

Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова

Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

Кузнецова Катерина Сергіївна

УДК 621.372.413

ДИСЕРТАЦІЯ

МІКРОХВИЛЬОВА ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЯ СИЛЬНО ПОГЛИНАЮЧИХ РІДИН НА ОСНОВІ ШАРУВАТИХ ЕЛЕКТРОДИНАМІЧНИХ СТРУКТУР

104 – Фізика та астрономія

10 – Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К.С. Кузнецова

Науковий керівник: Єременко Зоя Єлівна, доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Кузнецова К. С. Мікрохвильова діелектрометрія сильно поглинаючих рідин на основі шаруватих електродинамічних структур. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 104 «Фізика та астрономія» (10 – Природничі науки). – Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України, Харків, 2023.

Робота присвячена розв’язанню актуальної науково-прикладної задачі виявлення особливостей поширення електромагнітних хвиль у шаруватих електродинамічних структурах, що складаються з круглого металевого хвилеводу, в якому міститься циліндричний діелектричний стрижень, оточений шаром сильно поглинаючої рідини. Визначено діелектричні властивості водних розчинів деяких біологічно активних речовин (антибіотики, глюкоза, сироватковий альбумін людини, імуноглобулін G людини, водні та сольові розчини білку альбуміну з додаванням глюкози, дифтерійний анатоксин) та розчинів, в яких відбувається біохімічна реакція, методом диференційної діелектрометрії в мікрохвильовому діапазоні частот, в області частотної дисперсії комплексної діелектричної проникності води. Вивчено вплив зміни як геометричних розмірів структури вимірювальної комірки, так і діелектричних властивостей сильно поглинаючої рідини, яка є одним із шарів хвилевідних шаруватих структур, на характеристики поширення (коефіцієнти фази та загасання) електромагнітних хвиль у цих структурах. Встановлено, що дійсна та уявна частини комплексної діелектричної проникності досліджуваних розчинів ряду біологічно активних речовин зменшуються зі збільшенням концентрації розчинених речовин через зменшення кількості вільних молекул води в розчині. Удосконалено метод визначення комплексної діелектричної проникності сильно поглинаючих рідин у

міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль за допомогою оптимізованої вимірювальної кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра. Представлено новий підхід застосування діелектрометра та методику для безперервного моніторингу перебігу ферментативної реакції гідролізу білка, що засновано на визначенні значень комплексної діелектричної проникності ферментативних реакційних сумішей білку із ферментом. Показано, що значення комплексної діелектричної проникності реакційної суміші з часом реакції гідролізу білка збільшуються та наближається до значень комплексної діелектричної проникності води, через поступове зниження концентрації білку.

В ході проведених досліджень отримано результати, які представляють **наукову новизну**:

1) Вперше класифіковано моди круглого металевого хвилеводу з центральним діелектричним стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючої рідини, що не мають фіксованих частот відсікання мод, а коефіцієнт загасання для хвилі HE_{11} має найменші значення поміж інших типів хвиль у широкому діапазоні частот.

2) Удосконалено конструкцію кювети діелектрометра, яка не потребує референсної рідини і складається з двох комірок різної довжини, в яких компенсовано вплив дифракційних ефектів на краях комірок, що мають аксіальну симетрію та достатньо тонкий шар досліджуваної рідини, внаслідок чого підвищено чутливість визначення комплексної діелектричної проникності рідин.

3) Дістало подальший розвиток експериментальне визначення значень комплексної діелектричної проникності водних розчинів ряду біологічно активних речовин (антибіотики, глюкоза, сироватковий альбумін людини, імуноглобулін G людини, водні та сольові розчини білку альбуміну з додаванням глюкози, дифтерійний анатоксин), які зменшуються в залежності від збільшення концентрації біологічно активних речовин через зменшення кількості вільних молекул води в розчині. Ці результати підтверджено методом молекулярно-

динамічного моделювання згідно збільшення гідратації та часу існування водневих зв'язків між молекулами води з молекулами білка та глюкози, та мають добре узгодження з результатами, отриманими відомим фармакопейним методом аналізу фармацевтичних препаратів – методом UV-Vis спектрофотометрії.

4) Вперше запропоновано методику моніторингу ферментативної реакції гідролізу білків альбуміну та імуноглобуліну G людини з трипсином у реальному часі через визначення комплексної діелектричної проникності цих розчинів, що знайшло підтвердження методом спектрофотометрії. На відміну від класичної методики, ця реакція не потребує переривання.

Метою роботи є удосконалення методів визначення діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин за допомогою шаруватих електродинамічних структур. Для досягнення зазначеної мети поставлено та розв'язано наступні задачі:

1) Експериментально отримати дані діелектричних характеристик водних розчинів ряду біологічно активних речовин за допомогою мікрохвильової диференційної діелектрометрії.

2) Застосувати метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії для безперервного моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка у реальному часі.

3) Оптимізувати шарувату хвилевідну структуру вимірювальної кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра із застосуванням аксіально-симетричної шаруватої хвилевідної структури комірок різної довжини з достатньо тонким шаром рідини для підвищення чутливості визначення комплексної діелектричної проникності сильно поглинаючих рідин в міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль без необхідності використання референсної рідини.

Практичне значення результатів дисертації виявляється в наступному:

1) Розроблений новий підхід безперервного у часі моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка може бути застосований для моніторингу біохімічних реакцій без необхідності руйнування ферменту та зупинки реакції.

2) Запропонована методика контролю процесу переходу дифтерійного токсину в нетоксичну форму анатоксин методом мікрохвильової діелектрометрії для технологічного процесу виробництва вакцини проти дифтерії замість використання тварин.

3) Розроблена конструкція вимірювальної кювети з підвищеною чутливістю визначення комплексної діелектричної проникності розчинів біологічно активних речовин в достатньо тонкому шарі рідини може бути застосована для біомедичних досліджень, контролю якості харчових продуктів, технологічних процесів виготовлення фармацевтичних розчинів, контролю поширення біологічно активних речовин у навколишнє середовище.

Ключові слова: комплексна діелектрична проникність, мікрохвильовий діапазон, шарувата хвилевідна структура, моди шаруватого хвилеводу, електродинамічні структури, мікрохвильовий диференційний діелектрометр, коефіцієнт поширення, сильно поглинаюча рідина, біологічно активна речовина.

ANNOTATION

Kuznetsova K.S. Microwave dielectrometry of high loss liquids based on layered electrodynamic structures. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the Doctor of Philosophy degree in the field of speciality 104 “Physics and Astronomy” (10 – Natural Sciences). – O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

This work is is dedicated to solving the current scientific and applied problem of identifying the features of electromagnetic wave propagation in layered electrodynamic structures. These structures consist of a circular metal waveguide containing a

cylindrical dielectric rod surrounded by a layer of high loss liquid. The dielectric properties of water solutions of some biologically active substances (antibiotics, glucose, human serum albumin, human immunoglobulin G, aqueous and salt solutions of albumin with added glucose, diphtheria anatoxin) and solutions undergoing a biochemical reaction have been determined using the differential dielectrometry method in the microwave frequency range, in the region of the frequency dispersion of the complex permittivity of water.

The influence of both changes in the geometric dimensions of the measurement cell structure and the dielectric properties of the high loss liquid, one of the layers of the waveguide-layered structures, on the characteristics of electromagnetic wave propagation (phase and attenuation coefficients) in these structures has been studied. It has been established that the real and imaginary parts of the complex permeability of the tested solutions of a series of biologically active substances decrease with an increase in the concentration of dissolved substances, due to a decrease in the number of free water molecules in the solution.

The method for determining the complex permittivity of high loss liquids in the millimeter and centimeter wavelength ranges has been improved using an optimized measuring cuvette of a microwave differential dielectrometer. A new approach to the application of a dielectrometer and a methodology for continuous monitoring of the course of the enzymatic protein hydrolysis reaction based on determining the values of the complex permittivity of protein-enzyme reaction mixtures is presented. It has been shown that the values of the complex permittivity of the reaction mixture with the reaction time of protein hydrolysis increase and approach the values of the complex permittivity of water, due to the gradual decrease in the protein concentration.

Scientific novelty of the obtained results and their practical significance:

1. For the first time, the modes of a circular metal waveguide with a central dielectric rod surrounded by a layer of high loss liquid, which do not have fixed mode

cutoff frequencies, and the attenuation coefficient for the HE_{11} wave has the smallest values among other types of waves in a wide frequency range, have been classified.

2. The design of the dielectrometry cavity has been improved. It consists of two cells of different lengths where the influence of diffraction effects at the cell edges has been eliminated. The cells have axial symmetry and a sufficiently thin layer of the tested liquid, as a result of which the sensitivity of determining the complex permittivity of liquids has been increased.

3. The experimental determination of the values of the complex permittivity of water solutions of biologically active substances (antibiotics, glucose, human serum albumin, human immunoglobulin G, aqueous and saline solutions of albumin with added glucose, diphtheria anatoxin) has undergone further development. It has been established that the complex permittivity for these solutions decrease with an increase in the concentration of biologically active substances, due to a reduction in the number of free water molecules in the solution. These results were confirmed by molecular dynamics modeling, indicating increased hydration and the duration of hydrogen bonds between water molecules and protein and glucose molecules. The obtained results showed good agreement with the established pharmacopoeial method of analysis for pharmaceutical preparations – the UV-Vis spectrophotometry method.

4. A novel methodology for monitoring the enzymatic hydrolysis reaction of proteins albumin and immunoglobulin G in real-time has been proposed for the first time, involving the determination of the complex permittivity of these solutions, which was confirmed by spectrophotometry method. Unlike the classical methodology, this reaction does not require interruption.

The purpose of the study is to improve the methods for determining the dielectric properties of the high loss liquid using electrodynamical structures. To achieve this purpose, the following tasks were formulated and solved:

1) Experimentally obtain data on the dielectric characteristics of aqueous solutions of various biologically active substances using microwave differential dielectrometry.

2) Apply the microwave differential dielectrometry method for continuous monitoring of the enzymatic protein hydrolysis reaction in real-time.

3) Optimize the layered waveguide structure of the measurement cuvette for a microwave differential dielectrometer, using an axially symmetric layered waveguide structure with cells of different lengths and a sufficiently thin layer of liquid to enhance the sensitivity of determining the complex permittivity of high loss liquids in the millimeter and centimeter wavelength range without the need for a reference liquid.

The **practical significance** of the dissertation results is as follows:

1) A developed continuous real-time monitoring approach for the enzymatic hydrolysis reaction of proteins can be applied to monitor biochemical reactions without the need to disrupt the enzyme or halt the reaction.

2) The proposed methodology for controlling the process of converting diphtheria toxin into a non-toxic form, anatoxin, using microwave dielectrometry, for technological process in the production of diphtheria vaccines without the use of animals.

3) The designed structure of the measurement cuvette, with enhanced sensitivity for determining the complex permittivity of solutions of bioactive substances in a sufficiently thin layer of liquid, can find applications in biomedical research, quality control of food products, technological processes of manufacturing pharmaceutical solutions, and for monitoring the spread of bioactive substances into the environment.

Keywords: complex permittivity, microwave range, layered waveguide structure, modes of the layered waveguide, electrodynamic structures, microwave differential dielectrometr, propagation coefficient, high loss liquid, biologically active substance.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у виданнях, індексованих Scopus та/або Web of Science

1. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, A. Shaposhnikova, B. Minofar, “Combined microwave dielectrometry and molecular dynamic study of aqueous solutions of human serum albumin with additives”, Journal of Molecular Liquids, vol. 364, Issue 1, 119981, 2022 (**Q1**).
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119981>
2. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, A. V. Martunov, “Development of experimental techniques for antibiotics detection in aqueous solutions: Real-time microwave dielectrometry and UV-Vis spectrophotometry study”, Low Temperature Physics, vol. 47, № 12, pp. 1041 – 1049, 2021 (**Q3**).
doi.org/10.1063/10.0007079
3. **K. S. Kuznetsova**, Z. E. Eremenko, “Influence of high loss liquid on the bandwidth of a circular two-layer waveguide at microwaves”, Journal of Electromagnetic Waves and Applications, vol. 32, Issue 14, pp. 1834 – 1846, 2018 (**Q2**).
<https://doi.org/10.1080/09205071.2018.1476185>
4. V. N. Skresanov, Z. E. Eremenko, **K. S. Kuznetsova**, Y. Wu, and Y. He, “Circular layered waveguide use for wideband complex permittivity measurement of lossy liquids”, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, vol. 63, Issue 3, pp. 694 – 701, 2014 (**Q1**). DOI:10.1109/TIM.2013.2282003

Статті у фахових виданнях України

5. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, O. I. Shubnyi, N. I. Sklyar, A. V. Martynov “Microwave dielectrometer application to antibiotics concentration

control in water solution”, Radiofizika i Elektronika, vol. 26, № 3, pp. 30 – 37, 2021.
DOI:10.15407/rej2021.03.030

Розділ у книзі

6. Z. E. Eremenko, **K. S. Kuznetsova**, N. I. Sklyar and A. V. Martynov, “Measuring complex permittivity of high-loss liquids”, In book: Dielectric Materials and Applications. Edited by Pankaj Kr. Choudhury, Chapter 2, [pp. 41 – 74], Nova Science, ISBN 978-1-53615-316-3, 2019.

Патент на винахід України

7. Диференційна кювета для виміру комплексної діелектричної проникності рідини, В. М. Скресанов, З. Є. Єременко, **К. С. Кузнецова**, Патент на винахід України № 109485 від 25.08.2015.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **K. S. Kuznetsova**, V. A. Pashynska, Z. E. Eremenko, “Monitoring of the proteins hydrolysis reaction using the microwave dielectrometry method”, IEEE Ukrainian Microwave Week, Kharkiv, Ukraine, 14 – 18 Nov. 2022, pp. 142 – 146, doi: 10.1109/UkrMW58013.2022.10037092.

2. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, A. V. Martunov, “High Loss Liquid in Layered Waveguide at Microwaves and Applications”, IEEE 17th International Conference on Mathematical Methods in Electromagnetic Theory (MMET), Kyiv, Ukraine, 02 – 05 July 2018, pp. 246 – 249, doi: 10.1109/MMET.2018.8460267.

