), 나노입자 추적 분석 (nanoparticle tracking analysis) 등이 있다.

주사전자현미경은 전자 빔을 주사하여 얻어진 이미지를 이용하여 나노입자의 크기 및 형태 등을 분석하기 위한 기술이다. 그러나 생체 나노입자일 경우 fixation, dehydration, drying 등 시료 준비 단계가 복잡하고 시간이 많이 걸리며 측정자의 숙련된 기술이 요구된다. 또한 생체 나노입자의 제타전위와 표면전하밀도를 평가할 수 없다는 한계를 가지고 있다 [3].

저항 펄스 감지는 전기장에 의한 유체 내 나노입자의 이동에 따른 유체의 저항 변화를 측정하여 크기와 제타전위를 평가할 수 있으나 측정 시 나노입자의 응집과 전기적 잡음 등에 의해 저항 측정 정확도가 감소하여 정확한 크기와 제타전위를 평가하는 것이 어렵고, 이를 보정하기 위해 복잡한 모델을 적용해야

[1] 경북대학교 대학원 전자전기공학부 (School of Electronic and Electrical Engineering, Kyungpook National Unversity), 80 Daehakro, Bukgu, Daegu 41566, Korea
[+]Corresponding author: hpark@ee.knu.ac.kr
(Received: May. 22, 2022, Revised: May. 30, 2022, Accepted: May. 31, 2022)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한다 [4].

나노입자 추적 분석은 유체 내 나노입자에 의한 단파장 레이저 산란광을 카메라로 시각화한 후, 나노입자의 실시간 변위를 분석하여 나노입자의 크기를 평가하는 방법이다. 주사전자현미경에 비해 복잡한 처리과정 없이 빠르게 나노입자의 크기를 평가할 수 있으며 촬영된 영상을 기반으로 나노입자의 움직임을 시각적으로 분석하기 때문에 측정 환경에 덜 민감하게 정확한 나노입자 크기 평가가 가능하다는 장점이 있다. 그러나 비교적 많은 양의 시료(> 500 μL)를 필요로 하여 다량의 시료 확보가 어려운 생체 시료의 측정/분석에 한계가 있다. 특히, 직경 500 nm 이상의 크기를 가지는 나노입자의 경우 촬영된 영상 내 산란광의 산란 범위가 넓어 입자 중복 인식 등으로 인해 정확히 분석되지 않고 나노입자의 제타전위의 평가가 어렵다. 또한, 단일 나노입자의 물리량이 아닌 나노입자의 전체적인 크기 분포만을 알 수 있기 때문에 단일 나노입자를 연구하는 분야에서는 활용되기 어렵다는 한계가 있다 [5,6].

본 연구에서는 소량의 시료 (~ 200 μL)에 포함된 단일 나노입자의 크기, 제타전위 및 표면전하밀도를 정확히 평가할 수 있는 입자 모션 트랙킹 알고리즘을 개발하였다. 나노입자에 전기장을 인가할 수 있는 2전극 구조의 미세 유체 칩을 제작하고 공초점 현미경 (confocal microscopy)을 이용하여 형광 나노입자의 움직임을 촬영하였다. 촬영된 영상에 원형 허프 변환 (circular-Hough transform) 알고리즘을 적용하여 단일 나노입자의 위치를 인식하였다. 이렇게 인식된 위치 정보를 영상의 프레임 별로 연결하여 나노입자의 물리량을 평가하였다. SEM 측정 결과 대비 직경 100 nm 및 500 nm 입자의 크기 평가 결과가 유사함을 확인하였으며, 개발된 알고리즘을 이용하여 제타전위 및 표면전하밀도를 평가하고 단일 나노입자의 다중 물리량 동시 분석의 가능성을 입증하였다. 개발된 알고리즘은 다양한 질병 치료/진단을 위한 연구 분야에 널리 활용될 수 있다.

2. 연구 방법

2.1 나노입자의 움직임을 관찰하기 위한 미세 유체 칩 제작

공초점 현미경을 이용하여 형광 나노입자의 움직임을 관찰하기 위해 미세 유체 칩을 제작하였다. 60 mm 길이로 dicing된 6인치 실리콘 웨이퍼 조각을 polyimide tape을 이용하여 4인치 실리콘 웨이퍼에 부착하여 680 μm 두께의 PDMS 채널 제작을 위한 mold를 제작하였다. PDMS monomer와 curing agent (Dow Corning Corp.)를 10:1 w/w 비율로 혼합하고 이를 mold에 부어 경화시킨 후 (87°C, 1시간) cutting, inlet/outlet punching 과정을 진행하여 PDMS 채널을 제작하였다. 제작된 PDMS 채널 표면과 slide glass 표면을 oxygen plasma 처리하고 이를 부착하였다.

