

УДК 544.77.03

© А. Г. Варехов

## ИЗМЕРЕНИЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЧАСТИЦ БИОКОЛЛОИДОВ

В статье кратко обсуждаются методы измерений электрокинетического потенциала (дзета-потенциала) коллоидных частиц и проблемы, связанные с использованием этих методов. Наиболее подробно анализируются методы и приборы, основанные на измерениях динамического светорассеяния частиц и получившие в настоящее время широкое распространение. Показано, что доплеровская спектроскопия рассеянного частицами света сопряжена с трудностями не только при анализе размеров частиц, в особенности для полидисперсных коллоидов, но и прежде всего при измерениях дзета-потенциала, поскольку он определяется не столько размером, сколько всей совокупностью периферических параметров частиц. Предлагается способ измерения, близкий к классическому электрофорезу, в котором используется знакопеременное электрическое поле, минимизированы дрейфовая длина частиц и разность электрических потенциалов.

*Кл. сл.:* дзета-потенциал, электрофорез, динамическое светорассеяние, модифицированный электрофоретический метод измерения

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование граничных потенциалов, определяемых наличием или отсутствием заряженных и/или поляризующихся групп на взаимодействующих поверхностях, имеет длинную историю. Это особенно актуально для водных коллоидных систем, и в частности для систем, содержащих частицы биологического происхождения (например, одиночно живущие бактериальные клетки, частицы физиологических жидкостей или многочисленные модельные частицы, например липосомы размером от малых ( $0.02 \div 0.05$  мкм) до гигантских ( $5 \div 100$  мкм) [1]). Многие фундаментальные параметры таких систем определяются электрическими свойствами воды и водных электролитов [2, 3]. Иногда отмечается [4], что изучение коллоидных дисперсий является способом исследования конденсированного состояния вещества (softmatter).

Поверхностные потенциалы частиц могут быть положительными за счет протонирования или отрицательными при диссоциации поверхностных радикалов. Максимальная плотность связанного отрицательного поверхностного заряда (например, для бислоя на основе фосфатидилсерина), определяющая поверхностный потенциал, оценивается [1] величиной  $0.1 \div 0.2 \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$ , что соответствует поверхностному заряду микронной частицы, равному примерно  $10^7 e$ . Свободный заряд, определяющий дзета-потенциал, значительно меньше. Мицеллы ПАВ (например, додецилсульфата на-

трия) за счет диссоциации катионов  $\text{Na}^+$  могут нести до 60 элементарных зарядов [4]. Такие электрические параметры поверхностей, как дипольный потенциал мембран, поверхностный потенциал или потенциал двойного электрического слоя, как правило, недоступны прямому измерению. Исключение составляет электрокинетический потенциал (дзета-потенциал), который, хотя также недоступен прямому измерению, может быть вычислен по измеренному значению скорости движения частицы в электрическом поле.

Точность измерения размеров и дзета-потенциалов частиц биологических суспензий имеет и диагностическую ценность, например, при воспалительных и опухолевых заболеваниях легких [5].

Наконец, задача измерения дзета-потенциала актуальна для исследования поверхностей стекол или медицинских полимеров [6], используемых, например, в конструкциях струйных или потоковых микрофлюидных модулей.

### МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ

Для измерения параметров частиц дисперсной фазы, т. е. размеров, заряда и электрокинетического потенциала, могут использоваться принципиально несколько технологий. К ним относятся многочисленные разновидности электрофореза, начиная от кюветы Тизелиуса, электроакустические методы и совокупность новых методов, основанных на измерениях светорассеяния коллоидов.

В клиническом электрофорезе слишком велики дрейфовая длина частиц, что удлиняет время анализа, и соответственно достаточно высокое напряжение (до 1000 В) с целью увеличения напряженности электрического поля. Типичные значения параметров, характеризующие процесс: плотность тока  $j = 1 \text{ А} \cdot \text{м}^{-2} = 0.1 \text{ мА} \cdot \text{см}^{-2}$ ; проводимость суспензии  $\sigma = 0.2 (\text{Ом} \cdot \text{м})^{-1}$ ; напряженность электрического поля  $E = 0.05 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$ ; дрейфовая (электрическая) подвижность эритроцитов как отношение скорости движения к напряженности электрического поля [7]

$$\mu_s = (0.87 - 1.35) (\text{мкм/с}) / (\text{В/см}).$$

Дзета-потенциал частиц цеолитов субмикронного размера в суспензии на основе дистиллированной воды измерялся с использованием электроакустической технологии на приборе ZetaProbe-Analyzer (Colloidal Dynamic Inc., USA) [8].

Описаны способы [9] использования ультразвука для измерения размеров и электрокинетического потенциала коллоидных частиц.

Предлагался способ использования электрооптической ячейки [10] для прямого измерения скорости движения предварительно окрашенных частиц в знакопеременном электрическом поле и вычислений электрокинетического потенциала частиц. Для окрашивания использовался анилино-нафталинсульфонат (1,8-АНС). Принципиальный недостаток способа состоял в том, что адсорбция красителя изменяла поверхностный потенциал и заряд частиц, а следовательно, и электрокинетический потенциал.

В последние десятилетия для анализа дисперсного состава, а также и для измерения дзета-потенциалов частиц коллоидов различной природы, включая биомедицинские коллоидные системы, стала широко использоваться совокупность методов динамического рассеяния света (доплеровская спектроскопия, спектроскопия оптического смещения, фотонная корреляционная спектроскопия, спектроскопия квазиупругого светорассеяния, лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС) и другие).

Справедливо считается [11, с. 38–40], что так называемый "оптический пинцет", т. е. воздействие кванта лазерного излучения с длиной волны 500 нм на микронную коллоидную частицу, легко реализуется, тогда как возможность применения в биологической среде "акустического пинцета" частоты 2 МГц (длина волны около  $10^6$  нм) гораздо более затруднительна.

Однако в отношении динамического светорассеяния отмечается [12], что "в коммерчески доступных приборах конечный результат не связыва-

ется с используемым алгоритмом получения этого результата". В других случаях [4, 5] отмечается, что в методологии ЛКС отсутствуют расчетные соотношения, позволяющие оценить экспериментальные результаты. В целом, несмотря на массовое использование приборов этого типа, преимущества и недостатки методов, основанных на измерениях динамического рассеяния света, описываются недостаточно убедительно. Например, в [13] среди преимуществ отмечаются следующие: небольшое время измерений (от единиц секунд до нескольких минут); широкий диапазон измеряемых размеров частиц (от 0.001 до единиц микрон); коммерческая доступность; крайне малое количество образца (пробы), необходимое для анализа. Считается также, что эта техника абсолютна, т. е. не требует калибровки по известным (эталонным) распределениям.