3. Z. E. Eremenko, V. M. Skresanov, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin and M. P. Natarov, “Differential waveguide cuvette for complex permittivity measurement of high loss liquids at microwaves”, 47th European Microwave Conference (EuMC), Nuremberg, Germany, 10-12 October 2017, pp. 707 – 710, doi: 10.23919/EuMC.2017.8230945.

4. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin, and M. P. Natarov, “Determination Method of Water-Glucose Solution Concentration at Microwaves”, 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO), Kyiv, Ukraine, 18-20 April 2017, pp. 259 – 262, doi: 10.1109/ELNANO.2017.7939759.
5. Z.E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, “The absence of fixed cut-off frequencies in a circular layered waveguide with lossy liquid”, 9th International Kharkiv Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submilli-meter Waves (MSMW), Kharkiv, Ukraine, 20 – 24 June 2016, pp. 1 – 3, doi: 10.1109/MSMW.2016.7538180.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛЬНО ПОГЛИНАЮЧИХ РІДИН У МІКРОХВИЛЬОВОМУ ДІАПАЗОНІ...	23
1.1 Дисперсія КДП сильно поглинаючих рідин.....	23
1.2 Хвилевідні та резонаторні методи визначення КДП сильно поглинаючих рідин.....	25
1.3 Висновки до розділу 1.....	33
РОЗДІЛ 2 МІКРОХВИЛЬОВИЙ ХВИЛЕВІДНИЙ ДІЕЛЕКТРОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЕЛЕКТРИЧНОЇ ПРОНИКНОСТІ СИЛЬНО ПОГЛИНАЮЧИХ РІДИН.....	35
2.1 Характеристичне рівняння для шаруватої хвилевідної структури із сильно поглинаючою рідиною	35
2.2 Розподіл електромагнітного поля в круглому двошаровому хвилеводі із сильно поглинаючою рідиною.....	42
2.3 Типи хвиль у круглій хвилевідній шаруватій структурі із сильно поглинаючою рідиною.....	45
2.4 Методика проведення експерименту та визначення КДП сильно поглинаючих рідин	50
2.5 Чутливість методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії визначення КДП.....	72
2.6 Висновки до розділу 2.....	75
РОЗДІЛ 3 ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У МІКРОХВИЛЬОВОМУ ДІАПАЗОНІ ЧАСТОТ.....	77
3.1 КДП водних та сольових розчинів глюкози.....	79
3.2 КДП водних розчинів антибіотиків.....	85

3.3	Порівняння результатів визначення КДП водних розчинів антибіотиків спектрофотометричним методом.....	92
3.4	КДП розчинів дифтерійного анатоксину.....	96
3.5	КДП водних та сольових розчинів альбуміну з глюкозою.....	99
3.6	Порівняння результатів визначення КДП водних і сольових розчинів альбуміну з глюкозою методом молекулярно-динамічного моделювання.....	105
3.7	Висновки до розділу 3.....	111
РОЗДІЛ 4 МОНІТОРИНГ ПЕРЕБІГУ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ ГІДРОЛІЗУ БІЛКІВ МЕТОДОМ МІКРОХВИЛЬОВОЇ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ.....		113
4.1	Результати визначення КДП сумішей, в яких відбувається ферментативна реакція гідролізу білка.....	115
4.2	Результати вимірювання абсорбції ферментативних реакційних сумішей гідролізу білка спектрофотометричним методом.....	123
4.3	Висновки до розділу 4.....	127
ВИСНОВКИ.....		129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		131
ДОДАТОК А СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....		147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

КДП – комплексна діелектрична проникність

НВЧ – надвисокі частоти

UV-Vis – метод спектрофотометрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах довжин хвиль

$\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon''$ – комплексна діелектрична проникність

$\mu = \mu' + i\mu''$ – комплексна магнітна проникність

$tg\delta$ – тангенс кута втрат

h' – коефіцієнт фази (дійсна частина комплексного коефіцієнта поширення електромагнітної хвилі)

h'' – коефіцієнт загасання (уявна частина комплексного коефіцієнта поширення електромагнітної хвилі)

a – радіус циліндричного кварцового стрижня

b – радіус металевого хвилеводу

$d = (b - a)$ – величина шару сильно поглинаючої рідини

n – азимутальний індекс хвиль круглого двошарового хвилеводу

m – радіальний індекс хвиль круглого двошарового хвилеводу

$\Delta\varphi$ – різниця фаз електромагнітної хвилі HE_{11} , що поширюється в комірках кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра

ΔA – різниця амплітуд електромагнітної хвилі HE_{11} , що поширюється в комірках кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра

БАР – біологічно активна речовина

ВСТУП

Актуальність теми. Інтерес до шаруватих хвилевідних структур пов'язаний з тим, що вони складають елементи мікрохвильових пристроїв, призначених для виявлення діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин [1–3]. Область максимуму частотної дисперсії комплексної діелектричної проникності води та водних розчинів біологічно активних речовин розташована в міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль [4, 5]. Використання вимірювальних систем і пристроїв на основі мікрохвильових хвилевідних структур є важливим як для фундаментальних, так і прикладних задач, оскільки за їхньою допомогою можливо проводити моніторингові дослідження кількісних характеристик біологічно активних речовин у водних розчинах та біологічних рідинах за визначенням їхніх діелектричних властивостей у мікрохвильовому діапазоні частот [6–8].

Різноманітність біологічних, хімічних і органічних забруднювачів, що потрапляють у навколишнє середовище, зокрема в природні джерела води та харчові продукти (залишкові кількості антибіотиків у рідких продуктах харчування) безперервно зростає внаслідок сільськогосподарської та промислової діяльності [9], а також через екологічну катастрофу, спричинену воєнними діями в Україні, внаслідок яких постійно відбувається забруднення хімічними сполуками та токсичною органікою водних ресурсів України [10]. Продовжуються постійний пошук і впровадження сучасних методик, стратегій та інструментів аналізу з використанням мікрохвильових сенсорних пристроїв для попередження забруднення водних ресурсів у реальному часі [11], виявлення зміни малих концентрацій біомолекул, таких як білки і глюкоза, зміна рівня яких є показником різних захворювань [4, 12], та моніторингу ферментативних реакцій [13]. Фізичні технології виявлення біологічно активних речовин у рідких продуктах харчування та пробах води з навколишнього середовища з використанням мікрохвильових сенсорних пристроїв є перспективним напрямом наукових досліджень [7, 8], які

стрімко розвиваються завдяки низці переваг перед традиційними технологіями: миттєвість дії, відсутність витратних матеріалів, безпека, низькі енерговитрати, універсальність.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному та чисельному дослідженню поширення електромагнітних хвиль у круглій шаруватій хвилеводній структурі з різними комплексними діелектричними проникностями шарів. У дисертації представлені результати визначення діелектричних властивостей водних розчинів біологічно активних речовин (на прикладі водних розчинів антибіотиків, білків, сумішей білків з глюкозою у водному та сольовому розчинах, ферментативних реакційних сумішей) в області частотної дисперсії дійсної та уявної частин комплексної діелектричної проникності (КДП) води з використанням методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії. Пояснення отриманих експериментально даних КДП водних розчинів деяких біологічно активних речовин верифіковано двома іншими методами: методом спектрофотометрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах довжин хвиль [14] і методом молекулярно-динамічного (МД) моделювання [15].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у відділі акустичної та електромагнітної спектроскопії Інституту радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України в рамках таких держбюджетних тем:

- 1) «Вивчення взаємодії електромагнітних та звукових хвиль, а також заряджених часток з твердотільними структурами», шифр: «Кентавр – 5», номер держреєстрації 0112U000211.
- 2) «Дослідження взаємодії електромагнітних та звукових хвиль, а також заряджених частинок з наноструктурами та метаматеріалами», шифр: «Кентавр – 6», номер держреєстрації 0117U004038.

3) «Дослідження взаємодії електромагнітних хвиль, а також заряджених частинок з наноструктурами та метаматеріалами», шифр: «Кентавр – 7», номер держреєстрації 0122U001687.

Дисертаційну роботу також було виконано відповідно до тематичних науково-дослідних робіт, що проводились в Wolfgang Pauli Institute (WPI):

Міжнародна стипендіальна програма дослідницької підготовки Pauli Predoc «Pauli Ukraine Project», WPI Thematic Program «Quantitative Methods in Biology and Medicine (2021/2022)».

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є удосконалення методів визначення діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин за допомогою шаруватих електродинамічних структур. Для досягнення зазначеної мети поставлено та розв'язано наступні задачі:

1) Експериментально отримати дані діелектричних характеристик водних розчинів ряду біологічно активних речовин за допомогою мікрохвильової диференційної діелектрометрії.

2) Застосувати метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії для безперервного моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка у реальному часі.

3) Оптимізувати шарувату хвилевідну структуру вимірювальної кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра з застосуванням аксіально-симетричної шаруватої хвилевідної структури комірок різної довжини з достатньо тонким шаром рідини для підвищення чутливості визначення комплексної діелектричної проникності сильно поглинаючих рідин в міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль без необхідності використання референсної рідини.

Об'єкт дослідження – електромагнітні коливальні процеси в шаруватих хвилевідних структурах, які містять розчини біологічно активних речовин.

Предмет дослідження – спектральні характеристики електромагнітних коливань у хвилевідних структурах із сильно поглинаючою рідиною.

Методи дослідження

1. Експериментальний метод дослідження комплексного коефіцієнту поширення хвилі у хвилевідних структурах у міліметровому діапазоні довжин хвиль за допомогою вимірювання фази та амплітуди хвилі, застосовуючи мікрохвильовий диференційний діелектрометр.
2. Чисельні й аналітичні методи розв'язання електродинамічної задачі для знаходження комплексної діелектричної проникності сильно поглинаючої рідини в міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль з використанням шаруватої хвилевідної структури.

Наукова новизна одержаних результатів

1) Вперше класифіковано моди круглого металевого хвилеводу з центральним діелектричним стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючої рідини, що не мають фіксованих частот відсікання мод, а коефіцієнт загасання для хвилі HE_{11} має найменші значення поміж інших типів хвиль у широкому діапазоні частот.

2) Удосконалено конструкцію кювети діелектрометра, яка не потребує референсної рідини і складається з двох комірок різної довжини, в яких компенсовано вплив дифракційних ефектів на краях комірок, що мають аксіальну симетрію та достатньо тонкий шар досліджуваної рідини, внаслідок чого підвищено чутливість визначення КДП рідин.

3) Дістало подальший розвиток експериментальне визначення значень комплексної діелектричної проникності водних розчинів ряду біологічно активних речовин (антибіотики, глюкоза, сироватковий альбумін людини, імуноглобулін G

людини, водні та сольові розчини білку альбуміну з додаванням глюкози, дифтерійний анатоксин), які зменшуються в залежності від збільшення концентрації біологічно активних речовин через зменшення кількості вільних молекул води в розчині. Ці результати підтверджено методом молекулярно-динамічного моделювання згідно збільшення гідратації та часу існування водневих зв'язків між молекулами води з молекулами білка та глюкози, та мають добре узгодження з результатами, отриманими відомим фармакопейним методом аналізу фармацевтичних препаратів – методом UV-Vis спектрофотометрії.

4) Вперше запропоновано методику моніторингу ферментативної реакції гідролізу білків альбуміну та імуноглобуліну G людини з трипсином у реальному часі через визначення КДП цих розчинів, що знайшло підтвердження методом спектрофотометрії. На відміну від класичної методики, ця реакція не потребує переривання.

Практичне значення одержаних результатів

1) Розроблений новий підхід безперервного у часі моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка може бути застосований для моніторингу біохімічних реакцій без необхідності руйнування ферменту та зупинки реакції.

2) Запропоновано методику контролю процесу переходу дифтерійного токсину в нетоксичну форму анатоксин методом мікрохвильової діелектрометрії для технологічного процесу виробництва вакцини проти дифтерії замість використання тварин.

3) Розроблена конструкція вимірювальної кювети з підвищеною чутливістю визначення КДП розчинів біологічно активних речовин в достатньо тонкому шарі рідини може бути застосована для біомедичних досліджень, контролю якості харчових продуктів, технологічних процесів виготовлення фармацевтичних розчинів, контролю поширення біологічно активних речовин у навколишнє середовище.

Особистий внесок здобувачки полягає у вдосконаленні методів діелектрометрії сильно поглинаючих рідин у мікрохвильовому діапазоні частот із застосуванням хвилевідних структур, які дозволили розв'язати задачі, поставлені перед дослідженням. У роботі [16] здобувачкою чисельно отримано залежності комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} в залежності від зміни частоти та товщини шару рідини для круглого металевого хвилеводу з центральним діелектричним стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючої рідини та показано, що відповідно до класифікації хвиль однорідного хвилеводу можливо класифікувати базові типи хвиль круглого металевого двошарового хвилеводу з центральним кварцовим стрижнем і шаром сильно поглинаючої рідини. У роботі [17] запропоновано аксіально-симетричну шарувату хвилевідну структуру вимірювальної кювети з комірками різної довжини, в яких компенсовано вплив дифракційних ефектів на краях комірок, для визначення комплексної діелектричної проникності сильно поглинаючих рідин з об'ємом досліджуваної рідини 1 мл у кожній комірці. В роботах [16–20] здобувачкою проведено експериментальні дослідження комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцового стрижня у вимірювальній комірці з шаром досліджуваної рідини, та отримано значення КДП водних розчинів деяких біологічно активних речовин на основі розв'язання зворотної електродинамічної задачі. Здобувачкою проведено порівняльний аналіз діелектричних властивостей водних розчинів ряду біологічно активних речовин у розчинах, відповідно даних, отриманих UV-Vis спектрофотометричним методом [14] та методом молекулярно-динамічного моделювання [15], що дало можливість надійно підтвердити отримані результати діелектрометричних вимірювань щодо співвідношення вільних і зв'язаних молекул води у досліджуваних розчинах. У роботах [21, 22] встановлено, що при великому шарі рідини максимум електромагнітного поля хвилі HE_{11} у круглому двошаровому хвилеводі більше зосереджений у кварцовому

стрижні і має розподіл, подібний до поля HE_{11} в однорідному хвилеводі та зі зменшенням шару рідини поле більше поширюється за межі діелектричного стрижня. У роботі [23] отримано лінійну залежність зменшення дійсної та уявної частин КДП водних та сольових (0.9% NaCl) розчинів глюкози від збільшення концентрації глюкози з мінімальною межею виявлення глюкози, співрозмірною з межею виявлення іншими методами. У роботах [18, 24] показано, що чутливість визначення КДП рідин для кювети з достатньо тонким шаром рідини у кілька разів перевищує чутливість кювети діелектрометра з більшим шаром рідини. Здобувачкою у роботі [25] розроблено новий підхід безперервного у часі моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка без необхідності руйнування ферменту та зупинки реакції.