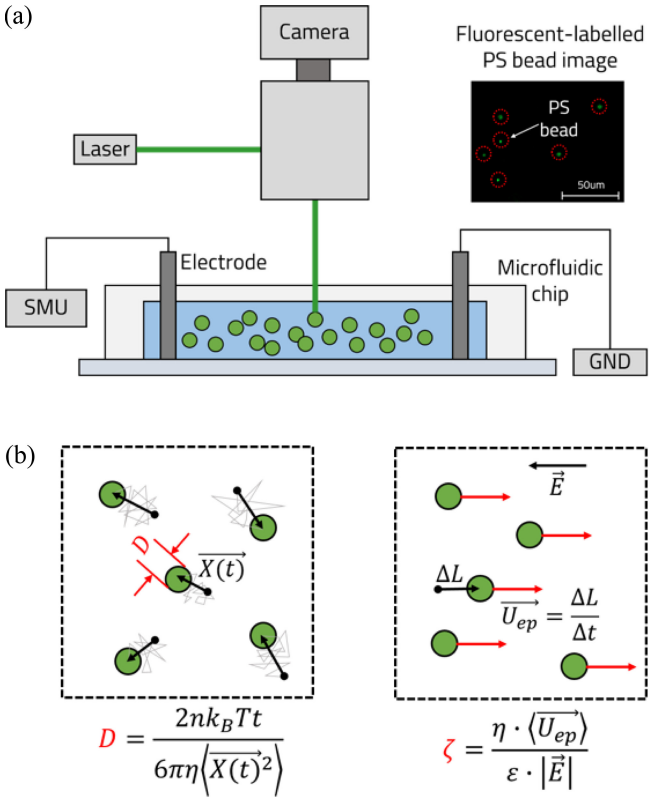

Fig. 1. (a) Schematic of measurement process to observe the motion of nanoparticles with confocal microscopy. The fluorescent polystyrene(PS) nanoparticles within 0.1x PBS was injected in the microfluidic channel. To evaluate the zeta-potential of nanoparticles, a constant current was applied to electrodes by using a SMU. (b) Equation models for evaluation of the size(left) and zeta-potential(right). The size of nanoparticles is calculated from the Stokes-Einstein equation, and the zeta-potential of these are calculated from the Helmholtz-Smoluchowski equation.

2.2 나노입자 움직임 촬영 및 물리량 평가 이론

2.2.1 공초점 현미경을 이용한 나노입자 움직임 영상 촬영

형광 처리된 직경 100 nm, 500 nm polystyrene(PS) bead (Bangs Laboratories, Inc.)를 0.1x PBS 용액에 현탁하였다. 제작된 미세 유체 칩에 현탁된 bead 시료를 주입하였다 (~ 200 μL). Inlet/outlet에 Fig. 1(a)와 같이 백금 와이어 전극을 배치하고 Source-Measure Unit (SMU)를 연결하였다.

공초점 현미경(LSM 800, Carl Zeiss)의 레이저(488 nm, 10 mW)를 미세 유체 채널에 조사하고 나노입자에서 방출된 형광을 측정하여 나노입자의 움직임을 촬영하였다. 초반 10초 간은 나노입자의 크기를 평가하기 위해 전기 신호를 인가하지 않고, 이후 나노입자의 제타전위를 평가하기 위해 10초 간 정전류를 인가하여 유체 내 나노입자들에 균일한 전기장을 인가하였다. 균일한 전기장을 인가하기 위한 조건은 Noh의 논문을 참고하였다 [7].

2.2.2 나노입자의 물리량 평가 이론

유체 내 나노입자의 움직임을 추적하여 물리량을 평가하기 위해서는 움직임과 물리량 간의 계산 모델이 필요하다. 본 알고리즘으로 평가한 크기, 제타전위, 표면전하밀도의 도출을 위해 사용한 이론을 아래에서 기술한다.