Среди недостатков отмечаются: низкое разрешение по размерам (1:1000) по сравнению со счетчиками частиц и микроскопией (1:10); отсутствие регулируемых параметров, используемых для калибровки.

Ниже обсуждаются некоторые фундаментальные положения, лежащие в основе метода.

### АНАЛИЗ МЕТОДОВ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Основной эффект светорассеяния состоит в получении доплеровского частотного сдвига, определяемого диффузионными смещениями частиц при воздействии на суспензию монохроматического (лазерного) излучения. Эти частотные сдвиги определяются в первую очередь кинетическими параметрами частиц, т. е. скоростью движения, подвижностью и коэффициентом диффузии, а при наличии электрического поля — зарядом и потенциалом частиц.

Для анализа диффузионных смещений множества рассеивающих свет частиц исторически необходимо было прежде всего записать автокорреляционную функцию положения (координат) частицы, а затем, в соответствии с фундаментальной теоремой Винера—Хинчина—Колмогорова, получить путем фурье-представления спектр рассеянного излучения.

В статистической механике для описания случайных перемещений частиц использовалась (см., например, [14]) автокорреляционная функция вида

$$G(\vec{r}, t) = \left( \frac{m}{2\pi t^2 k_B T} \right)^{3/2} \cdot \exp \left( -\frac{m(|\vec{r}|^2)}{2t^2 k_B T} \right),$$

выражающая в расчете на единицу объема вероят-

ность того, что частица, находящаяся при  $t=0$  в некоторой точке пространства, спустя промежуток времени  $t$  будет найдена в точке, находящейся на расстоянии  $|\bar{r}|$  от исходной точки. Здесь  $|\bar{r}|$  следует понимать как модуль среднего значения трехмерного перемещения частицы. Это выражение для автокорреляционной функции в точности соответствует максвелловскому распределению молекул по скоростям, принятому в молекулярно-кинетической теории газов:

$$f(\bar{V}) = \left( \frac{m}{2\pi t^2 k_B T} \right)^{3/2} \cdot \exp \left( -\frac{m|\bar{V}|^2}{2k_B T} \right),$$

где  $\bar{V} = |\bar{r}|/t$  — среднее значение модуля скорости частицы.

Фурье-преобразование автокорреляционной функции дает близкое к гауссовскому представление для спектральной плотности рассеянного излучения, т. е.

$$S(|K|, \Delta\omega) = \left( \frac{m}{2\pi |K|^2 k_B T} \right)^{1/2} \cdot \exp \left( -\frac{m\Delta\omega^2}{2|K|^2 k_B T} \right),$$

где  $|K|$  — модуль разности между волновыми векторами падающего и рассеянного излучения;  $\Delta\omega$  — разность круговых частот падающего и рассеянного света, зависящая от скорости движения рассеивающих свет частиц.

Включение в анализ коэффициента диффузии рассеивающих свет частиц с формальной точки зрения эквивалентно замене в последнем выражении, основанной на равенстве  $\Delta\omega^2/|K|^2 = D \cdot \Delta\omega$ , где  $D$  — коэффициент диффузии частиц. Формула Стокса—Эйнштейна  $D = k_B T / 6\pi r \eta = k_B T \cdot \mu_m$  для коэффициента диффузии определяет механическую подвижность частицы  $\mu_m$ , умножение которой на величину заряда частицы дает электрическую подвижность, а последующее умножение на напряженность поля — значение скорости движения частицы  $V = Q_p \mu_m E$ . Отметим здесь, что механическая подвижность частицы определяется только размерами, формой и вязкостью среды, тогда как скорость движения заряженной частицы определяется зарядом частицы и напряженностью электрического поля. Камминс и соавторы в статье [15], считающейся часто исходной для развития в последнее время технических средств [16], предназначенных для дисперсного анализа частиц на основе измерений динамического светорассеяния, не уточняют происхождение, характер и величину напряженности электрического поля. Счи-

тается, что тепловые флуктуации скорости частиц порождают не только доплеровский сдвиг и соответствующие изменения спектра рассеяния, но отражают также и неявно содержащиеся в них значения подвижности, заряда и электрокинетического потенциала частиц.

Соединение формализма теории тепловых флуктуаций и точных решений в теории рассеяния Ми, которая, как считается [17], для жидких коллоидных взвесей, равно как и для атмосферных коллоидов, дает наилучшие результаты, позволило получить пригодное для практического использования выражение для спектрального распределения рассеянного света в форме лоренцевской кривой [14]:

$$S(|K|, \Delta\omega) = \frac{1}{2\pi} \cdot \frac{2|K|^2 \cdot D}{\Delta\omega^2 + |K|^4 \cdot D^2},$$

где  $|K|^2 \cdot D$  — диффузионное уширение спектра рассеянного света.

В лазерной корреляционной спектроскопии, широко используемой в биологических исследованиях и в частности в нефелометрическом анализе, для автокорреляционной функции и спектральной плотности используются аналогичные по форме соотношения [18]:

$$G(\tau) = A \exp(-\Gamma \cdot \tau),$$

$$S(\omega) = (A \cdot \Gamma / \pi) / [(\omega_0 - qV)^2 + \Gamma^2],$$

где  $A$  — амплитуда флуктуаций светорассеяния, соответствующая диффузионному уширению  $\Gamma$  спектра;  $\tau = 1/2D_t q^2$  — радиус корреляции, т. е. время, в пределах которого поведение частиц статистически независимо;  $\omega_0$  — частота падающего света;  $qV$  — доплеровское смещение частоты падающего света на частицах, перемещающихся в процессе трансляционной диффузии ( $q$  — волновое число;  $V$  — скорость частицы). Диффузионное уширение определяется произведением  $\Gamma = D_t \cdot q^2$ , в котором коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  определяется приведенной выше формулой Стокса—Эйнштейна  $D_t = k_B T / 6\pi \eta R_h$  ( $R_h$  — гидродинамический радиус частиц). Волновое число  $q$  определяется соотношением  $q = (4\pi n / \lambda) \sin(\Theta/2)$ , где  $\lambda$  — длина волны падающего лазерного света;  $n$  — показатель преломления среды;  $\Theta$  — угол наблюдения рассеянного света, близкий к  $\pi$  (обратное светорассеяние). Выражение для коэффициента диффузии позволяет вычислить подвижность частиц,

исходя из равенства  $D_t = k_B T \cdot \mu$ , и далее — дзета-потенциал на основе равенства (формула Смолуховского)  $\mu = (2\varepsilon\varepsilon_0/3\eta)\zeta$ .