Представлені в дисертаційній роботі результати було отримано здобувачкою особисто або за її безпосередньої участі зі співробітниками ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України та сумісними експериментальними дослідженнями з співробітниками Харківського НДІ мікробіології та імунології ім. Мечникова. В усіх роботах, підготовлених у співавторстві, здобувачка брала участь у написанні рукописів, аналізі фізичних результатів і формулюванні узагальнювальних висновків.

Апробація результатів дисертації

Наукові результати та основні положення дисертаційної роботи представлено та опубліковано в матеріалах наступних конференцій:

1. **K. S. Kuznetsova**, V. A. Pashynska, Z. E. Eremenko, “Monitoring of the proteins hydrolysis reaction using the microwave dielectrometry method”, IEEE Ukrainian Microwave Week, Kharkiv, Ukraine, 14 – 18 Nov. 2022, pp. 142 – 146, doi: 10.1109/UkrMW58013.2022.10037092.
2. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, A. V. Martunov, “High Loss Liquid in Layered Waveguide at Microwaves and Applications”, IEEE 17th

International Conference on Mathematical Methods in Electromagnetic Theory (MMET), Kyiv, Ukraine, 02 – 05 July 2018, pp. 246 – 249, doi: 10.1109/MMET.2018.8460267.

3. Z. E. Eremenko, V. M. Skresanov, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin and M. P. Natarov, Differential waveguide cuvette for complex permittivity measurement of high loss liquids at microwaves, 47th European Microwave Conference (EuMC), Nuremberg, Germany, 10-12 October 2017, pp. 707-710, doi: 10.23919/EuMC.2017.8230945.

4. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin, and M. P. Natarov, “Determination Method of Water-Glucose Solution Concentration at Microwaves”, 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO), Kyiv, Ukraine, 18-20 April 2017, pp. 259 – 262, doi: 10.1109/ELNANO.2017.7939759.

5. Z.E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, “The absence of fixed cut-off frequencies in a circular layered waveguide with lossy liquid”, 9th International Kharkiv Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submilli-meter Waves (MSMW), Kharkiv, Ukraine, 20 – 24 June 2016, pp. 1 – 3, doi: 10.1109/MSMW.2016.7538180.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей (дві з яких Q1), 1 патент на винахід України, 1 розділ у книзі, 5 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Структура й обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, чотирьох розділів, висновків, переліку використаних літературних джерел і одного додатка. Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 149 сторінок, яка містить 44 рисунки і 12 таблиць. У роботі використано 129 бібліографічних посилань.

РОЗДІЛ 1

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛЬНО ПОГЛИНАЮЧИХ РІДИН У МІКРОХВИЛЬОВОМУ ДІАПАЗОНІ

1.1 Дисперсія КДП сильно поглинаючих рідин

Комплексна діелектрична проникність (КДП) є найбільш поширеним параметром, що використовується для характеристики різноманітних водних розчинів та є предметом численних досліджень [5, 12, 26–31]. Знання КДП є корисною інформацією для розв'язання таких проблем, як забруднення залишками антибіотиків водних ресурсів, визначення концентрації розчинених речовин, моніторинг біохімічних реакцій та інші. КДП включає дійсну частину ε' та уявну ε'' частину, пов'язує діелектричне зміщення \mathbf{D} з напруженістю електричного поля \mathbf{E} , і виражається як $\mathbf{D} = \varepsilon_0 \varepsilon \mathbf{E}$, де ε_0 – діелектрична проникність вільного простору, ε – відносна діелектрична проникність діелектричного матеріалу. Дійсна частина КДП описує здатність матеріалу підтримувати електричне поле (міра накопичення енергії), а уявна – це здатність матеріалу розсіювати мікрохвильову енергію (являє собою втрати в матеріалі). Ці втрати включають діелектричні втрати через релаксацію, а також втрати через іонну провідність. Відповідно векторного запису полів, передбачається, що поля представляють синусоїдальні змінні з часом. Величина втрат матеріалу визначається за значенням його коефіцієнта дисипації або тангенса кута втрат, $\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon'$, де δ – фазовий кут між полями \mathbf{D} і \mathbf{E} . Це значення дорівнює величині порядку або більше одиниці для матеріалів із втратами, якими є сильно поглинаючі рідини. Знання КДП та тангенса втрат є важливими характеристиками для дослідження взаємодії мікрохвиль з сильно поглинаючою рідиною в НВЧ діапазоні.

Після вимикання взаємодії електромагнітного поля з матеріалом, атоми та молекули, наявні в матеріалі, повертаються до рівноваги. Така поведінка молекул у відповідь на прикладене електромагнітне поле називається діелектричною релаксацією. Поведінка діелектричної релаксації залежить від властивостей матеріалу, частоти та температури. Рідина може мати кілька діелектричних механізмів або поляризаційних ефектів, які впливають на її діелектричну проникність. На Рис. 1.1 схематично зображено різні діелектричні механізми поляризації в залежності від діапазону частот.

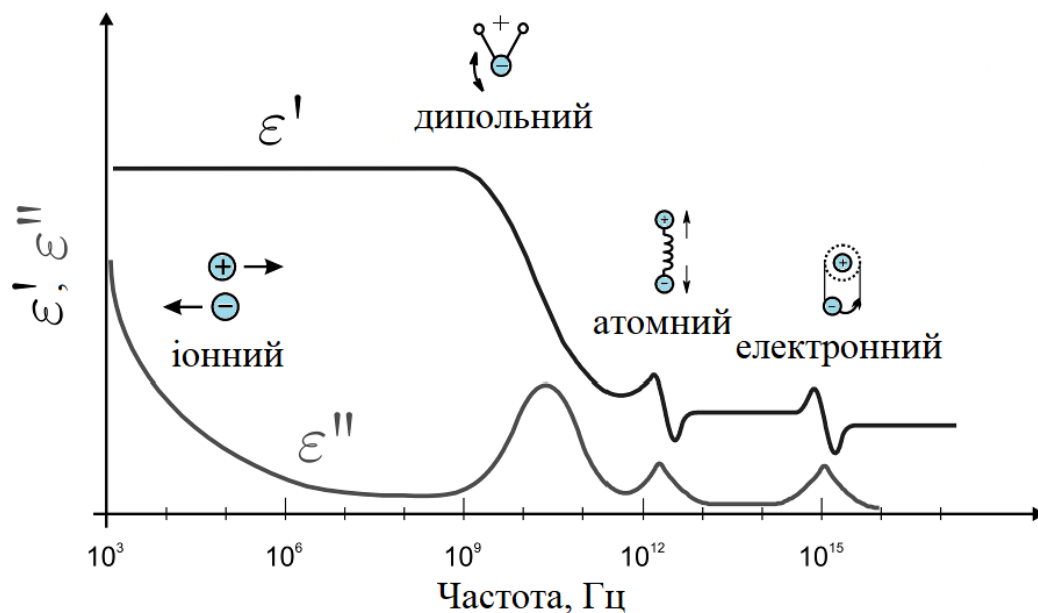


Рис. 1.1. Схематичне зображення різних діелектричних механізмів поляризації [32]

Кожен діелектричний механізм має характерну частоту ω . Поведінка діелектричного механізму для полярних рідин у мікрохвильовому діапазоні частот характеризується єдиним процесом релаксації, та описується рівнянням Дебая, яке пов'язує КДП з часом релаксації τ , статичним значенням діелектричної проникності ϵ_s та високочастотним значенням діелектричної проникності ϵ_∞ . Для

одного механізму релаксації дисперсійна модель Дебая задана співвідношенням [33]:

$$\varepsilon = \varepsilon' + \varepsilon'' = \left(\frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} + \varepsilon_\infty \right) + j \left(\frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \right), \quad (1.1)$$

Для опису поведінки матеріалів, які включають кілька часів релаксації τ , найпоширенішим є рівняння Коула-Коула [33]:

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (1.2)$$

де α - параметр, що дає міру розширення в піку ε'' , та може приймати значення від 0 до 1, для $\alpha = 0$ рівняння (1.2) перетворюється на рівняння Дебая для полярних діелектриків (1.1). Рівняння Коула-Коула (1.2) використовується для характеристики широкого спектру рідин. Згідно рівняння (1.2) геометричне місце значень діелектричної проникності в комплексній площині є дугою кола.

1.2 Хвильовідні та резонаторні методи визначення КДП сильно поглинаючих рідин

КДП будь-якої речовини є її невід'ємним фізичним параметром. Методи досліджень, що ґрунтуються на визначенні фізичних параметрів розчинів біологічно активних речовин є актуальними. Визначення діелектричних властивостей розчинів біомолекул почалося з робіт Дебая після публікації його книги [30], та були зроблені перші вимірювання діелектричної дисперсії білкових розчинів. Взаємодія електромагнітних хвиль з біологічною матерією є частотно-залежною [26, 34]. Діелектричні властивості води, водних розчинів та біологічних рідин досліджуються протягом багатьох років [31, 33–37] та мають широке застосування в медицині, фармацевтиці, біології, екології. Діелектричні властивості різноманітних речовин біологічного походження постійно доповнюються, і далі можуть використовуватися для розрахунків в медичних цілях [38].

Роль зв'язаної води дискутується в багатьох роботах [39–41]. Кількість зв'язаних молекул води може бути показником формування взаємодії біологічно активних речовин між собою та водою. Зміна значень КДП водних розчинів біологічно активних речовин, а також біологічних рідин із великим вмістом води, таких як м'язи та шкіра, для яких вміст води становить близько 75% [42], пояснюється зміною співвідношення кількості зв'язаних і вільних молекул води в досліджуваних зразках [12, 27, 43]. Вміст вологи, співвідношення вільних та зв'язаних молекул води в харчових продуктах впливають на діелектричні властивості харчових продуктів [44]. Зменшення КДП розчину зі збільшенням концентрації розчинених речовин відбувається внаслідок того, що при взаємодії молекул біологічно активних речовин з розчинником (водою) навколо розчинених біологічно активних молекул утворюється шар зв'язаної води (гідратація), та як наслідок зменшується кількість вільних молекул розчинника. Утворення шару зв'язаних молекул води на поверхні біомолекул характеризується більшим часом релаксації, на відміну від молекул води в об'ємі [5, 27, 29, 45].

Зменшення рухливості зв'язаних молекул води в розчині призводить до зниження дійсної та уявної частин КДП розчину. Завдяки сильному поглинанню водних розчинів у НВЧ-діапазоні, в області частотної дисперсії КДП води, вплив ступеня гідратації можливо дослідити за допомогою діелектрометричних методів, через те, що вода становить основну частину досліджуваних розчинів і впливає на їхні властивості [12]. З використанням діелектрометричних методів показано, що зміна концентрації розчинених речовин у розчині викликає зміну значень КДП, через зміну співвідношення зв'язаних і вільних молекул води в досліджуваних зразках, в наслідок чого рухливість зв'язаних молекул води зменшується і КДП розчину зменшується [4, 31, 35].

У мікрохвильовому діапазоні частот від 0 до 20 ГГц дійсна частина КДП води більша за уявну, а для частот вище 20 ГГц – дійсна частина КДП води менша за уявну частину, що істотно впливає на поширення електромагнітної

хвилі у водному середовищі. Визначення діелектричних властивостей рідин з високими втратами проводять у мікрохвильовому діапазоні частот, застосовуючи хвилеводні методи [1]. Для вимірювання рідких зразків основною проблемою є те, як утримати рідину в вимірювальних хвилевідних структурах [2]. Хвилеводні структури застосовуються для передачі енергії на надвисоких частотах, і коли їх поперечні розміри менше критичних значень, вони втрачають властивості спрямовуючої системи і стають позамежними. Такі хвилеводи застосовуються як елементи різних мікрохвильових датчиків для вимірювання КДП рідин, що протікають у трубопроводах [46]. Використовуючи резонаторні методи з високою чутливістю для малих змін КДП рідин застосовують капіляри [3, 47] для зменшення загасання хвилі при дослідженні сильно поглинаючих рідин.

Залишкова концентрація антибіотиків у стічних водах та питній воді все ще залишається проблемою у всьому світі. Як показує статистика, кількість різних біологічних забруднень, що потрапляють до навколишнього середовища, безперервно зростає [9]. Однією з найактуальніших екологічних проблем у світі є забруднення антибіотиками, які потрапляють у водне середовище як шляхом виведення з організму людини в біологічно активній формі практично без втрати своїх властивостей, так і зі стічними водами від фармацевтичних підприємств. В той же час, антибіотики використовуються як для лікування, так і для профілактики захворювань у тваринництві і, зокрема, на птицефабриках, як наслідок споживання антибіотиків людьми і тваринами різко зростає, що спричиняє велику глобальну проблему антибіотикорезистентності [48]. На даний момент найбільш поширеними методами виявлення антибіотиків є високоефективна рідинна хроматографія, полімеразна ланцюгова реакція та мас-спектроскопія [49]. У роботах [49–51] автори зробили огляд обраних експериментальних методів (електромагнітної спектроскопії, UV-Vis спектрофотометрії та система вимірювання ємності) для виявлення антибіотиків у пробах води з навколишнього середовища. Показано, що концентрація

лінкоміцину в підземних водах була встановлена на рівні 0.36 мкг/л, та концентрація ципрофлоксацину у воді дорівнювала 1.270 мкг/л. Всі ці методи є високочутливими, однак вони мають дуже високу ціну обладнання, яке не є портативним, що унеможлиблює їх використання безпосередньо на місці забору проб.