Stokes-Einstein equation은 Fig. 1(b) 좌측에서 볼 수 있듯 유체 내 나노입자의 크기와 브라운 운동에 의한 나노입자의 변위 간 관계를 기술하는 식이다. 아래의 식 (1)은 Stokes-Einstein equation에서 입자의 크기를 시간에 따라 표현한 것이다.

$$D = \frac{2nk_BTt}{6\pi\eta\langle\overrightarrow{X(t)}^2\rangle} \tag{1}$$

여기서 D는 입자의 지름, n은 차원수(본 논문에서 n = 2), k_B는 볼츠만 상수, T는 절대온도, t는 측정시간(영상에서는 프레임 간의 시간), η는 유체의 점성, $\langle\overrightarrow{X(t)}^2\rangle$는 평균 제곱 변위이다. 즉, 입자의 움직임을 추적하여 입자의 변위를 분석하면 입자의 크기를 계산할 수 있다 [8].

Helmholz-Smoluchowski equation은 Fig. 1(b) 우측에서 볼 수 있듯 유체 내 나노입자의 제타전위와 입자의 전기영동 속도 간 관계를 기술하는 식이다. 아래의 식 (2)은 Helmholtz-Smoluchowski equation에서 입자의 제타전위를 전기영동 속도의 함수로 표현한 것이다.

$$\zeta = \frac{\eta\langle\overrightarrow{U_{ep}}\rangle}{\varepsilon|\vec{E}|} \tag{2}$$

여기서, ζ는 입자의 제타전위, ε는 유체의 유전율, $\langle\overrightarrow{U_{ep}}\rangle$는 평균 전기영동 속도, $\vec{E}$는 입자에 인가된 전기장이다. 즉, 입자의 움직임을 추적하여 입자의 전기영동 속도를 분석하면 입자의 제타전위를 계산할 수 있다 [9].

앞에서 구한 나노입자의 크기와 제타전위를 이용하여 다음 식 (3)과 같이 나노입자의 표면전하밀도를 구할 수 있다.

$$\rho_s = \frac{\varepsilon k_BT}{ze}\kappa\left[2\sinh\left(\frac{\zeta ze}{2k_BT}\right)+\frac{8}{\kappa D}\tanh\left(\frac{\zeta ze}{4k_BT}\right)\right] \tag{3}$$

여기서, ρ_s는 입자의 표면전하밀도, ze는 전자의 전하량, $1/\kappa$는 전기이중층의 두께이다. 즉, 입자의 움직임을 추적하여 입자의 변위와 속도를 통해 크기와 제타전위를 평가하면 입자의 표면전하밀도를 구할 수 있다 [10].

2.3 단일 나노입자 다중 물리량 평가 알고리즘

공초점 현미경으로 촬영된 나노입자 영상을 분석하여 단일 나노입자의 다중 물리량을 평가하는 알고리즘의 처리과정에 대한 순서도를 정리하여 Fig. 2(a)에 나타내었으며, 주요 기능에 대하여 아래에서 자세히 설명한다.

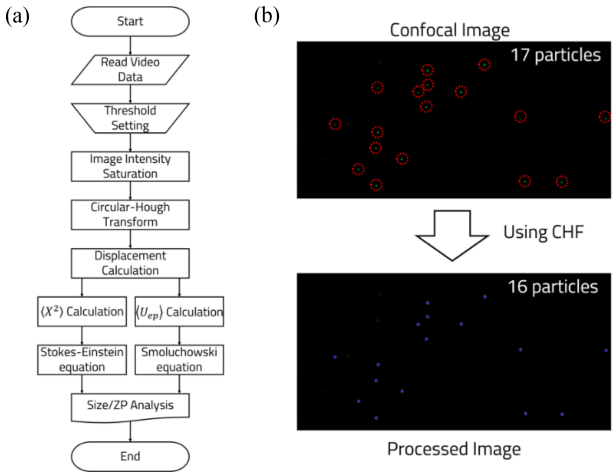

Fig. 2. (a) Flow-chart of the motion-tracking algorithm based on the circular-Hough transform. (b) In manual, 17 particles were captured in the pre-processing image (upper image, red dot-line). After applying the circular-Hough transform, the 16 particles were captured (lower image, blue line).

2.3.1 이미지 전처리

획득한 영상의 배경 잡음과 무관하게 나노입자의 움직임을 측정하기 위하여 이미지 전처리 과정을 거쳤다. 영상의 이미지 내 픽셀의 RGB 값은 0에서 255 사이의 값을 갖는다. 본 연구에서는 녹색 형광을 방출하는 나노입자를 사용하였으므로 이미지 내 픽셀의 R 및 B 값을 0으로 조정하였다. 입자와 잡음이 구별되는 최적의 threshold 값을 설정하여 해당 threshold 값보다 주어진 픽셀의 G 값이 클 경우 해당 값을 255로 포화시켜 입자의 빛이 강한 부분을 강조하고 입자의 경계선이 잘 드러나도록 하였다.