Янковский с соавторами [12] методом регуляризации Тихонова (матричное решение некорректных задач линейной алгебры) решали обратную спектральную задачу, которая сводится прежде всего к нахождению функции распределения частиц дисперсной фазы по размерам, а затем может быть использована для нахождения коэффициента диффузии, заряда и электрокинетического потенциала частиц. Авторы отмечают, что "даже при хорошем качестве приборной составляющей аппаратно-программного комплекса", обеспечивающей низкий шум и фон (наличие частот, не принадлежащих спектрам падающего и рассеянного света, например, за счет рассеяния света на молекулах растворителя), достаточно сложно восстановить детали многомодовых распределений частиц по размерам в коллоидных растворах. Особенно это касается сложных биологических растворов (в частности сыворотки крови), содержащих большое количество компонентов. Как отмечают авторы статьи, по этой причине большинство производителей наносайзеров ограничиваются использованием кумулянтов (чаще всего среднего и дисперсии, но также коэффициента асимметрии и эксцесса распределения). Таким образом, удастся, по замечанию тех же авторов, надежно описать тривиальное распределение частиц одного размера, либо распределение, состоящее не более чем из двух мод, далеко отстоящих друг от друга. Но уже в более ранних оценках [19] пригодности ЛКС для дисперсного анализа отмечалось, что обработка спектров рассеяния света для полидисперсных систем — обратная задача спектрального анализа с "плохо обусловленной матрицей".

#### СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТОДА ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

Приведем далее некоторые дополнительные соображения и расчетные выражения для оценки методов светорассеяния. Средний квадрат одномерного электродиффузионного смещения частицы определяется соотношением [20, с. 166–169]

$$\overline{(x - x_0)^2} = V_d^2 t^2 + 2Dt,$$

где дрейфовая (электрофоретическая) скорость определяется произведением подвижности и скорости движения частицы  $V_d = \mu E$ , а коэффициент диффузии — формулой Стокса—Эйнштейна  $D = k_B T / 6\pi\eta r$ . Подвижность, как уже отмечалось

выше, определяется соотношением  $\mu = (4\pi\varepsilon\varepsilon_0\zeta/6\pi\eta)f(ka)$ , в котором произведение  $4\pi\varepsilon\varepsilon_0\zeta = Q_p$  определяет заряд частицы;  $k$  — дебаевская длина экранирования;  $a$  — радиус коллоидной сферы;  $f(ka)$  — функция Генри концентрации электролита и радиуса иона. При  $ka \rightarrow 0$  выполняется условие  $f(ka) \rightarrow 1$  (предел Хюккеля—Онзагера), а при  $ka \rightarrow \infty$  — условие  $f(ka) \rightarrow 3/2$  (предел Гельмгольца—Смолуховского). Во втором случае ( $f(ka) = 3/2$ ) подвижность дается уже отмеченным выше выражением  $\mu = (2\varepsilon\varepsilon_0/3\eta)\zeta$ .

Таким образом, среднеквадратичная скорость электродиффузионного смещения равна

$$\begin{aligned} \frac{\sqrt{\overline{(x - x_0)^2}}}{t} &= \sqrt{V_d^2 + \frac{2D}{t}} = \\ &= \sqrt{\left(\frac{2\varepsilon\varepsilon_0\zeta f(ka)E}{3\eta}\right)^2 + \frac{2k_B T}{6\pi\eta r t}}. \end{aligned}$$

Из полученного соотношения непосредственно следует, что диффузионная составляющая скорости определяется временем наблюдения  $t$ , тогда как дрейфовая скорость определяется только параметрами среды (вязкость, поляризуемость, напряженность поля) и параметрами движущейся частицы (размер, заряд и дзета-потенциал). Понятно, что для оценки дрейфовой скорости необходимо пренебречь вторым слагаемым под квадратным корнем в правой части выражения, т. е. считать время наблюдения достаточно большим, как это имеет место в практическом электрофорезе.

В практике измерений светорассеяния время измерения, как было отмечено выше, составляет интервал от нескольких секунд до нескольких минут, что само по себе составляет большое преимущество метода по сравнению с электрофорезом. Однако это время не рассматривается как необходимое условие проведения измерительного процесса, а сами измерения непосредственно не связаны с отмеченными параметрами (размер, заряд, электрическая подвижность и электрокинетический потенциал частиц). Формализм лазерной корреляционной спектроскопии не содержит набора параметров, определяющих электрокинетический потенциал, т. е. характера электролита инкубационной среды, вязкости этой среды, структуры двойного электрического слоя, характера поверхности частиц, включая способность поляризоваться, т. е. именно то свойство, которое определяет рассеяние Ми. Хотя диффузионное уширение спектра рассеянного света, несомненно, отра-

жает все свойства коллоидной системы, его затруднительно непосредственно включить в формализм теории Гюи—Чапмена—Штерна. Отсюда понятно замечание Янковского и соавторов [12], отмеченное выше, что результат измерения не связан с алгоритмом получения этого результата.

Уже достаточно давно для аэродисперсных коллоидов (аэрозолей) было показано [20, с. 166–169], что ошибка при определении размера частиц по броуновскому движению может быть в десятки раз больше, чем по скорости направленного движения (например, седиментации), и лишь для очень мелких частиц ( $< 0.1$  мкм) броуновские флуктуации скорости могут быть использованы для оценки размеров частиц. Ошибка оказывалась еще больше при измерениях скорости движения заряженных частиц в сильном электрическом поле. Эти выводы очевидны, поскольку для малых частиц скорость таких флуктуаций становится значительно больше скорости упорядоченного движения и быстро возрастает с уменьшением размеров.

Можно полагать, что для жидкостных коллоидов такие ошибки еще больше, поскольку броуновские смещения частиц гораздо меньше и, следовательно, более трудно измеримы.

Недифузионный характер движения при очень малых временах не только газовых молекул, но и рассеивающих свет коллоидных частиц стал интересен уже сравнительно давно [21]. Совсем недавно баллистическое (неброуновское) движение одиночной частицы в наносекундном временном интервале непосредственно наблюдалось впервые, как утверждают авторы статьи [22], в оптической ловушке с полосой пропускания 75 МГц. При этих исследованиях положение частицы измерялось с точностью в единицы ангстрем.