Моніторинг рівня глюкози в крові людини має важливе значення для лікування та запобігання побічних ефектів у хворих на цукровий діабет [37]. Найбільш поширена традиційна методика, за допомогою якої визначається рівень глюкози в крові людини, зводиться до проколювання пальця ланцетом глюкометра. Це глюкозооксидантний метод, який заснований на реакції окислення глюкози в присутності ферменту глюкозооксидази з утворенням перекису водню. Цей метод потребує інвазивної процедури, яка може бути проведена багато разів на день, якщо це необхідно для лікування пацієнта. Існує стандарт DIN EN ISO 15197 [52], який встановлює відповідні вимоги до глюкометрів, згідно з яким допустима точність глюкометрів повинна бути наступною: 1) при рівні глюкози в крові менше 4.2 ммоль/л, 95% вимірювань повинні відрізнятися від еталону не більше 0.82 ммоль /л; 2) при концентрації глюкози в крові, більшій або на рівні 4.2 ммоль/л, 95% вимірювань повинні відрізнятися від еталону не більше 20% як в більшу, так і меншу сторону. Головними недоліками таких пристроїв визначення рівня глюкози в крові є інвазивність, постійне пошкодження тканин в місці проколу та як наслідок ризик інфікування. Існують комерційні мініатюрні системи безперервного моніторингу, такі як сенсори Dexcom та Guardian Medtronic, які мають тривалість безперервної роботи датчиків до 7 днів [53].

Значення КДП водних розчинів глюкози, отримані згідно моделі Коула-Коула та Дебая з відповідними параметрами для водних розчинів глюкози з концентрацією від 100 до 500 мг/дл, використовують для проєктування різноманітних датчиків визначення глюкози в крові людини з використанням коаксіального зонда з відкритим кінцем [54] з подальшим проєктуванням

мікрохвильового датчику для неінвазивного вимірювання глюкози в крові. Авторами в роботах [36], [55] методом діелектричної спектроскопії, який є чутливим інструментом дослідження дисперсійної поведінки діелектричної проникності, проведено моніторинг глюкози в крові людини та отримано значення КДП крові людини її компонентів в діапазоні частот до 100 ГГц. Застосовуючи імпедансну спектроскопію, в роботах [56], [57] запропоновано безперервну неінвазивну систему моніторингу рівня глюкози в крові людини з мінімальною межею виявлення глюкози 0.2 ммоль/л [57].

Розробка неінвазивних методів моніторингу рівня цукру в крові людини за показниками дійсної та уявної частин КДП є актуальним завданням. Для цього необхідно знати діелектричні властивості різних біологічних рідин і тканин людини. Модельні рідини, такі як розчини глюкози у воді або у сольовому розчині, дозволяють промодельовувати їх основні діелектричні властивості та можуть бути використані для кількісної оцінки концентрації глюкози в крові людини. Таким чином, актуальними є дослідження діелектричних властивостей водних розчинів з різним вмістом глюкози та солі, в якості модельних розчинів за допомогою методу діелектрометрії.

Застосовуючи метод мікрохвильової діелектрометрії можливо вимірювати діелектричні характеристики харчових продуктів у реальному часі, що корисно для моніторингу і контролю якості технологічних процесів виробництва харчових продуктів [44, 58, 59]. Зазвичай, продукти харчування містять значну кількість води та інших полярних речовин. Метод діелектрометрії чутливий до змін складу компонент харчових продуктів, таких як концентрація вологи, білків, цукру та інші [44]. Завдяки визначенню діелектричної проникності метод діелектрометрії є потужним інструментом для аналізу харчових продуктів, що дозволяє отримувати швидкі та надійні результати вимірювання їхнього складу та якості.

Найпоширенішими білками у крові є дві основні групи: сироватковий альбумін та глобуліни, які становлять 55% та 38% загальної кількості білків.

Сироватковий альбумін людини відіграє ключову роль у підтримці онкотичного тиску плазми та перенесенні численних речовин, і його рівень може бути важливим показником для діагностики різних захворювань, таких як рак, ревматоїдний артрит, ішемія тощо [60]. За рівнем імуноглобуліну G можливо виявляти деякі хвороби, його рівень підвищується при вірусному та аутоімунному гепатиті, патологічних станів печінки [61]. Точне визначення рівня цих найбільш поширених типів білків у біологічних рідинах має велике значення для лікування, а методи, які використовуються зараз для клінічних досліджень їх рівня залишаються класичними і базуються на використанні барвників [62].

Напрямки досліджень з використанням мікрохвильових технологій для біомедичних застосувань затребувані для моніторингових досліджень у реальному часі компонент плазми крові [4], таких як альбумін та імуноглобулін G, та для безперервних досліджень ферментативних реакцій [13] за показниками їх діелектричних характеристик. Таким чином, важливим є створення нових технологій та засобів аналізу на основі електродинамічних структур, які доповнили б існуючі, з метою ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних речовин в розчинах.

Більшість ферментативних процесів, що використовуються в біомедичній практиці і біотехнологічних процесах, вимагають безперервних і точних методів моніторингу перебігу ферментативних реакцій, які зазвичай засновані на постійному визначенні концентрації або початкового субстрату, або кінцевого продукту ферментативної реакції. Наприклад, для контролю процесу гідролізу сечовини, який каталізується уреазою з утворенням аміаку і вуглецю, зазвичай визначають концентрацію аміаку в біохімічному реакторі [63]. Одним із класичних методів контролю перебігу цієї ферментативної реакції є фотоколориметричний метод із застосуванням реактиву Несслера [64]. Цей спосіб контролю є дискретним та вимагає регулярно відбирати проби з реактора, що може спричинити забруднення зони реакції, і не забезпечує моніторинг реакції в

режимі реального часу. Крім того, реактив Несслера досить токсичний. Порівняно з класичними методами контролю, зазначеними вище, точні радіофізичні методи контролю стану біологічно активних речовин у розчині, і зокрема діелектрометрія, є перспективним напрямком досліджень.

Сучасний стан дискретних методів моніторингу біохімічних реакцій обумовлює необхідність розробки нових динамічних методів контролю ферментативних процесів у біомедичній лабораторній діагностиці та в біотехнологіях, зокрема з використанням мікрохвильової діелектрометрії. Таким чином ведеться пошук динамічних методів моніторингу концентрації субстрату і продукту ферментативної реакції гідролізу білка без зупинки ферментативного процесу та/або дискретного відбору проб із зони реакції.

Особливість вибору еталонної рідини

Точне знання діелектричних властивостей чистого розчинника – води є важливим при вивченні водних систем. Існує багато методів визначення КДП рідини, які спочатку валідуються та підтверджуються з використанням еталонних рідин з відомими КДП, таких як водно-етанольні розчини, а потім застосовуються для характеристики досліджуваних рідин [19, 65, 66]. Методи визначення КДП рідин в якості еталонної рідини використовують воду, водно-етанольні розчини із відомими КДП [1, 3, 65, 67, 68]. Відомим є диференційний метод змінної товщини досліджуваної рідини для визначення малих відмінностей КДП досліджуваної рідини від рідини з відомою КДП в міліметровому діапазоні [69]. Цей метод дозволяє вимірювати різниці між КДП досліджуваної рідини та значеннями КДП контрольного зразка з точністю до 0.1%. В якості еталонної рідини для виявлення КДП розчинів біологічно активних речовин, вода обрана як еталонна рідина, оскільки її діелектричні властивості в НВЧ-діапазоні досить вивчені.

В Таблиці 1.1 представлено порівняння методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії з іншими методами, доступними в літературі, на

прикладі визначення діелектричних властивостей водних розчинів біологічно активних речовин та деяких біомолекул.

Таблиця 1.1. Порівняння методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії з іншими мікрохвильовими методами на прикладі водно-білкових, сольових та спиртових розчинів за точністю визначення дійсної $\delta\epsilon'$ та уявної $\delta\epsilon''$ частин КДП

Мікрохвильові методи	Досліджуваний зразок	Об'єм досліджуваного зразка	$\delta\epsilon'$, $\delta\epsilon''$, %	Частота, ГГц
Мікрохвильова диференційна діелектрометрія	Вода, водний розчин альбуміну	7 мл	0.5% та 3÷5%	31.82
Резонаторний метод, заснований на резонаторі з модами шепочучої галереї [70]	Водний розчин альбуміну	субмікролітр/ нанолітр	1.4% та 0.7%	30-40
Мікрохвильова діелектрометрія [67]	Водний та водно сольовий (NaCl) розчини альбуміну	кілька мкл	6%	0.01÷10
Діелектрична спектроскопія [71]	Біологічні клітини	кілька мкл	4%	0÷40
Хвилеводний метод [72]	Вода, метанол, етанол, ізопропанол	0.06 мл	0.08÷12%	0.5÷3
Мікросмужковий резонатор [3]	Вода, гексан, метанол	кілька мкл	0.05÷2.3%	3
Коаксіальний зонд від Keysight [73]	Рідини та тверді тіла	кілька мілілітрів	5÷10%	0.01÷50

Переваги визначення КДП сильно поглинаючих рідин у мікрохвильовому діапазоні частот із застосуванням мікрохвильової диференційної діелектометрії:

1. Точність визначення коефіцієнтів фази та загасання дорівнюють $0.1 \div 1\%$ та 5% , відповідно;
2. Миттєве визначення діелектричних властивостей досліджуваних рідин;
3. Відсутність витратних матеріалів;
4. Безпечний та легкий в експлуатації;
5. Низьке енергоспоживання;
6. Низьковитратний експрес метод;
7. Автономність.

1.3 Висновки до розділу 1

Вимірювальні пристрої на основі шаруватих електродинамічних структур застосовуються впродовж багатьох років для дослідження діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин. Аналіз літературних джерел, щодо досліджень особливостей поширення електромагнітних хвиль у хвилевідних структурах з сильно поглинаючою рідиною, дає підстави проведення моніторингу фізичних показників досліджуваних зразків у реальному часі. Частотний діапазон роботи таких структур знаходиться у мікрохвильовому діапазоні частот, де розташована область частотної дисперсії комплексної діелектричної проникності води.

На сьогодні більшість методів визначення кількості біологічно активних речовин у різноманітних зразках, проводяться в лабораторних умовах, які є довготривалими та трудомісткими з використанням спеціалізованого обладнання, витратних матеріалів, а існуючі комерційні тест-системи є найчастіше недоступні для широкого використання. Є інтерес використання хвилевідних шаруватих структур, як основних чутливих елементів, в фармацевтиці, медицині, екології,

зокрема визначення залишкових кількостей антибіотиків, в технологічних процесах виробництва харчових продуктів та фармацевтичних препаратів, проводячи моніторингові дослідження діелектричних властивостей досліджуваних розчинів у реальному часі.

Порівняно з класичними методами моніторингу біохімічних реакцій, зазначеними в розділі, точні радіофізичні методи, зокрема діелектрометрія, є перспективним напрямком досліджень комплексної діелектричної проникності розчинів біологічно активних речовин, завдяки своїм перевагам: точність визначення дійсної та уявної частин комплексної діелектричної проникності дорівнює відповідно 0.5% та 3÷5%; відсутність витратних матеріалів; безпечний та легкий в експлуатації; низьке енергоспоживання; низьковитратний та автономний експрес метод.

РОЗДІЛ 2

МІКРОХВИЛЬОВИЙ ХВИЛЕВІДНИЙ ДІЕЛЕКТРОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЕЛЕКТРИЧНОЇ ПРОНИКНОСТІ СИЛЬНО ПОГЛИНАЮЧИХ РІДИН

У розділі представлено методику розв’язання електродинамічної задачі для круглих шаруватих хвилевідних структур. Ці структури реалізовані як два типи вимірювальних кювет для визначення КДП сильно поглинаючих рідин у мікрохвильовому діапазоні частот. Перший тип кювети – це дві ідентичні комірки діелектрометра з типом хвилі HE_{11} , кожна комірка складається з циліндричної порожнини радіусу $b=10$ мм у латунному корпусі кювети, перпендикулярно боковим поверхням комірки розташовано кварцовий стрижень, де одна комірка необхідна для референсної рідини, та інша – для рідини, що досліджується з об’ємом рідини 7 мл кожна [18, 19, 66, 74]. Другий тип вимірювальної кювети – це дві комірки різної довжини, призначені для досліджуваної рідини для якої отримано патент на винахід України [17]. Кожна комірка складається з круглого циліндричного отвору у металевому корпусі кювети з центральним кварцовим стрижнем, оточеним сильно поглинаючою рідиною, таким чином, що діелектричні стрижні співвісні отворам кювети. Вибір мікрохвильового діапазону частот для дослідження діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин, якими також є водні розчини біологічно активних речовин (БАР), обумовлено тим, що в цьому діапазоні розташована область максимальної частотної дисперсії дійсної та уявної частин КДП води, яка є основною складовою досліджуваних зразків [4, 5].

2.1 Характеристичне рівняння для шаруватой хвилеводної структури з сильно поглинаючою рідиною

Для хвилеводної структури вимірювальної комірки з діелектричним стрижнем, оточеним сильно поглинаючою рідиною, строго розв’язується електродинамічна задача [75], знаходиться розв’язок рівнянь Максвелла завдяки

аксіальній симетрії структури, і отримується характеристичне рівняння [14, 16, 19, 66]. Електромагнітне поле хвилі, що поширюється в хвелеводній структурі, в складі якої є сильно поглинаюча рідина, сильно загасає в цій рідині. Як раніше показано [76–78] визначення КДП сильно поглинаючої рідини можливо проводити, використовуючи хвелевідну вимірювальну комірку із діелектричним стрижнем, оточеним сильно поглинаючою рідиною, що являє собою хвелевідний канал в рідині. Вздовж такої хвелевідної структури з діелектричним стрижнем можливо поширення хвелевідної моди HE_{11} з меншим загасанням. Це дає можливість виявити відмінність КДП двох сильно поглинаючих рідин [14, 16, 79].