2.3.2 Circular-Hough Transform 기반 나노입자 움직임 추적

영상 내 나노입자의 움직임을 파악하기 위해 먼저 입자의 위치를 인식해야 한다. PS bead와 같은 원형의 물체를 식별하기 위해 영상처리 분야에서 자주 사용되는 방식 중에 하나인 원형 허프 변환을 채택하였다.

원형 허프 변환은 주어진 원형 물체의 반지름 범위 내에서 원형에 가까운 물체를 찾아내는 방식으로, 원형 허프 변환으로 나노입자의 움직임을 측정할 수 있는 최적의 파라미터 조건을 설정하였다. 해당 변환을 통해 인식된 원의 중심 위치 정보를 수집하고 분석하여 입자가 어디로 움직였는지 추적하였다 [11]. Fig. 2(b)에서 볼 수 있듯 공초점 현미경 촬영 영상 (상단 이미지)에 이미지 전처리와 원형 허프 변환을 적용하면 하단 이미지와 같이 입자를 인식하여 추적할 수 있다. 처리 전 이미지에서 육안으로 관찰한 입자의 개수 (17개)와 알고리즘으로 처리 후 인식한 입자의 개수 (16개)가 유사함을 확인하였다. 즉, 원형 허프 변환을 통하여 입자의 움직임을 추적할 수 있음을 검증하였다.

2.3.3 나노입자의 물리량 평가

원형 허프 변환을 통해 영상 내 매 프레임 별로 입자 중심의 위치 정보를 알 수 있다. 프레임 별 나노입자의 위치 좌표를 이용하여 해당 입자가 다음 프레임까지 이동한 변위를 계산할 수 있다. 계산된 변위를 입자 별로 누적하여 제곱한 뒤, 평균값을 Stokes-Einstein equation에 대입하여 입자의 크기를 평가하였다.

각 프레임 별 전기장이 인가된 방향(x축 혹은 y축 방향)과 평행한 방향으로의 나노입자 위치 좌표와 프레임 간 시간을 이용하여 입자가 이동한 속력을 구할 수 있다. 이 속력을 입자 별로 누적하여 평균 속력을 구하고 Helmholtz-Smoluchowski equation에 대입하여 입자의 제타전위를 평가하였다.

평가된 입자의 크기와 제타전위를 식 (3)에 대입하여 입자의 표면전하밀도를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 알고리즘을 이용한 단일 나노입자 크기 평가

제안하는 알고리즘을 이용하여 단일 나노입자의 움직임을 추적하고 물리량을 평가하였다. 알고리즘의 나노입자 물리량 평가 정확도를 검증하기 위하여 나노입자의 크기를 평가하고 이를 SEM으로 측정한 결과와 비교하였다.

Fig. 3(a)는 직경 100 nm PS bead의 크기를 평가하여 그 분포를 히스토그램으로 나타낸 것이고, Fig. 3(c)는 동일한 나노입자의 크기를 SEM으로 측정하여 히스토그램으로 나타낸 것이다. SEM 측정 결과 109.3 ± 3.9 nm이며, 알고리즘으로 분석한 결과 97.5 ± 18.7 nm로 유사한 크기 분포를 가짐을 확인하였다.

Fig. 3(b)는 직경 500 nm PS bead의 크기를 평가하여 그 분포를 히스토그램으로 나타낸 것이고, Fig. 3(d)는 동일한 나노입자의 크기를 SEM으로 측정하여 히스토그램으로 나타낸 것이다. SEM 측정 결과 438.8 ± 18.1 nm이며, 알고리즘으로 분석한 결과 440.8 ± 39.1 nm로 역시 유사한 크기 분포를 가짐을 확인하였다.

이를 통해 알고리즘을 이용한 나노입자 위치 인식과 크기 평가가 제대로 이뤄지고 있음을 확인하였다.