В целом измерения светорассеяния, как и лежащие в его основе диффузионные перемещения рассеивающих свет частиц, имеют статистическую природу и в любом случае дают усредненные результаты, тогда как размер, заряд, дзета-потенциал и другие детерминированные параметры частиц определенного сорта могут быть в принципе точно измерены.

### ПРЕДЛАГАЕМЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ

В этой статье рассматривается способ, родственный электрофорезу, измерения размеров частиц и электрокинетического потенциала на основе непосредственного измерения скорости частиц в электрическом поле.

Используем в качестве основного параметра частиц время кинетической релаксации, характеризующее длительность установления стационарного движения частицы в вязкой среде при действии электрической силы. Для заряженной частицы, несущей электрический заряд  $Q_p$ , установившаяся скорость дрейфа  $V_d = \mu E$  ( $\mu$  — подвижность частицы) в электрическом поле напряженности  $E$  дается соотношением Стокса  $6\pi r\eta V_d = Q_p E$ , не содержащем, однако, время в явном виде. Поскольку кинетические параметры не зависят от характера действующей на частицы силы, время кинетической релаксации  $\tau_k$  можно определить, если воспользоваться механическими аналогиями  $\mu E \rightarrow g\tau$  и  $Q_p E \rightarrow mg$ , в которых  $g\tau$  и  $mg$  означают соответственно скорость седиментации и вес частицы, имеющей плотность  $\rho$ . Тогда время кинетической релаксации определится формулой  $\tau_k = (2r^2\rho/9\eta)$ , общеупотребительной в механике аэрозолей. Например, для частицы радиуса  $r = 1$  мкм, плотностью  $\rho = 10^3$  кг·м<sup>-3</sup> (вода), движущейся в среде с вязкостью  $\eta = 10^{-3}$  Па·с (вода), это время равно  $\tau_k \cong \cong 0.2$  мкс. Произведение  $l_i = V_0 \cdot \tau_k$  определяет инерционный пробег частицы после окончания действия электрической силы. Для микронной частицы, имеющей дзета-потенциал  $\zeta = 30$  мВ и заряд  $Q_p = 2000 e$ , движущейся в электрическом поле напряженности  $E = 2$  В·см<sup>-1</sup> со скоростью около  $V = 3$  мкм·с<sup>-1</sup>, инерционный пробег составляет не более  $0.01$  Å.

Отметим также, что дебаевское время релаксации  $\tau_d = 4\pi\eta^* a^3/k_B T$ , характеризующее скорость поляризации частицы, определяется формулой Дебая  $\tau_d = 4\pi\eta^* a^3/k_B T$ , в которой  $\eta^*$  — микровязкость дисперсионной среды,  $a$  — радиус сферической дипольной молекулы. Показано экспериментально, что дебаевское время релаксации ( $10^{-12} \div 10^{-9}$  с) существенно меньше времени кинетической релаксации и, кроме того, определяется макроскопическим значением вязкости [23]. Ниже описаны элементы установки, предназначенной для реализации способа и методики измерений.

Для измерений использовалась дифференциальная кювета, содержащая два близко расположенных цилиндрических канала, диаметр и длина которых были равны соответственно  $d_k = 7$  мм;  $l_k = 40$  мм. Оба канала заполнялись

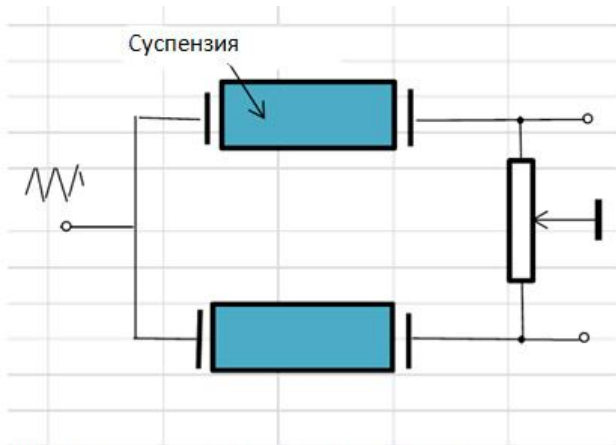


Рис. 1. Упрощенная схема измерительного моста

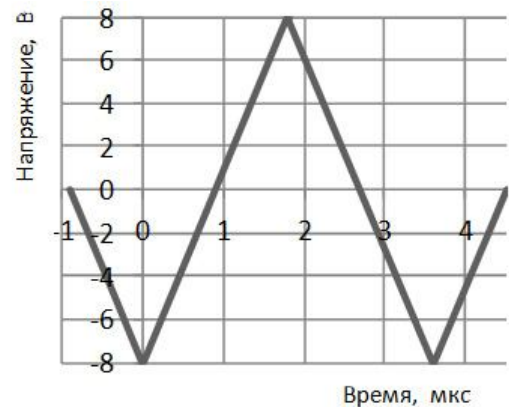


Рис. 2. Форма и параметры напряжения, питающего измерительную мостовую схему.

Длительность импульса  $\tau_{\text{и}} = 3.6 \text{ мкс}$ ;  
амплитуда  $U_{\text{м}} = 8 \text{ В}$ .

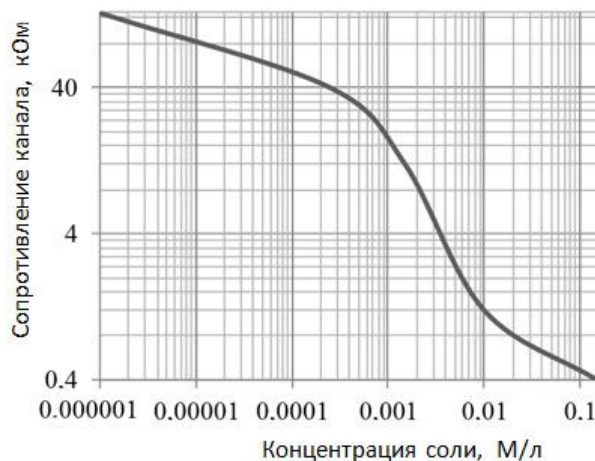


Рис. 3. Импульсное электрическое сопротивление (кОм) проводящего канала для водного электролита NaCl в зависимости от концентрации соли

электролитом (NaCl) и включались в качестве двух смежных плечей в измерительный мост, схема которого представлена на рис. 1. Мост питался импульсным напряжением, форма и параметры которого показаны на рис. 2.