Постановка електродинамічної задачі для шаруватої хвелевідної структури з нескінченним шаром сильно поглинаючої рідини

Розглянемо розв’язання електродинамічної задачі для шаруватої структури, яку зображено на Рис. 2.1, з центральним діелектричним стрижнем (1) та нескінченним шаром сильно поглинаючої рідини (2).

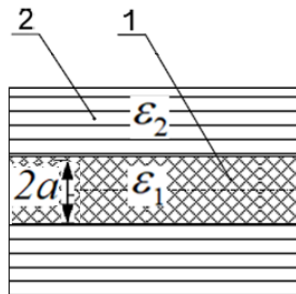


Рис. 2.1. Поздовжній перетин вимірювальної комірки, що складається з циліндричного кварцового стрижня радіусу $a = 2.5$ мм та $\epsilon'_1 = 3.8, \epsilon''_1 = 0.0001$, $\epsilon'_1 \gg \epsilon''_1$, який оточено сильно поглинаючою рідиною з ϵ_2 , $\epsilon'_2 \sim \epsilon''_2$. Рис. 1 в [77].

Така структура є основою вимірювальної комірки мікрохвильового диференційного діелектрометра для визначення КДП сильно поглинаючих рідин [79]. Характеристичне рівняння для цієї шаруватої хвелевідної структури є трансцендентним рівнянням в неявному вигляді і може бути розв’язано

чисельними методами [75, 80, 81]. Наприклад, у [82] рішення цього рівняння розглядалося для оптимізації характеристик широкосмугового атенюатора з фіксованим загасанням та у [81] для розрахунку оптичних хвильоводів.

Розв'язання електродинамічної задачі для структури з циліндричним діелектричним стрижнем у безмежному поглинаючому середовищі, проведено методом розділених змінних у циліндричній системі координат (r, φ, z) [76, 81]. Типи хвилевідних мод, що поширюються в досліджуваній структурі (Рис. 2.1) можна охарактеризувати комплексним коефіцієнтом поширення $h = h' + ih''$, де h' та h'' – коефіцієнти фази та загасання відповідно.

Вздовж радіусу r круглого хвильоводу поле представлено комбінацією функцій Бесселя $J_n(\cdot)$ і Ханкеля $H_n(\cdot)$ порядку n [76, 83]. Запишемо складові електромагнітного поля, використовуючи електричні та магнітні векторні потенціали Герца U^e, U^m [75] для діелектричного циліндра U_1^e, U_1^m , коли $r \leq a$, та нескінченного шару сильно поглинаючої рідини U_2^e, U_2^m , коли $r > a$:

$$\begin{aligned} U_1^e &= \sum_n A^e J_n(k_1 r) \cos(n\varphi) \exp^{ihz}, \\ U_1^m &= \sum_n A^m J_n(k_1 r) \sin(n\varphi) \exp^{ihz}, \quad (r \leq a) \quad (2.1) \\ U_2^e &= \sum_n B^e H_n(k_2 r) \cos(n\varphi) \exp^{ihz}, \\ U_2^m &= \sum_n B^m H_n(k_2 r) \sin(n\varphi) \exp^{ihz}, \quad (r > a) \end{aligned}$$

де $k_i = \sqrt{\varepsilon_i \mu_i k_0^2 - h^2}$ – поперечне хвильове число в діелектричному циліндрі ($i=1$) та в рідині ($i=2$); k_0 – хвильове число в вакуумі, $h = h' + ih''$ – поздовжнє хвильове число (комплексний коефіцієнт поширення); $J_n(x)$ та $H_n(x)$ – циліндричні функції Бесселя та Ханкеля першого роду, порядку n ; n – азимутальний індекс

хвильоводної моди, $\varepsilon_1 = \varepsilon'_1 + i\varepsilon''_1$, та $\varepsilon_2 = \varepsilon'_2 + i\varepsilon''_2$ – КДП стрижня та рідини відповідно, де $\varepsilon'_1 \gg \varepsilon''_1$ та $\varepsilon'_2 \sim \varepsilon''_2$, a – радіус стрижня, $\mu_1, \mu_2 = 1$ – магнітна проникність стрижня та рідини; A^e, A^m, B^e, B^m – невідомі коефіцієнти. Залежність від часу приймається як $\exp(-i\omega t)$.

Запишемо шість компонент полів, за допомогою електричного $U^e(r)$ та магнітного $U^m(r)$ векторів Герца, де $r = (r, \varphi, z)$ – радіус-вектор в циліндричній системі координат [75]:

$$\begin{aligned} E_{ri} &= \frac{\partial^2}{\partial r \partial z} U_i^e + \frac{ik_i \mu_i}{r} \frac{\partial}{\partial \varphi} U_i^m; & H_{ri} &= \frac{\partial^2}{\partial r \partial z} U_i^m - \frac{ik_i \varepsilon_i}{r} \frac{\partial}{\partial \varphi} U_i^e; \\ E_{\varphi i} &= \frac{1}{r} \frac{\partial^2}{\partial \varphi \partial z} U_i^e - ik_i \mu_i \frac{\partial}{\partial r} U_i^m; & H_{\varphi i} &= \frac{1}{r} \frac{\partial^2}{\partial \varphi \partial z} U_i^m + ik_i \varepsilon_i \frac{\partial}{\partial r} U_i^e; \\ H_{zi} &= \left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} + \varepsilon_i \mu_i k_i^2 \right) U_i^m; & E_{zi} &= \left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} + \varepsilon_i \mu_i k_i^2 \right) U_i^e, \end{aligned} \quad (2.2)$$

відповідно для діелектричного стрижня ($i=1$) та сильно поглинаючої рідини ($i=2$). Підставивши U^e, U^m в (2.2), запишемо вирази для тангенціальних компонент електричного та магнітного полів для діелектричного стрижня [78]:

$$\begin{aligned} E_\varphi &= -i \left[\frac{nh}{r} A^e J_n(k_1 a) + k_0 k_1 A^m J'_n(k_1 a) \right] \sin(n\varphi) \exp^{ihz} \\ H_\varphi &= i \left[k_0 k_1 \varepsilon_1 A^e J'_n(k_1 a) + \frac{nh}{r} A^m J_n(k_1 a) \right] \cos(n\varphi) \exp^{ihz} \\ E_z &= k_1^2 A^e J_n(k_1 a) \cos(n\varphi) \exp^{ihz} \\ H_z &= k_1^2 A^m J_n(k_1 a) \sin(n\varphi) \exp^{ihz} \end{aligned} \quad (2.3)$$

та для шару сильно поглинаючої рідини:

$$\begin{aligned}
 E_{\varphi} &= -i \frac{nh}{r} \left[B^e H_n^{(1)}(g_2 a) + k g_2 B^m H_n^{(1)'}(g_2 a) \right] \sin(n\varphi) \exp^{ihz} \\
 H_{\varphi} &= i \left[k g_2 \varepsilon_2 B^e H_n^{(1)'}(g_2 a) + \frac{nh}{r} B^m H_n^{(1)}(g_2 a) \right] \cos(n\varphi) \exp^{ihz} \\
 E_z &= g_2^2 B^e H_n^{(1)}(g_2 a) \cos(n\varphi) \exp^{ihz} \\
 H_z &= g_2^2 B^m H_n^{(1)}(g_2 a) \sin(n\varphi) \exp^{ihz}
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

Задовольнивши граничні умови на межі розподілу шарів структури на Рис. 2.1, діелектричного стрижня та шару сильно поглинаючої рідини, і на зовнішній границі металевої стінки круглого хвильоводу, отримаємо систему лінійних рівнянь щодо комплексного коефіцієнту поширення $h = h' + ih''$:

$$a_{ij}(h) = 0 \quad i, j = 1, 2, 3, 4 \tag{2.5}$$

де

$$\begin{aligned}
 a_{11} &= hn J_n(k_1 a) / a, a_{12} = k_0 k_1 J_n'(k_1 a), a_{13} = -hn H_n^{(1)'}(k_1 a) / a, a_{14} = -k_0 k_2 H_n^{(1)'}(k_1 a), \\
 a_{21} &= k_0 k_1 \varepsilon_1 J_n'(k_1 a), a_{22} = hn J_n(k_1 a) / a, a_{23} = -k_0 k_2 \varepsilon_2 H_n^{(1)'}(k_2 a), a_{24} = -hn H_n^{(1)'}(k_2 a) / a, \\
 a_{31} &= a_{42} = g_1^2 J_n(k_1 a), a_{33} = a_{44} = -k_2^2 H_n^{(1)}(k_2 a)
 \end{aligned}$$

Коефіцієнти A^e, A^m, B^e, B^m визначаємо, розв'язавши систему рівнянь (2.5). При рівності визначника системи рівнянь (2.5) нулю, отримуємо характеристичне рівняння виду [76, 79, 83, 84]:

$$\begin{aligned}
 &\left(\varepsilon_2 \frac{H_n^{(1)'}(k_2 a)}{k_2 a \cdot H_n^{(1)}(k_2 a)} - \varepsilon_1 \frac{J_n'(k_1 a)}{k_1 a \cdot J_n(k_1 a)} \right) \\
 &\times \left(\mu_2 \frac{H_n^{(1)'}(k_2 a)}{k_2 a \cdot H_n^{(1)}(k_2 a)} - \mu_1 \frac{J_n'(k_1 a)}{k_1 a \cdot J_n(k_1 a)} \right) = \frac{n^2 h^2 (k_1^2 - k_2^2)^2}{k_0^2 k_1^4 k_2^4 a^4}.
 \end{aligned} \tag{2.6}$$

Постановка електродинамічної задачі для шаруватої хвилевідної структури з кінцевим шаром сильно поглинаючої рідини

Аналогічно, розглянемо розв'язання електродинамічної задачі для шаруватої хвилевідної структури з центральним діелектричним стрижнем та кінцевим шаром сильно поглинаючої рідини. Ця структура є основою вимірювальної комірки диференційного діелектрометра для виявлення КДП сильно поглинаючих рідин [16] та схематично зображено на Рис. 2.2.

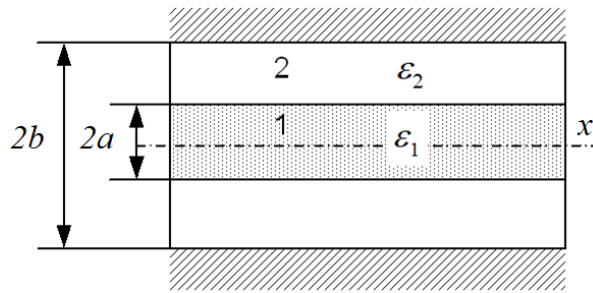


Рис. 2.2. Поздовжній перетин круглого металевого хвилеводу радіусу $b = 10$ мм з циліндричним кварцовим стрижнем (1) радіусу $a = 2.5$ мм ($\varepsilon'_1 = 3.8, \varepsilon''_1 = 0.0001$), оточеним шаром $d = (b - a)$ сильно поглинаючої рідини (2)

Вздовж радіуса a поле представлено комбінацією функцій Бесселя $J_n(\cdot)$ та Неймана $N_n(\cdot)$ порядків n . Залежність від часу приймається як $\exp(-i\omega t)$. Згідно [75], електричні U^e та магнітні U^m векторні потенціали Герца використовуємо для визначення електричних та магнітних компонент для діелектричного циліндра U_1^e, U_1^m та скінченного шару сильно поглинаючої рідини U_2^e, U_2^m :

$$U_1^e = \sum_n^{\infty} A^e J_n(k_1 r) \sin(n\varphi) \exp^{ihz}$$

$$U_1^m = \sum_n^{\infty} A^m J_n(k_1 r) \cos(n\varphi) \exp^{ihz} \quad (2.7)$$

$$U_2^e = \sum_n^{\infty} [B^e J_n(k_2 r) + C^e N_n(k_2 r)] \cos(n\varphi) \exp^{ihz}$$

$$U_2^m = \sum_n^{\infty} [B^m J_n(k_2 r) + C^m N_n(k_2 r)] \sin(n\varphi) \exp^{ihz},$$

Отримуємо характеристичне рівняння для структури з урахуванням кінцевого шару сильно поглинаючої рідини в шаруватій хвильовдній структурі:

$$(\varepsilon_2 f^e - \varepsilon_1 F)(\mu_2 f^m - \mu_1 F) = \frac{n^2 h^2 (k_1^2 - k_2^2)^2}{k_0^2 k_1^4 k_2^4 a^4}, \quad (2.8)$$

де

$$f^e = \frac{N'_n(k_2 a) J_n(k_2 b) - J'_n(k_2 a) N_n(k_2 b)}{k_2 a [N_n(k_2 a) J_n(k_2 b) - J_n(k_2 a) N_n(k_2 b)]},$$

$$f^m = \frac{J'_n(k_2 a) N'_n(k_2 b) - N'_n(k_2 a) J'_n(k_2 b)}{k_2 a [J_n(k_2 a) N'_n(k_2 b) - N_n(k_2 a) J'_n(k_2 b)]},$$

$$F = \frac{J'_n(k_1 a)}{k_1 a \cdot J_n(k_1 a)}.$$

Рівняння (2.8) співпадає з рівнянням (2.6) якщо шар сильно поглинаючої рідини нескінченний. У граничному випадку відсутності поглинаючого шару, коли $b = a$, маємо круглий металевий хвильвід, заповнений діелектриком. Коефіцієнти поширення електричних та магнітних типів хвиль у такому хвильовді є рішеннями рівнянь $J_n(k_1 a) = 0$ та $J'_n(k_1 a) = 0$ відповідно. Для азимутально-однорідних полів, для $n = 0$, рівняння (2.8) розпадається на два незалежні рівняння, що відповідає наявності в досліджуваній структурі хвильовдних мод електричного E_{0m} та магнітного H_{0m} типів, для яких індекс $m = 1, 2, \dots$ означає кількість варіацій поля за радіусом циліндра a . Азимутальний індекс n дорівнює числу максимумів, розміщених вздовж азимутальної координати φ від 0 до 2π ; радіальний індекс m дорівнює числу максимумів, розміщених вздовж аксіальної координати всередині стрижня від 0 до a . Для всіх інших мод структури, для $n \neq 0$, рівність

тангенціальних компонентів електричного і магнітного полів на межі діелектричного циліндра радіусу a може бути забезпечена тільки в класі гібридних хвиль HE_{nm} або EH_{nm} типів, всі шість компонентів електромагнітного поля яких відмінні від нуля. Рівняння (2.6) та (2.8) отримані в одномодовому наближенні та в подальших дослідженнях розглядалася хвиля HE_{11} типу, яка поширюється з найменшим загасанням вздовж кварцового стрижня в шаруватій хвилеводній структурі, в складі якої є сильно поглинаюча рідина. Чисельно вирішивши рівняння (2.6) або (2.8) знаходимо їх корені $h_{nm} = h'_{nm} + ih''_{nm}$ та розподіл електромагнітного поля в круглому двошаровому хвилеводі з сильно поглинаючою рідиною.