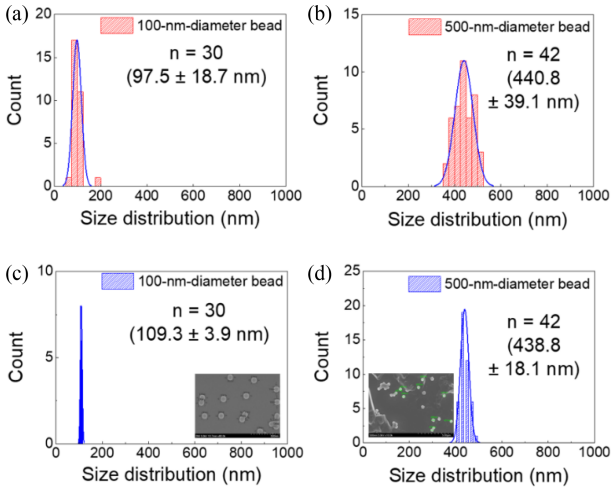

Fig. 3. (a, b) The size evaluation results of PS beads with 100- and 500-nm-diameter using motion-tracking algorithm. Evaluated size was 97.5 ± 18.7 nm (100-nm-diameter) and 440.8 ± 39.1 nm (500-nm-diameter). (c, d) The size measurement results of these nanoparticles using SEM. Measured size was 109.3 ± 3.9 nm (100-nm-diameter) and 438.8 ± 18.1 nm (500-nm-diameter).

3.2 알고리즘을 이용한 나노입자 제타전위 및 표면전하밀도 평가

3.1절에서 검증한 알고리즘의 나노입자 움직임 추적을 이용하여 나노입자의 제타전위와 표면전하밀도를 평가하였다.

Fig. 4(a)는 직경 100 nm (푸른색) 및 500 nm (붉은색) PS bead의 제타전위 분포를 히스토그램으로 나타낸 것이다. 직경 100 nm PS bead의 제타전위는 -48.8 ± 4.8 mV, 직경 500 nm PS bead의 제타전위는 -65.3 ± 1.7 mV로 평가되었다. 동일한 조건에서 촬영된 bead의 크기가 클수록 제타전위가 커짐을 확인하였다. 이는 동일한 재료 특성을 갖는 bead이므로 크기에 따른 표면적

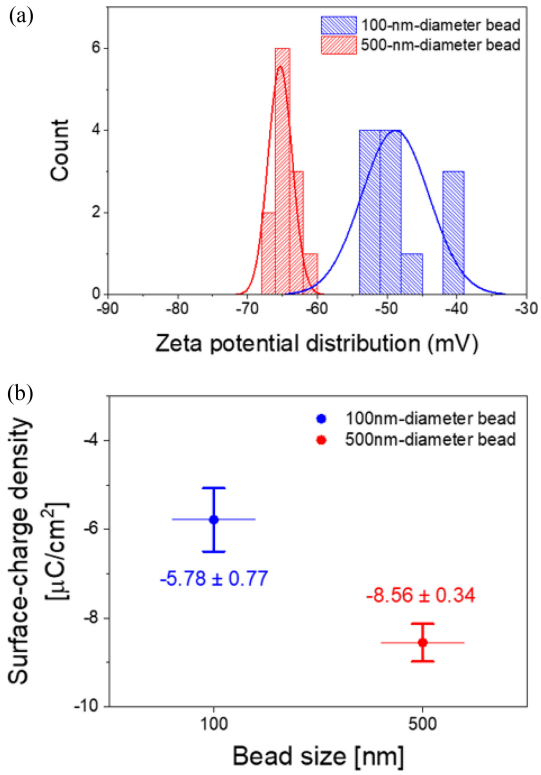

Fig. 4. (a) The zeta-potential evaluation results of PS beads with 100-nm-diameter (blue bar and line, -48.8 ± 4.8 mV) and 500-nm-diameter (red bar and line, -65.3 ± 1.7 mV). (b) The calculation results of surface-charge density of 100-nm-diameter (blue, -5.78 ± 0.77 μC/cm^2) and 500-nm-diameter (red, -8.56 ± 0.34 μC/cm^2).

차이 때문으로 생각된다. 또한 100 nm PS bead의 제타전위 표준편차가 500 nm PS bead보다 더 큰 것을 확인할 수 있는데, 이는 이미지 전처리 과정에서 500 nm bead는 100 nm bead에 비해 상대적으로 배경 잡음과 명확히 구별되어 더욱 효과적으로 배경 잡음이 제거되었기 때문이다. 이러한 점은 제안하는 알고리즘을 개선하기 위한 후속 연구에서 보완되어야 할 점 중 하나이다.