Два других смежных плеча представляют собой низкоомный потенциометр (50 Ом) с заземленной средней точкой, использовавшийся для балансировки моста. Практически балансировка моста могла быть выполнена с точностью до напряжения не более 1 мВ, измеренного в диагонали моста. Зависимость электрического сопротивления (импеданса) канала от концентрации NaCl приведена на рис. 3. Верхняя граница концентрации

( $0.15 \text{ М} \cdot \text{л}^{-1}$ ) соответствует физиологическому раствору и наименьшему сопротивлению канала; нижняя граница примерно соответствует дистиллированной воде; длительность импульса  $\tau_{\text{и}} = 3.6 \text{ мкс}$ ; амплитуда импульса  $U_{\text{м}} = 8 \text{ В}$ . Диаметр и длина канала соответственно  $d_{\text{к}} = 7 \text{ мм}$ ;  $l_{\text{к}} = 40 \text{ мм}$ .

Таким образом, небольшое сопротивление уравновешивающего мост потенциометра позволяет хорошо выполнить балансировку даже при наименьшем сопротивлении канала (физиологический раствор). После уравновешивания в один из каналов добавлялась исследуемая суспензия (рис. 1).

В питающую диагональ моста подавалось линейно изменяющееся напряжение  $U(t) = k_n \cdot t$ , представляющее собой антипериодическую функцию времени  $U(t + T/2) = -U(t)$  амплитуды  $U_m = 8\text{В}$  и периода  $T = \tau_n$  с коэффициентом пропорциональности, равным  $k_n = U_m / (\tau_n / 4)$ . Форма и параметры питающего напряжения показаны на рис. 2. Фурье-спектр такого сигнала отображается суммой

$$f(t) = \frac{8U_m}{\pi^2} \sum_{k=1}^{\infty} (-1)^{\frac{k-1}{2}} \frac{\sin k\omega t}{k^2}$$

$(k = 1, 3, 5, \dots; \omega = 2\pi/T)$

и содержит знакопеременные нечетные  $\sin$ -гармоники, быстро уменьшающиеся по амплитуде (в отношениях 6.48 : 0.72 : 0.26 : 0.13 : 0.08 и т. д.). Для сравнения отметим, что для меандра с фурье-спектром

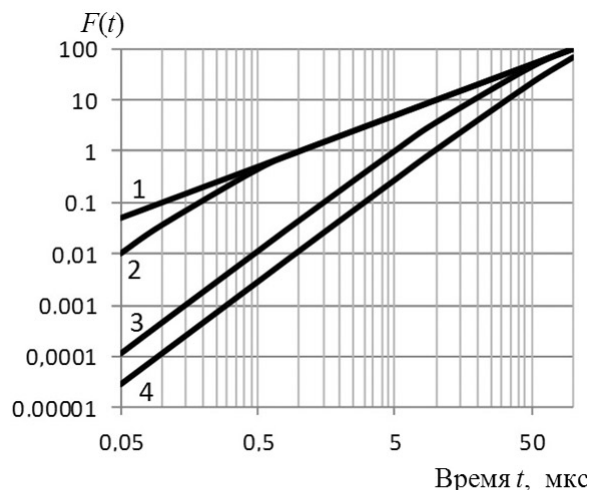
$$f(t) = \frac{4U_m}{\pi} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\sin k\omega t}{k}$$

$(k = 1, 3, 5, \dots; \omega = 2\pi/T)$

содержание высших гармоник существенно выше. Генератор питающего напряжения  $U_{\text{пит}}$  представлял собой самовозбуждающуюся петлевую схему, содержащую последовательно соединенные регенеративный элемент (триггер Шмитта) и интегратор, выполненные на основе высокоскоростных ( $V_u \geq 50\text{В/мкс}$ ) операционных усилителей.

Инерционное торможение заряженной частицы и реальная скорость ее перемещения при импульсном воздействии  $U(t) = k_n \cdot t$  электрического поля определяются зависящим от времени экспоненциальным множителем  $[1 - \exp(-t/\tau_k)]$ , так что начальная скорость движения при  $t = 0$  (скачок напряженности поля при перемене полярности) равна нулю, а разложение в степенной ряд при малых временах ( $t \ll \tau_k$ ) дает почти линейное возрастание скорости. Множитель  $[1 - \exp(-t/\tau_k)]$ , получающийся путем интегрирования экспоненты  $\exp(-t/\tau_k)$ , является общим для многих процессов. Произведение  $F(t) = t[1 - \exp(-t/\tau_k)]$  определяет запаздывающий по времени отклик системы (движущейся в электрическом поле частицы), т. е. эквивалентно автокорреляционной функции (свертке), зависящей от времени напряженности поля, определяющей реальную скорость движения

частицы. Нетрудно подсчитать, что при заданной (как отношение разности потенциалов к длине канала) напряженности поля для достижения стационарной скорости требуется промежуток времени  $(4 \div 5)\tau_k$ . Таким образом, треугольный импульс длительностью  $\tau_n = 1.8\text{мкс}$  (рис. 2) следует рассматривать как оптимальный для частиц радиуса  $r \approx 1.5\text{мкм}$ . На рис. 4 показаны автокорреляционные функции в зависимости от радиуса частиц. Из этого рисунка, в частности, следует, что для исследования микронных частиц длительность импульса электрического поля должна быть не менее  $1\text{мкс}$ , а для десятимикронных частиц — не менее  $100\text{мкс}$ . Рис. 4 показывает также, что хорошее разрешение для относительно крупных частиц (1–20 мкм) получается на временном отрезке менее  $100\text{мкс}$ , а для субмикронных частиц (0.1–1 мкм) — на отрезке, не превышающем  $1\text{мкс}$ . Немного ниже показано, что для усреднения (необходимого для расчетов) напряженности электрического поля должно выполняться условие  $(\tau_n/4) \geq (4 \div 5)\tau_k$ . Таким образом, оба условия выполняются при равенстве  $(\tau_n/4) = (4 \div 5)\tau_k$ .



**Рис. 4** Зависимость автокорреляционной функции  $F(t) = t[1 - \exp(-t/\tau_k)]$  для частиц различного радиуса  $r$ .  
 1 —  $r = 0.1\text{мкм}$  ( $\tau_k = 2.2 \cdot 10^{-3}\text{мкс}$ ),  
 2 —  $r = 1\text{мкм}$  ( $\tau_k = 0.22\text{мкс}$ ),  
 3 —  $r = 10\text{мкм}$  ( $\tau_k = 22\text{мкс}$ ),  
 4 —  $r = 20\text{мкм}$  ( $\tau_k = 88\text{мкс}$ )

Колебательное движение частицы определяется знаком питающего напряжения (рис. 2). В течение положительного полупериода напряженность поля и скорость частицы возрастают сначала от нуля до максимального значения, после чего падают и при выполнении условия  $(\tau_n/4) \geq (4 \div 5)\tau_k$  становятся нулевыми к началу отрицательного полупериода. Далее точно так же начинается ускоренное движение в обратном направлении.