Таким чином, наведено розв'язання електродинамічної задачі для шаруватой хвилевідної структури з діелектричним стрижнем, оточеним нескінченним або скінченним шаром сильно поглинаючої рідини.

2.2 Розподіл електромагнітного поля в круглому двошаровому хвилеводі з сильно поглинаючою рідиною

Розглянемо розподіл структури поля хвиль вздовж радіусу двошарового хвилеводу для різної товщини шару рідини. Розрахунок амплітуд полів виконано за формулою:

$$E_{\alpha} = \sqrt{\text{Re}^2 \left\{ \hat{E}_{\alpha}(r, \varphi, z) \right\} + \text{Im}^2 \left\{ \hat{E}_{\alpha}(r, \varphi, z) \right\}}, \quad (2.9)$$

де $\hat{E}_{\alpha}(r, \varphi, z)$ – комплексні амплітуди полів, індекс α приймає значення r, φ, z .

На Рис. 2.3 наведено вигляд розподілу тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11} у круглому двошаровому аксіально-симетричному хвилеводі на частоті 12 ГГц в залежності від зміни товщини шару рідини $d = (b - a)$. Амплітуда поля хвилі HE_{11} має однаковий вигляд у кварцовому стрижні для різних товщин шарів рідини d (Рис. 2.3 I - IV) та має вигляд поля хвилі HE_{11} однорідного хвилеводу.

При досить великій товщині шару рідини (IV), який становить 0.55 см, хвиля HE_{11} практично згасає у рідині, та максимум енергії поля знаходиться у кварцовому стрижні. Зі зменшенням товщини шару рідини максимум тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11} починає більше концентруватися в рідині (II, III). Це відбувається внаслідок того, що товщина скін-шару у воді збільшується зі зменшенням частоти [85].

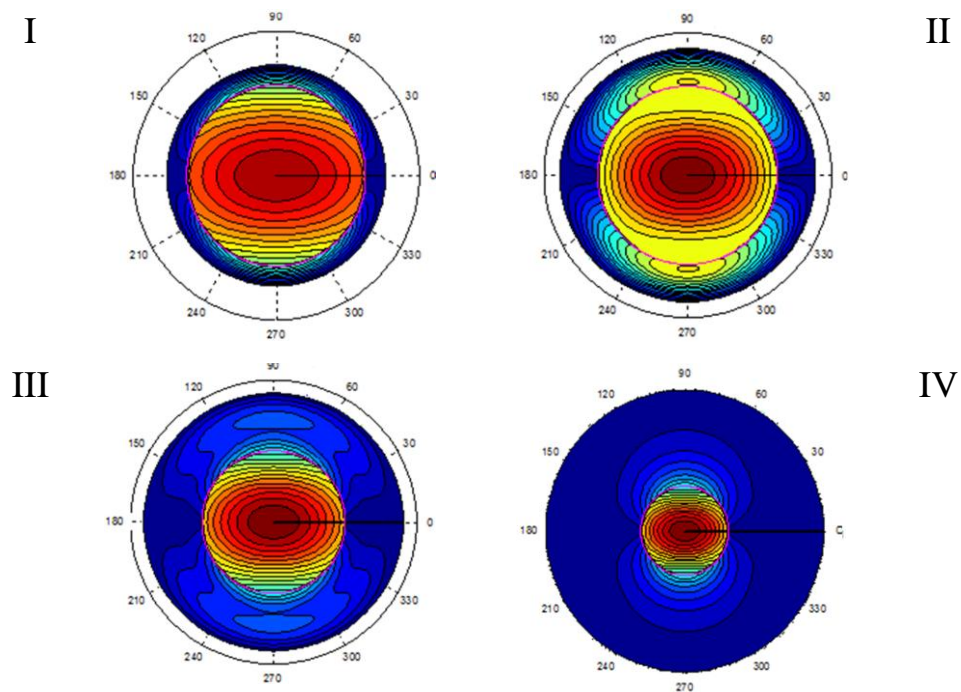


Рис. 2.3. Розподіл тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11} на частоті 12 ГГц в залежності від зміни товщини шару рідини $d = (b - a)$, см: I – 0.05; II – 0.15; III – 0.25; IV – 0.55

Отримані результати розподілу поля хвилі HE_{11} порівняні із вже відомими результатами інших авторів. Наприклад, розподіл поля гібридної хвилі HE_{11} має вигляд поля хвилі H_{11} однорідно заповненого круглого екранованого хвилеводу на високих частотах (1A) [86].

На Рис. 2.4 наведено розподіл $E_\varphi(r)$ компоненти поля хвилі HE_{11} для частот 30, 16 та 12 ГГц для двох значень шару рідини (води) $d = 0.75$ см та 0.11 см.

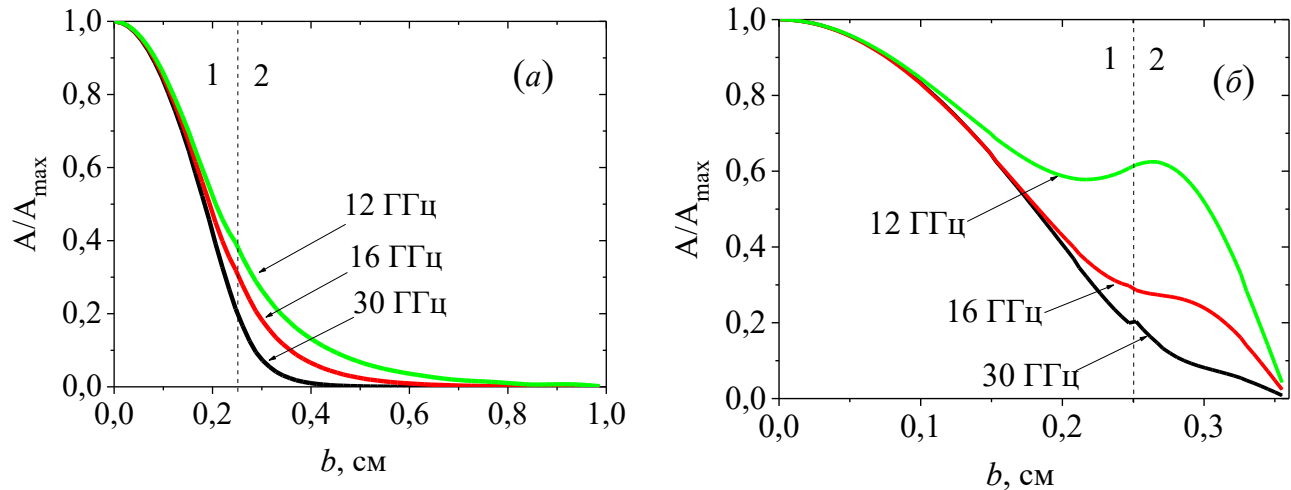


Рис. 2.4. Нормований радіальний розподіл $E_\varphi(r)$ компоненти поля хвиль HE_{11} для шару рідини $d = 0.75$ см (а) та 0.11 см (б) для частот 12, 16 та 30 ГГц. Область 1 – кварцовий стрижень; 2 – шар рідини

Показано, що для шару рідини $d = 0.75$ см амплітуда поля максимальна в кварцовому стрижні, а за його межами, в рідині, спадає практично до нуля, не доходячи до зовнішнього металевого хвиеводу (Рис. 2.4 а). Зі зменшенням частоти максимум амплітуди поля хвилі HE_{11} більше концентрується у шарі рідини. Для шаруватої хвилевідної структури із меншим шаром сильно поглинаючої рідини $d = 0.11$ см (Рис. 2.4 б), зі зменшенням частоти об'ємна частка електромагнітного поля збільшується у шарі сильно поглинаючої рідини. Розглянемо можливі причини цього явища. Зміни у розподілі $E_\varphi(r)$ компоненти поля хвилі HE_{11} у шарі сильно поглинаючої рідини при зменшенні частоти можуть бути пояснені впливом дисперсії КДП сильно поглинаючої рідини на різних

частотах. Зі зменшенням частоти спостерігається зміна діелектричних властивостей сильно поглинаючої рідини, а саме для частот менше 18 ГГц уявна частина КДП води стає меншою за дійсну частину, $\varepsilon'' < \varepsilon'$ (Рис. 1.1 та Рис. 2.12). Таким чином, зі зменшенням уявної частини КДП води, зі зменшенням частоти, об'ємна частка електромагнітного поля в шарі сильно поглинаючої рідини збільшується. Також варто відзначити, що товщина скін-шару у воді збільшується зі зменшенням частоти [85], що впливає на поширення електромагнітної хвилі в шарі сильно поглинаючої рідини.

2.3 Типи хвиль у круглій хвилевідній шаруватій структурі із сильно поглинаючою рідиною

На Рис. 2.5 представлені частотні залежності коефіцієнтів фази (а) та загасання (б) мод в круглому двошаровому хвилеводі з радіусом $b = 1$ см та циліндричним кварцовим стрижнем радіусу $a = 0.25$ см та $\varepsilon_1 = \varepsilon'_1 + i\varepsilon''_1$ ($\varepsilon''_1 / \varepsilon'_1 \ll 1$), і шаром сильно поглинаючої рідини $d = (b - a)$, води з $\varepsilon_2 = \varepsilon'_2 + i\varepsilon''_2$. Для порівняння показані моди круглого металевого хвилеводу радіусу a заповненого кварцом (синім кольором) [16]. Розв'язано характеристичне рівняння (2.8) та отримано значення комплексного коефіцієнту поширення $h_{nm} = h'_{nm} + ih''_{nm}$, де азимутальний індекс $n \leq 2$ та радіальний індекс хвилі $m = 0, 1, 2, \dots$, для яких $h''_{nm} < 200$ дБ/см в діапазоні частот 1÷60 ГГц. Магнітна проникність двох шарів μ_1 і μ_2 дорівнює одиниці. Залежності коефіцієнту фази h' для всіх мод двошарового хвилеводу на високих частотах наближаються до дисперсійних залежностей хвиль круглого хвилеводу, заповненого кварцем (Рис. 2.5, а). Це дозволяє класифікувати хвилі круглого двошарового хвилеводу з кварцовим стрижнем оточеним сильно поглинаючою рідиною, аналогічно класифікації хвиль у металевому однорідно-заповненому хвилеводі.

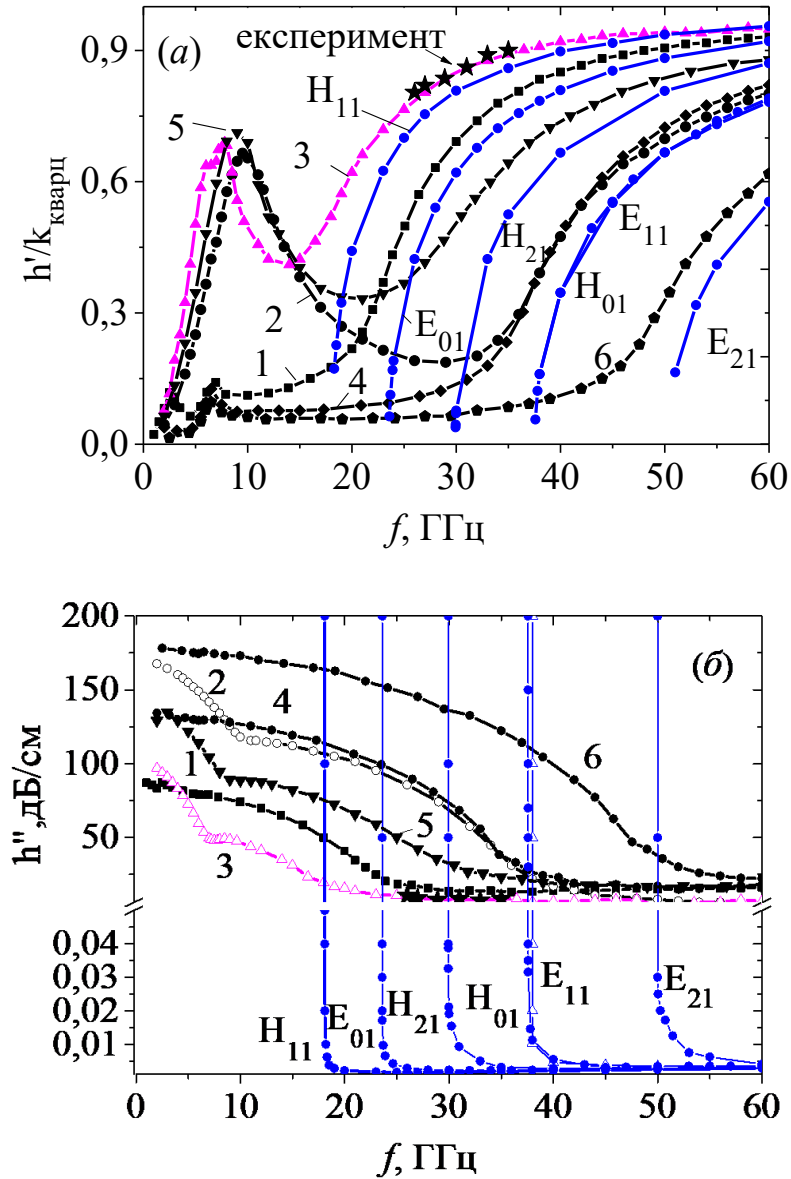


Рис. 2.5. Частотні залежності нормованого коефіцієнту фази $h'_{nm} / k_{\text{кварц}} = h'_{nm} / (k_0 \sqrt{\varepsilon'_1})$ (а) та коефіцієнту загасання (б) для ряду хвиль круглого металевого хвильоводу з центральним круглим кварцовим стрижнем і шаром води $d = (b - a)$, а також мод круглого металевого хвильоводу радіусу $a = 0.25$ см, повністю заповненого кварцом (залежності синім кольором). Цифрами позначено: 1 - E_{01} , 2 - H_{01} , 3 - HE_{11} , 4 - EH_{11} , 5 - HE_{21} , 6 - EH_{21} . Зірками позначено експериментальні дані [79]

Згідно з поведінки залежностей коефіцієнта фази для всіх мод хвилевідної структури з центральним діелектричним стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючою рідиною (Рис. 2.5 залежності чорним та фіолетовим кольором) встановлено, що в такій структурі можуть збуджуватися чотири типи хвиль. Два з них це поперечні електричні хвилі TE_{0n} і поперечні магнітні хвилі TM_{0n} , які не мають z компоненти електричного або магнітного поля відповідно. Це азимутально-однорідні поля, $n=0$, для яких індекс $m=1,2,\dots$ означає кількість варіацій поля за радіусом циліндра a . Два інших типи хвиль це гібридні хвилі HE_{nm} , EH_{nm} типу, які мають ненульові z -компоненти поля, у яких всі шість компонент електромагнітного поля відмінні від нуля. Для комірки діелектрометра вибрано хвилю типу HE_{11} , яка збуджується в діелектричному стрижні за допомогою прямокутного хвилеводу з основним типом хвилі H_{10} .