Fig. 4(b)는 3.1절과 앞에서 평가한 크기와 제타전위를 이용하여 표면전하밀도를 계산한 결과이다. 직경 100 nm PS bead (푸른색)의 경우 표면전하밀도가 -5.78 ± 0.77 μC/cm^2, 직경 500 nm PS bead (붉은색)의 경우 -8.56 ± 0.34 μC/cm^{2}로 평가되었다.

Fig. 3, 4의 결과들을 종합하였을 때, 나노입자의 크기와 관계없이 알고리즘이 단일 나노입자의 움직임을 추적하여 크기, 제타전위, 표면전하밀도를 평가하는 것이 가능함을 검증하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 단일 나노입자의 위치를 인식하여 움직임을 추적하고 나노입자의 다중 물리량을 평가할 수 있는 입자 모션 트랙킹 알고리즘을 개발하였다. 직경 100 및 500 nm 로 알려진 단일 나노입자의 크기를 평가하고 이를 SEM 측정 결과와 비교하여 상대적으로 높은 평가 정확도를 가짐을 확인하였다. 또한 이 나노입자들의 제타전위와 표면전하밀도를 평가하여 본 연구에서 제안하는 알고리즘이 나노입자의 다중 물리량 평가에 적용될 수 있음을 입증하였다. 제안하는 알고리즘은 다양한 범위의 크기와 제타전위를 갖는 나노입자에 적용 가능하며, 엑소좀과 같은 생체 나노입자의 다중 물리량을 평가하기 위한 기반 기술로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(2017M3A9G8083382)과 한국연구재단 기초연구실 지원 사업(2020R1A4A1019518)의 지원을 받아 수행된 연구임.

REFERENCES

[1] B. D. Fahlman, *Materials Chemistry*, Springer, Mount Pleasant, 2007.

[2] H. Shao, H. Im, C. M. Castro, X. Breakefield, R. Weissleder, and H. Lee, “New technologies for analysis of extracellular vesicles”, *Chem. Rev.*, Vol. 118, No. 4, pp. 1917-1950, 2018.

[3] B. H. Wunsch, J. T. Smith, S. M. Gifford, C. Wang, M. Brink, R. L. Bruce, R. H. Austin, G. Stolovitzky, and Y. Astier, “Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm”, *Nat. Nanotechnol.*, Vol. 11, No. 11, pp. 936-940, 2016.

[4] E. Van der pol, F. A. W. Coumans, A. E. Grootemaat, C. Gardiner, I. L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T. G. Van Leeuwen, and R. Nieuwland, “Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flowcytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulsesensing”, *J. Thromb. Haemost.*, Vol. 12, No. 7, pp. 1182-1192, 2014.

[5] K. Y. Gu, R. Tahvildari, Z. Friedenberger, X. Zhu, R. Berti, M. Kurylowicz, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni, J. Leung, J. Andersson, A. Dhlin, F. Höök, M. Sutton, P. R. Cullis, and S. Leslie, “Simultaneous, single-particle measurements of size and loading give insights into the structure of drug-delivery nanoparticles”, *ACS Nano*, Vol. 15, No. 12, pp. 19244-19255, 2021.

[6] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, “Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates”, *Pharm. Res.*, Vol. 27, No. 5, pp. 796-810, 2010.

[7] H. Noh, J. Lee, C.-J. Lee, J. D. Jung, J. W. Kang, M. Choi, M.-C. Baek, J. H. Shim, and H. Park, “Precise evaluation of liquid conductivity using a multi-channel microfluidic chip and direct-current resistance measurements”, *Sens. Actuators B-Chem.*, Vol. 297, p. 126810, 2019.

[8] B. Lukic, S. Jeney, C. Tischer, A. J. Kulik, L. Forro, and E.-L. Florin, “Direct observation of nondiffusive motion of a Brownian particle”, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 95, No. 16, p. 160601, 2005.

[9] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, and D. Li, “Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow”, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 261, No. 2, pp. 402-410, 2003.

[10] T. L. Doane, C. H. Chuang, R. J. Hill, A. C. Burda, “Nanoparticle zeta-potentials”, *Acc. Chem. Res.*, Vol. 45, No. 3, pp. 317–326, 2011.

[11] M. Smereka, and I. Duleba, “Circular object dectection using a modified hough transform”, *Int. J. Appl. Comput. Sci.*, Vol.18, No.1, pp. 85-91, 2008.