Для оценки средних значений разности потенциалов и соответственно напряженности поля достаточно выполнить интегрирование для половины  $(0 \leq t \leq \tau_n/4)$  положительного полупериода питающего напряжения:

$$U_{\text{пнт.}}^{\text{ср.}} = \frac{U_m}{(\tau_n/4)^2} \int_0^{\tau_n/4} t [1 - \exp(-t/\tau_n)] dt.$$

Результат интегрирования записывается в виде

$$U_{\text{пнт.}}^{\text{ср.}} = U_m \left[ \frac{1}{2} - \left( \frac{\tau_k}{\tau_n/4} \right)^2 \left( 1 - e^{-\tau_n/4\tau_k} \left( \frac{\tau_n}{4\tau_k} + 1 \right) \right) \right].$$

Это выражение показывает, что при возрастании длительности импульса усредненное напряжение монотонно приближается к предсказуемому уровню  $(1/2)$  от максимального. В таблице приводятся значения усредняющего коэффициента в зависимости от отношения  $\tau_n/\tau_k$  и погрешности усреднения в процентах.

Из таблицы следует, например, что при действии короткого импульса на относительно тяжелую частицу ( $\tau_n = 0.5\tau_k$ ) эффективная напряженность поля мала (0.04 от среднего), а вклад частиц этого сорта в электрофоретический ток также мал и может быть сделан еще меньше. Эти соображения становятся важными при анализе полидисперсных коллоидов.

Таким образом, установившееся движение частицы заданного времени релаксации  $\tau_k(r)$  в электрическом поле постоянной (усредненной) напряженности соответствует условию  $(\tau_n/2) \geq (4 \div 5)\tau_k$ . Отметим еще раз, что для сохранения

хорошей разрешающей способности это условие должно сопоставляться с противоположным по смыслу условием  $(\tau_n/2) \leq (4 \div 5)\tau_k$  и соответственно с вытекающим отсюда равенством  $(\tau_n/2) = (4 \div 5)\tau_k$ . Это условие непосредственно просматривается на рис. 4.

Порядок измерения и расчетов электрокинетического потенциала для наиболее простого случая монодисперсного коллоидного раствора сводится к следующему. После балансировки моста и добавления исследуемой суспензии ненулевая разность потенциалов в измерительной диагонали моста  $U_d$  определяется только электрофоретическим током частиц  $I_{\text{эф}}$ , протекающим в соответствующем плече балансирующего резистора  $R_0$ . Этот ток определяется соотношением  $I_{\text{эф}} = U_d / (R_0/2)$ , а соответствующая плотность тока — соотношением  $j_{\text{эф}} = 2U_d / (R_0 S_k)$  ( $S_k$  — площадь поперечного сечения канала). Далее из формулы (закон Ома в дифференциальной форме)  $j_{\text{эф}} = \sigma_k \cdot E$  ( $E = U_{\text{пнт.}} / l_k$  — напряженность электрического поля в канале) следует найти проводимость канала  $\sigma_k = 2U_d \cdot l_k / (R_0 \cdot S_k \cdot U_{\text{пнт.}})$ .

Плотность электрофоретического тока, используя заряд одиночной частицы  $Q_p$  и концентрацию заряженных частиц  $n$ , можно определить также на основании равенства  $j_{\text{эф}} = Q_p \cdot n \cdot \mu_s \cdot E$ , где произведение  $\mu_s \cdot E$  дает скорость движения частицы, а произведение  $Q_p \cdot n$  — объемную плотность заряда движущихся частиц. Равенство

$$\frac{2U_d \cdot l_k}{R_0 \cdot S_k \cdot U_{\text{пнт.}}} = \zeta^2 \left[ 4\pi (\epsilon \epsilon_0)^2 \cdot r \cdot n \cdot (1/\eta) \right]$$

позволяет рассчитать для монодисперсного коллоидного раствора с известным радиусом частиц значение электрокинетического потенциала:

$$\zeta = \left( \frac{2U_d l_k \eta}{4\pi (\epsilon \epsilon_0)^2 R_0 S_k U_{\text{пнт.}} r n} \right)^{1/2}.$$

Значения усредняющего коэффициента и погрешности усреднения в зависимости от нормированной длительности электрического импульса

$\tau_n/\tau_k$	0.5	1	2	4	8	16	24	32	40
Коэф. уср.	0.040	0.076	0.139	0.236	0.351	0.443	0.473	0.484	0.490
Погр. уср., %	96.0	92.4	36.1	26.4	14.9	5.7	2.7	1.6	1.0



Для совокупности параметров  $l_k, \eta, \varepsilon, \varepsilon_0, R_0, S_k, U_{\text{пит}}$  целесообразно ввести, используя принятые выше обозначения, коэффициент пропорциональности

$$k_\zeta = 2l_k \eta / 4\pi (\varepsilon \varepsilon_0)^2 R_0 S_k U_{\text{пит}} \left[ \text{В/м}^2 \right].$$

Еще три параметра, т. е. измеренная разность потенциалов  $U_d$ , известные значения радиуса частицы  $r$  и объемной концентрации частиц  $n$ , определяют множитель  $U_d/(rn)$ , имеющий размерность  $[\text{В} \cdot \text{м}^2]$ . Таким образом, формула для расчета электрокинетического потенциала частицы приобретает вид