Таким чином, визначено типи хвиль, що поширюються у шаруватій хвилевідній структурі вздовж кварцового стрижня, оточеного шаром сильно поглинаючої рідини із комплексними коефіцієнтами поширення h_{nm} , та позначені цифрами на Рис. 2.5: 1 – E_{01} , 2 – H_{01} , 3 – HE_{11} , 4 – EH_{11} , 5 – HE_{21} , 6 – EH_{21} .

Немонотонна поведінка залежностей коефіцієнту фази та відсутність фіксованої частоти відсікання ряду хвиль круглого металевого хвилеводу з центральним круглим кварцовим циліндром і шаром води, відбувається через наявність шару сильно поглинаючої рідини в структурі круглого двошарового хвилеводу. Для хвиль, що поширюються вздовж кварцового стрижня, оточеного сильно поглинаючою рідиною, потрапляючи в шар сильно поглинаючої рідини, спостерігається експоненціальне загасання в шарі сильно поглинаючої рідини у напрямку, перпендикулярному до поверхні зовнішнього металевого хвилеводу (Рис. 2.4). Таким чином, параметри хвиль (коефіцієнти фази і загасання), що поширюється в досліджуваній шаруватій хвилевідній структурі із сильно поглинаючою рідиною, залежать від КДП сильно поглинаючої рідини.

Для хвиль круглого металевго хвилеводу з центральним кварцовим стрижнем і шаром води, коефіцієнти загасання мають кінцеві значення. Також важливо відзначити, що є кореляція між значеннями коефіцієнтів загасання h'' хвиль для круглого металевго хвилеводу, повністю заповненого кварцом (Рис. 2.5 залежності синім кольором) та для h'' ряду хвиль круглого металевго хвилеводу з центральним кварцовим стрижнем і шаром води (Рис. 2.5. залежності чорним кольором). Збільшення значень коефіцієнту загасання для типів хвиль круглого шаруватого хвилеводу відбувається при тих же значеннях частот, що відповідають частотам відсікання хвиль у металевих хвилеводах, заповнених кварцем. Таким чином, хвилі поширюються, але з великим загасанням. Це збільшення значень коефіцієнту загасання для хвиль шаруватого хвилеводу відповідає області перетину залежностей коефіцієнту загасання для хвиль шаруватого хвилеводу та хвиль однорідного хвилеводу (Рис. 2.5, б).

Форма залежностей $h'_{nm}(f)$ в сантиметровому діапазоні довжин хвиль найбільшою мірою визначається інтерференцією хвиль у шарі сильно поглинаючої рідини. Коефіцієнти фази всіх мод круглого шаруватого хвилеводу наближаються до нуля в діапазоні частот одиниць гігагерц, що пов'язано із збільшенням коефіцієнту загасання мод металевго хвилеводу радіусу b з діелектричними шарами.

Наявність великих діелектричних втрат у сильно поглинаючої рідини створює умови для поширення хвиль вздовж кварцового стрижня, оточеного цією рідиною, у міліметровому діапазоні частот. У такому випадку спостерігається явище “виштовхування” електромагнітного поля із сильно поглинаючої рідини, оскільки зі збільшенням частоти зменшується глибина проникнення поля у сильно поглинаючу рідину, аналогічно результатам, отриманим для аналогічної структури у роботі [79].

Серед всіх зазначених хвиль деякі хвилі мають прийнятну величину коефіцієнту загасання в широкому діапазоні частот і можуть бути використані при

розробці вимірювальних комірок діелектрометра для визначення КДП сильно поглинаючих рідин. Наприклад, для хвилі HE_{11} коефіцієнт загасання має найменші значення у діапазоні частот від 20 до 60 ГГц та дорівнює близько 10 дБ/см (Рис. 2.5 (б), залежність 3). Це дозволяє досліджувати діелектричні характеристики сильно поглинаючих рідин в міліметровому та сантиметровому діапазонах довжин хвиль, використовуючи шарувату хвилевідну структуру з центральним кварцовим стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючої рідини.

На Рис. 2.6 представлені результати розрахунку коефіцієнтів фази та загасання для чотирьох мод структури із товщиною шару $d = 2.5$ мм розчину етанолу 40% на частоті 40 ГГц в залежності від радіусу кварцового циліндра a , використовуючи рівняння (2.8), засноване на розв'язанні рівнянь Максвела. Значення КДП водного розчину етанолу 40% отримано за формулою Коула – Коула із додатковими членами Дебая, що представлено у роботі [87].

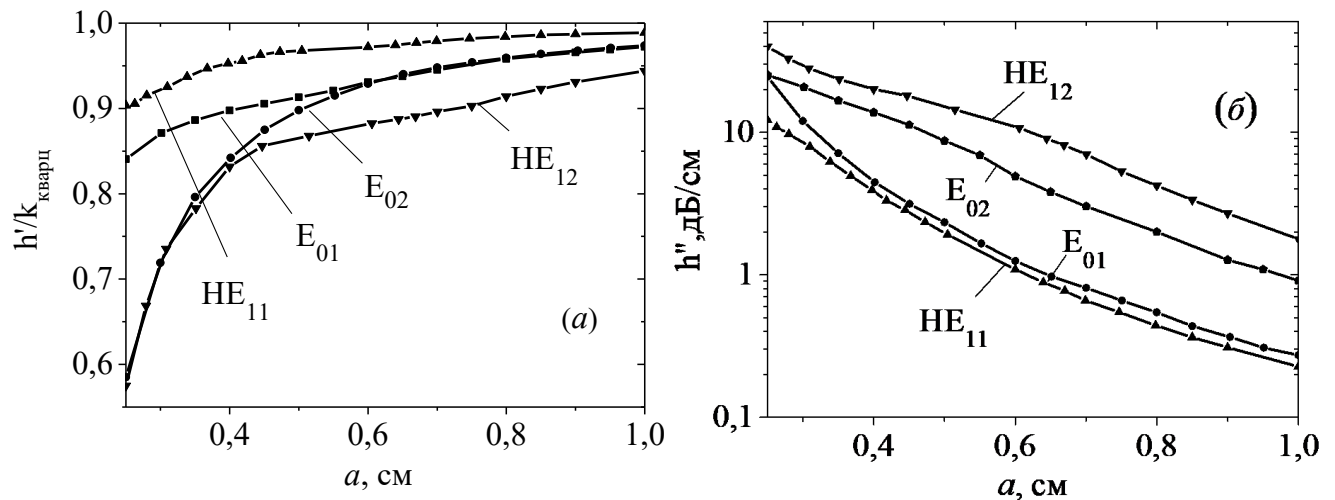


Рис. 2.6. Залежності нормованого коефіцієнту фази, $h'_{nm} / k_{\text{кварц}} = h'_{nm} / (k_0 \sqrt{\epsilon'_1})$ (а) та коефіцієнту загасання h'' (б) від радіусу центрального діелектричного циліндра у шаруватій хвилевідній структурі при фіксованій товщині шару $d = 2.5$ мм розчину етанолу 40% у воді на частоті 40 ГГц

Показано, що для всіх мод коефіцієнт загасання монотонно знижується, а коефіцієнт фази прагне до фазової швидкості плоскої хвилі в кварці. Оскільки різниця в загасанні хвиль з однаковою азимутальною симетрією досить велика (Рис. 2.6, б), має місце ефективна просторова фільтрація вищих мод.

Таким чином, можна зробити наступні висновки. Відповідно до класифікації типів хвиль, що поширюються в металевому хвилеводі, заповненому кварцом, ідентифіковано типи хвиль, що поширюються в круглому двошаровому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем оточеним шаром сильно поглинаючої рідини. Встановлено, що типи хвиль, які поширюються в круглому двошаровому хвилеводі з центральним діелектричним стрижнем та шаром сильно поглинаючої рідини, не мають фіксованих частот відсікання мод, завдяки сильно поглинаючій рідині, яка оточує діелектричний стрижень, на відміну від однорідних хвилеводів яким властиві частоти відсікання мод.

2.4 Методика проведення експерименту та визначення КДП сильно поглинаючих рідин

Застосовуючи хвилевідний метод, виявлення дійсної та уявної частин КДП водних розчинів виявляється відповідно змінам параметрів хвилі (коефіцієнтів фази та загасання), що поширюється в хвилеводній структурі. Ці параметри залежать від КДП досліджуваних водних розчинів.

Кювета з ідентичними комірками. Для дослідження діелектричних властивостей водних розчинів біологічно активних речовин (БАР) застосовано хвилевідний мікрохвильовий диференційний діелектрометр [14, 16, 19, 20, 66, 77]. Діелектрометр зображено на Рис. 2.7, в основу якого покладено диференційний метод порівняння діелектричних параметрів (КДП) двох сильно поглинаючих рідин.

Схему діелектрометра зображено на Рис. 2.8. Діелектрометр налаштований на одну робочу частоту 31.82 ГГц, що обумовлено використанням, при конструюванні діелектрометра, генератору з кварцовою стабілізацією частоти на робочій частоті 31.82 ГГц, де спостерігається частотна дисперсія дійсної та уявної частин КДП води.

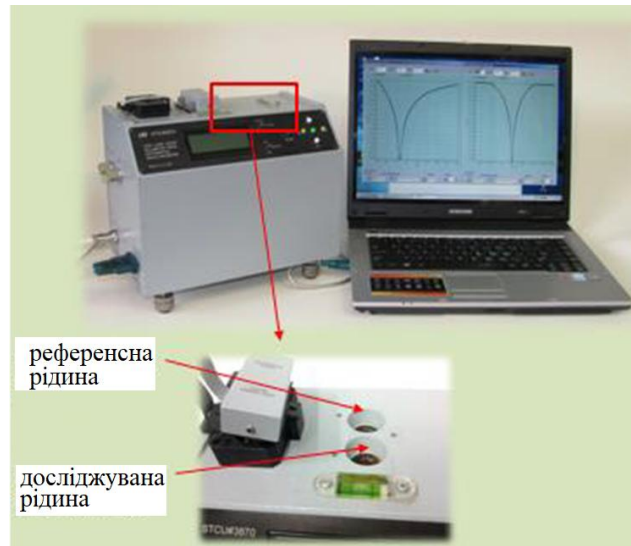


Рис. 2.7. Мікрохвильовий диференційний діелектрометр з вимірювальною кюветою, що складається з двох ідентичних комірок, підключений до ноутбуку

Схема діелектрометру складається з НВЧ моста, дві комірки кювети діелектрометру підключені до різних плечей моста. Розподіл сигналу від генератора між плечами моста відбувається через Е-трійник. Кожне з плечей моста містить вимірювальну комірку з рідиною. Для балансування моста застосовано атенюатор і фазообертач, що розташовані на плечах моста. Сигнали двох плечей моста після проходження через комірки подаються на детектор, використовуючи Н-трійник. За допомогою вимірювального р-і-п атенюатора контролюється амплітуда сигналу в одному з плечей моста. У другому плечі моста використовується вимірювальний фазообертач, який представляє собою переміщуваний короткозамкнений поршень. Поршень переміщується за

допомогою крокового двигуна. Керування параметрами вимірювального атенюатора і фазообертача в плечах моста відбувається за допомогою програми мікроконтролера управління вимірювального блоку.