$$\zeta = \sqrt{k_\zeta \cdot U_d / (r \cdot n)}.$$

Анализ полидисперсных коллоидов, в особенности в тех случаях, когда составляющие фракции имеют близкие размеры, как всегда, представляет существенные трудности. Технически наиболее просто использовать изложенные выше методы и расчеты для нескольких последовательных (проводимых одновременно) измерений, увеличивая дискретными ступенями период следования и соответственно длительность импульса питающего напряжения. Границы этих ступеней должны перекрываться. Число ступеней, равно как и интервалы дискретизации, определяются фракционной структурой коллоида, если она известна, или принимаются равными. Увеличение электрофоретического тока на каждом шаге этого процесса определяется взвешенными вкладами всех составляющих коллоида, причем эти вклады, как отмечено выше, могут быть оценены заранее. Кроме того, для придания измерительной системе свойства адаптивности при увеличении тока должен уменьшаться интервал дискретизации, причем тем больше, чем быстрее возрастает ток. Для алгоритмизации процесса целесообразно использовать такие корреляционные методы, как "частичное перекрытие — сложение" (overlap-add) [24], используемые в самых разных приложениях, например для измерения радиосигналов на фоне шумов или для распознавания сигналов в нервных сетях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Остроумова О.С., Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В.* Ионные каналы в модельных липидных мембранах. СПб.: Изд. Ин-та цитологии РАН, 2012. 164 с.
2. *Paluch M.* Electrical properties of free surface of water and aqueous solutions // *Advances in colloid and interface science*. 2000. January. Vol. 84, no. 1-3. P. 27–45.
3. *Diaz S., Amalfa F., Biondi de Lopez A.C., Disalvo E.A.* Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers // *Langmuir*. 1999. Vol. 15, no. 15. P. 5179–5182. Doi: 10.1021/la981235f.
4. *Лобаскин В.А.* Моделирование межчастичных взаимодействий в коллоидных дисперсиях. Дис. ... д-ра ф.-м.н. Челябинск: Изд. ЧГУ, 2004. 283 с.
5. *Здраевская О.Н., Дюк В.А., Эмануэль В.Л., Новик В.И.* Диагностическая значимость лазерной корреляционной спектроскопии при воспалительных и опухолевых заболеваниях легких // *Клиническая лабораторная диагностика*. Научно-практический журнал. 2006. № 5. С. 21.
6. *Sze A., Erickson D., Ren L., Li D.* Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow // *J. of Colloid and Interface Science*. 2003. Vol. 261, no. 2. P. 402–410.
7. *Аладашвили Н.З.* Электрофоретическая подвижность эритроцитов периферической крови детей с неспецифическими воспалительными заболеваниями. Автореф. дисс. ... к.б.н. М.: Изд. Гематолог. научн. центр РАМН, 2005.
8. *Kuzniatsova T., Kim Y., Shqau K., Prabir K., Dutta P.K., Verweij H.* Zeta potential measurements of zeolite Y: Application in homogeneous deposition of particle coatings // *Microporous and Mesoporous Materials*. 2007. Vol. 103, no. 1–3. P. 102–107. Doi: 10.1016/j.micromeso.2007.01.042.
9. *Dukhin A.S., Goetz Ph.* Ultrasound for characterizing colloids. Particle sizing, zeta potential, rheology. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2002. 425 p..
10. *Варехов А.Г.* Способ определения электрокинетического потенциала коллоидных частиц. Пат. SU № 1658042 // *Бюлл. изобр.* 1991. № 23.
11. *Стецюра И.Ю.* Дистанционно перемещаемые сенсоры на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния света для исследований in vitro. Дис. ... к.ф.-м.н. Саратов: Изд. СНИГУ им. Н.Г. Чернышевского, 2016. 134 с.
12. *Янковский Г.М., Кузнецов Д.В., Кондаков С.Э., Мельников М.Я.* Особенности решения обратной задачи оптического смешения методом регуляризации Тихонова для анализа состава полидисперсных взвесей наночастиц // *Вестник МГУ, сер. 2, Химия*. 2013. Т. 54, № 5. С. 278–287.
13. *Tscharnuter W.* Photon correlation spectroscopy in particle sizing // *Encyclopedia of Analytical Chemistry* / R.A. Meyers (Ed.). J. Wiley & Sons, Chichester, 2000. P. 5469–5485.
14. *Fiocco G., De Wolf J.B.* Frequency spectrum of laser echoes from atmospheric constituents and determination of the aerosol content of air // *J. of the Atmospheric Sciences*. 1968. Vol. 25, no. 5. P. 488–496.

15. *Cummins H.Z., Knable N., Yeh Y.* Observations of diffusion broadening of Rayleigh scattered light // *Phys. Rev. Letters*. 1964. Vol. 12, no. 6. P. 150–153.
16. *Xu R.* Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement // *Particology*. 2008. Vol. 6. P. 112–115.
17. *Дейрменджан Д.* Рассеяние электромагнитного излучения сферическими полидисперсными частицами. М.: Изд. Мир, 1971. 165 с.
18. *Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин Л.А.* Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова Думка, 1987. 256 с.
19. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов / Под ред. Г. Камминса и Э. Пайка. М.: Изд. Мир, 1978. 583 с.
20. *Фукс Н.А.* Механика аэрозолей. М.: Изд. АН СССР, 1955. 351 с.
21. *Weitz D.A., Pine D.J., Pusey P.N., Tough R.J.A.* Nondiffusive Brownian motion studied by diffusing-wave spectroscopy // *Physical Review Letters*. 1989. Vol. 63, no. 16. P. 1747–1750. Doi: 10.1103/PhysRevLett.63.1747.
22. *Huang R., Chavez I., Taute K.M., Lukic B., Jeney S., Razi-Zen M.G., Florin E.-L.* Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid // *Nature Physics*. 2011. Vol. 7, no. 7. P. 576–580. Doi: 10.1038/nphys1953.
23. *Эме Ф.* Диэлектрические измерения. М.: Изд. Химия, 1967. 223 с.
24. *Bell A.J., Sejnowski T.J.* An information-maximisation approach to blind separation and blind deconvolution // *Neural Computation*. 1995. Vol. 7, no. 6. P. 1129–1159.

**Санкт-Петербургский Государственный университет аэрокосмического приборостроения**

Контакты: *Варехов Алексей Григорьевич*,  
varekhov@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 20.02.2017

## THE ELECTROKINETIC POTENTIAL MEASUREMENTS OF BIOCOLLOIDS PARTICLES

A. G. Varekhov

*Saint-Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, Russia*

There the ways of measurements of an electrokinetic potential (zeta-potential) of colloid particles and, in particular, a problem associated with use of the classical electrophoresis are briefly discussed in the article. The methods and devices based on measurements of a light scattering of particles and became a frequent practice now are analyzed most extensively. It is shown that the Doppler spectroscopy of the light scattered by particles is accompanied by difficulties not only by the analyse of particle sizes, in particular, for polydisperse colloids, but also, first of all, while measuring the zeta-potential because it is defined not so much by the size, as totality of peripheral parameters of the particles. The way of measurement near to a classical electrophoresis is offered, where the sign-variable electric field is used, the drift length of the particles and a difference of electric potentials are minimized.

*Keywords:* zeta-potential, electrophoresis, dynamic light scattering, modified electrophoretic method

### REFERENCES

1. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Malev V.V., Shagina L.V. *Ionnye kanaly v model'nyh lipidnyh membranah* [Ion channels in model lipidic membranes]. Saint-Petersburg, Institute of Cytology RAS, 2012. 164 p. (In Russ.).
2. Paluch M. Electrical properties of free surface of water and aqueous solutions. *Advances in colloid and interface science*, 2000, January, vol. 84, no. 1-3, pp. 27–45. Doi: 10.1016/S0001-8686(99)00014-7.
3. Diaz S., Amalfa F., Biondi de Lopez A.C., Disalvo E.A. Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers. *Langmuir*, 1999, vol. 15, no. 15, pp. 5179–5182. Doi: 10.1021/la981235f.
4. Lobaskin V.A. *Modelirovanie mezhchastichnyh vzaimodejstvij v kolloidnyh dispersiyah*. Diss. dokt. fiz.-mat. nauk [Modeling of interparticle interactions in colloidal dispersions. Dr. phys. and math. sci. diss.]. Chelyabinsk, South Ural State University, 2004. 283 p. (In Russ.).
5. Zdraevskaya O.N., Dyuk V.A., Ehmanuehl' V.L., Novik V.I. [The diagnostic importance of laser correlation spectroscopy at inflammatory and tumoral diseases of lungs]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Nauchno-prakticheskij zhurnal* [Clinical laboratory diagnostics. Scientific and practical journal], 2006, no. 5, pp. 21. (In Russ.).
6. Sze A., Erickson D., Ren L., Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. of Colloid and Interface Science*, 2003, vol. 261, no. 2, pp. 402–410. Doi: 10.1016/S0021-9797(03)00142-5.
7. Aladashvili N.Z. *Elektroforeticheskaya podvizhnost' ehritrocytov perifericheskoy krovi detej s nespecificheskimi vospalitel'nymi zabolevaniyami*. Autoref. diss. kand. biol. nauk. [Elektroforetic mobility of erythrocytes of peripheral blood of children with nonspecific inflammatory diseases. Cand. biol. sci. diss. abstr.] Moscow, *Hematologic scientific center RAMS*, 2005. (In Russ.).
8. Kuzniatsova T., Kim Y., Shqau K., Prabir K., Dutta P.K., Verweij H. Zeta potential measurements of zeolite Y: Application in homogeneous deposition of particle coatings. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2007, vol. 103, no. 1–3, pp. 102–107. Doi: 10.1016/j.micromeso.2007.01.042.
9. Dukhin A.S., Goetz Ph. *Ultrasound for characterizing colloids. Particle sizing, zeta potential, rheology*. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2002. 425 p.
10. Varekhov A.G. *Sposob opredeleniya ehlektrokineticheskogo potenciala kolloidnyh chastiz* [Way of determination of electrokinetic potential of colloidal particles]. Copyright certificate SU 1658042. Bulletin of inventions, 1991, no. 23. (In Russ.).
11. Stecyura I.Yu. *Distancionno peremeshchaemye sensory na osnove ehffekta gigantskogo kombinacionnogo rasseyaniya sveta dlya issledovaniy invitro*. . Diss. kand. fiz.-mat. nauk [Remotely the moved sensors on the basis of effect of huge combinational dispersion of light for the researches invitro. Cand. phys. and math. sci. diss.]. Saratov, Saratov State University, 2016. 134 p. (In Russ.).
12. Yankovskii G.M., Kuznetsov D.V., Kondakov S.E., Melnikov M.Y. [Solution of the inverse problem of light beating spectroscopy using tikhonov regularisation method for the analysis of polydisperse suspensions of nanoparticles]. *Vestnik MGU, ser. 2, Himiya* [MSU Vestnik, Series 2. Chemistry], 2013, vol. 54, no. 5, pp. 278–287. (In Russ.).
13. Tscharnuzer W. Photon correlation spectroscopy in particle sizing. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), J. Wiley & Sons, Chichester, 2000,

- pp. 5469–5485.
14. Fiocco G., De Wolf J.B. Frequency spectrum of laser echoes from atmospheric constituents and determination of the aerosol content of air. *J. of the Atmospheric Sciences*, 1968, vol. 25, no. 5, pp. 488–496. Doi: 10.1175/1520-0469(1968)025<0488:FSOLEF>2.0.CO;2.
  15. Cummins H.Z., Knable N., Yeh Y. Observations of diffusion broadening of Rayleigh scattered light. *Phys. Rev. Letters*, 1964, vol. 12, no. 6, pp. 150–153. Doi: 10.1103/PhysRevLett.12.150.
  16. Xu R. Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, 2008, vol. 6, pp. 112–115. Doi: 10.1016/j.partic.2007.12.002.
  17. Dejmendzhan D. *Rasseyaniye ehlektromagnitnogo izlucheniya sfericheskimi polidispersnymi chasticami* [Dispersion of electromagnetic radiation spherical polydisperse particles]. Moscow, Mir Publ., 1971. 165 p. (In Russ.).
  18. Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A.V., Noskin L.A. *Lazernaya korrelyacionnaya spektroskopiya v biologii* [Laser correlation spectroscopy in biology]. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1987. 256 p. (In Russ.).
  19. Kammins G., Pajk E., eds. *Spektroskopiya opticheskogo smesheniya i korrelyaciya fotonov* [Spectroscopy of optical mixture and correlation of photons]. Moscow, Mir Publ., 1978. 583 p. (In Russ.).
  20. Fuks N.A. *Mekhanika aerorozlej* [Mechanics of aerosols]. Moscow, AN SSSR, 1955. 351 p. (In Russ.).
  21. Weitz D.A., Pine D.J., Pusey P.N., Tough R.J.A. Nondiffusive Brownian motion studied by diffusing-wave spectroscopy. *Physical Review Letters*, 1989, vol. 63, no. 16, pp. 1747–1750. Doi: 10.1103/PhysRevLett.63.1747.
  22. Huang R., Chavez I., Taute K.M., Lukic B., Jeney S., Raizen M.G., Florin E.-L. Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid. *Nature Physics*, 2011, vol. 7, no. 7, pp. 576–580. Doi: 10.1038/nphys1953.
  23. Eme F. *Dielektricheskie izmereniya* [Dielectric measurements]. Moscow, Chemistry Publ., 1967. 223 p. (In Russ.).
  24. Bell A.J., Sejnowski T.J. An information-maximisation approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Computation*, 1995, vol. 7, no. 6, pp. 1129–1159. Doi: 10.1162/neco.1995.7.6.1129.

Contacts: *Varechov Aleksey Grigor'evich*,  
varekhov@mail.ru

Article received in edition: 20.02.2017