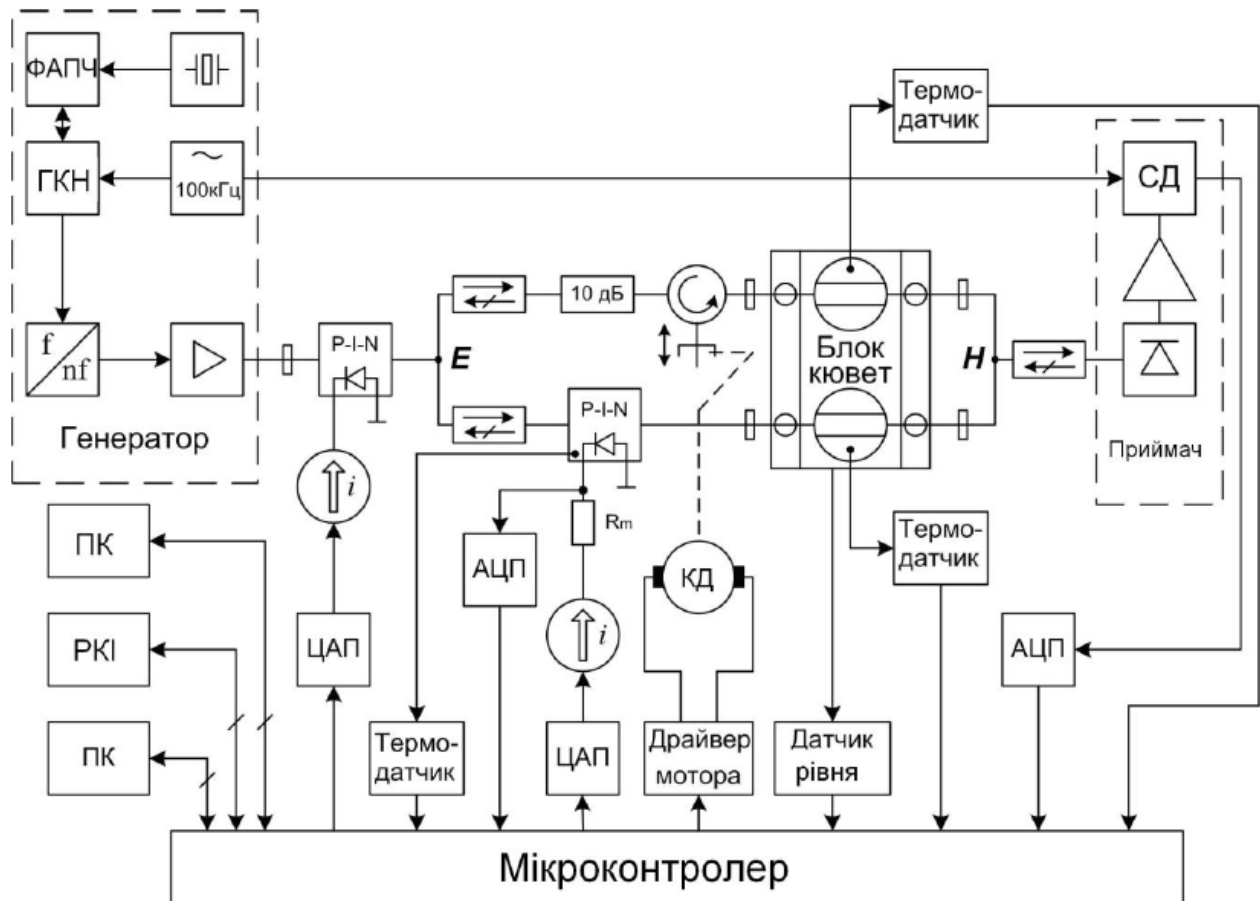


Рис. 2.8. Схема мікрохвильового диференційного діелектрометра

Вимірювальна кювета діелектрометра з двома ідентичними комірками схематично зображена на Рис. 2.9. Кожна комірка виконана у вигляді циліндричної порожнини радіусу $b = 10$ мм у латунному корпусі кювети, з об'ємом рідини 7 мл кожна. Перпендикулярно боковим поверхням комірок розташовано кварцові стрижні (1, Рис. 2.9) радіусу $a = 2.5$ мм та довжиною $L = 28$ мм, з КДП $\varepsilon_1 = \varepsilon'_1 + i\varepsilon''_1$, $\varepsilon''_1/\varepsilon'_1 \ll 1$. Сильно поглинаюча рідина, з КДП $\varepsilon_2 = \varepsilon'_2 + i\varepsilon''_2$, $\varepsilon''_2/\varepsilon'_2 \sim 1$, заповнює простір між кварцовим стрижнем та стінками комірки.

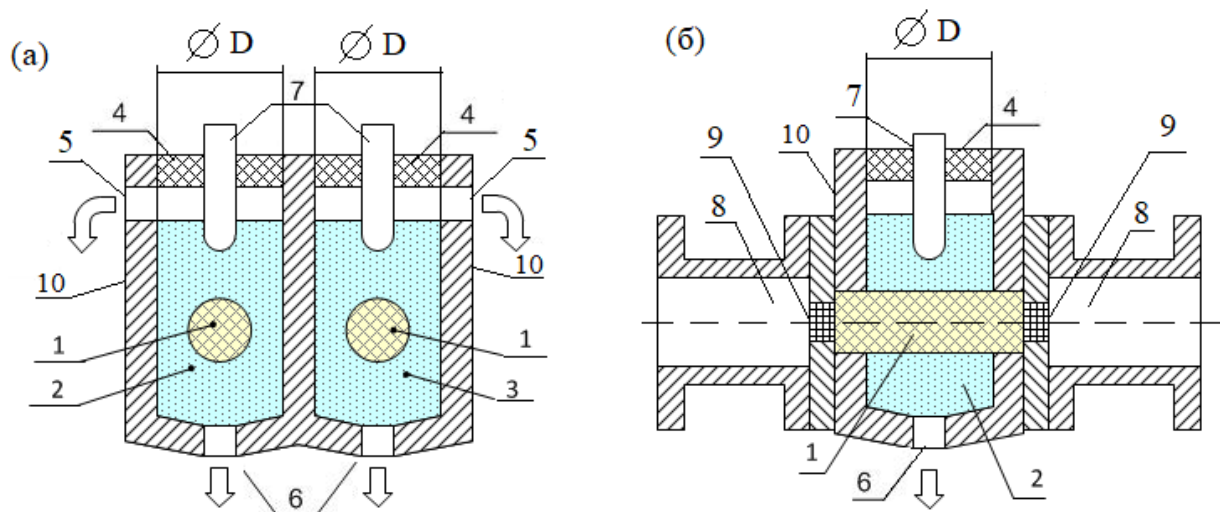


Рис. 2.9. Схематичне зображення кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра: поперечного (а) і повздовжнього (б) перетину. Цифрами зображено: 1 – кварцові стрижні; 2, 3 – рідини; 4 – кришки; 5 – переливні отвори; 6 – зливні отвори; 7 – датчики температури; 8 – хвилевідні секції прямокутного перетину; 9 – кругла секція, заповнена тефлоном; 10 – циліндричні порожнини радіусу $b=10$ мм у латунному корпусі кювети

Одна комірка призначена для досліджуваної рідини (2, Рис. 2.9), інша – для еталонної рідини (3, Рис. 2.9). В якості еталонної рідини використовувалась дистильована вода або фізіологічний розчин (0.9% водний розчин натрію хлориду). У кришках (4, Рис. 2.9) комірок розташовано датчики температури (7, Рис. 2.9). Кожна комірка містить переливні отвори 5 та зливні отвори 6. До вимірювальних комірок НВЧ сигнал надходить через стандартний прямокутний хвилевід міліметрового діапазону (8, Рис. 2.9) з поперечним перетином 7.2×3.4 мм². Ці стандартні прямокутні хвилеводи з'єднані з кожною коміркою за допомогою перетворювачів типів хвиль, якими є узгоджувальні пластини (9, Рис. 2.9), необхідні для перетворення хвилі H_{10} типу прямокутного хвилеводу у HE_{11} тип хвилі круглого шаруватого хвилеводу. Перетворювачі типів хвиль

складені із круглих діелектричних вставок, що знаходяться в отворах стінок комірок та в металевих вставках прямокутних хвильоводів (Рис. 2.9, 9), так що кварцові стрижні, перетворювачі типів хвиль та прямокутні хвильоводи співвісні.

Слід зазначити, що діелектрометр є лабораторним зразком із вимірювальними комірками у ланунному корпусі. Тому у деяких випадках може бути необхідним покриття латунних комірок тонким шаром золота або іншого матеріалу для запобігання окисненню.

Варто відзначити, що під час експериментального визначення коефіцієнтів фази і загасання HE_{11} хвилі, яка поширюється вздовж кварцових стрижнів, оточених сильно поглинаючою рідиною, відбувається процес формування хвилі HE_{11} . Цей процес включає дифракцію хвилі HE_{11} в області перетину круглого кварцового стрижня із бічною поверхнею комірки, в якій міститься сильно поглинаюча рідина. Як наслідок, область поширення хвилі HE_{11} буде меншою за довжину стрижня. Таким чином, формування хвилі HE_{11} у круглому кварцовому стрижні відбувається не в місці з'єднання стрижня з коміркою, а на якійсь кінцевій відстані. Таким чином, у розрахунках КДП рідин, замість розгляду геометричної довжини стрижня $L = 28$ мм, використовується ефективна довжина стрижня $L_{eff} = 19.9$ мм. Це значення ефективної довжини стрижня майже не відрізняється від діаметру комірки $D = 20$ мм, яке раніше отримано із результатів чисельного моделювання комірки [77], геометрія якої була ідентична геометрії комірки, використаної в експерименті.

На Рис. 2.10 представлені амплітудна та фазова функції діелектрометричних вимірювань для однакової рідини (води) в обох комірках (1), та коли в одній комірці міститься еталонна рідина, в іншій – досліджувана (2). На початку вимірювання, після заповнення обох комірок еталонною рідиною, досягається температурний баланс у диференційних комірках, що визначається за допомогою датчиків температури (7, Рис. 2.9). Далі, за допомогою аттенюатора та

фазообертача, вимірюються мінімуми фази φ_r та амплітуди A_r електромагнітної хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцових стрижнів у вимірювальних комірках діелектрометра, обидві заповнені еталонною рідиною, де символ r позначено для еталонної (reference) рідини. Після реєстрації залежностей фазового та амплітудного зсувів визначається мінімум амплітудних F_A та фазових F_φ функцій. Ці характеристики демонструються на моніторі комп'ютера у режимі реального часу під час зміни амплітуди та фази сигналу у плечах моста, що забезпечується мікроконтролером (Рис. 2.8).

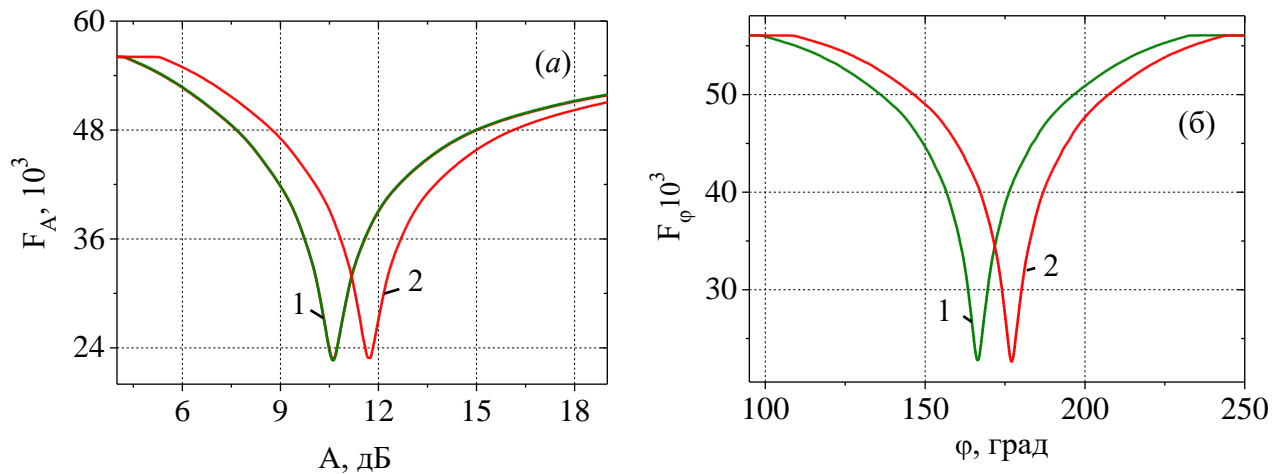


Рис. 2.10. Амплітудні (а) і фазові (б) функції для дистильованої води в двох комірках (1) і для дистильованої води в одній комірці та досліджуваної в іншій (2) при кімнатній температурі

Далі одну з комірок звільняємо від еталонної рідини та заповнюємо досліджуваною рідиною і ще раз вимірюємо значення мінімумів амплітуди A_t і набіг фази φ_t , де символом t (tested) позначено для досліджуваної рідини. В результаті показання мінімуму фазової F_φ та амплітудної функції F_A відповідають новому мінімальному положенню. Для досягнення максимальної

точності визначення фазового та амплітудного зсувів, про що свідчать здійснені випробування, необхідно зробити три ітерації. Кожна ітерація зводиться до наступної процедури. Під час першого кроку ітерації відбувається сканування фази за зафіксованою амплітудою, після чого знаходиться мінімум фазової функції. Наступний крок – фазообертач становиться у мінімальне положення та відбувається сканування амплітуди, і знаходиться мінімум амплітудної функції. Наступним кроком є повернення атенюатора в положення мінімуму, завершуючи таким чином першу ітерацію. що достатньо провести три ітерації для досягнення максимально точного балансу моста.

Експериментальні данні на Рис. 2.10 отримуються в електронному вигляді для подальших розрахунків різниці мінімумів фази $\Delta\varphi = (\varphi_r - \varphi_t) / 2b$ [град/см] та мінімумів різниці амплітуд $\Delta A = (A_r - A_t) / 2b$ [дБ/см] хвилі HE_{11} (2, Рис. 2.10), коли в одній комірці міститься еталона рідита, а в іншій – досліджувана, нормовані на одиницю довжини комірки $2b$, що дорівнює діаметру комірки D . Абсолютна похибка визначення різниці фаз та амплітуд хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцових стрижнів у вимірювальних комірках діелектрометра, дорівнюють відповідно 0.4 град та 0.01 дБ [77, 88].

Методика розрахунку КДП досліджуваної рідини шляхом розв'язання зворотної задачі, розв'язання характеристичного рівняння (2.6) для шаруватої хвилевідної структури з досліджуваною рідиною, виконано за наступним алгоритмом, що зображена схематично на Рис. 2.11. На схемі позначено дійсну та уявну частини КДП еталонної $\varepsilon'_r, \varepsilon''_r$ та досліджуваної $\varepsilon'_t, \varepsilon''_t$ рідин; h'_r, h''_r та h'_t, h''_t – дійсна та уявна частини комплексного коефіцієнту поширення хвилі, коли у вимірювальних комірках міститься еталонна та досліджувана рідина, відповідно. Символи r та t позначені відповідно для еталонної та досліджуваної рідин.

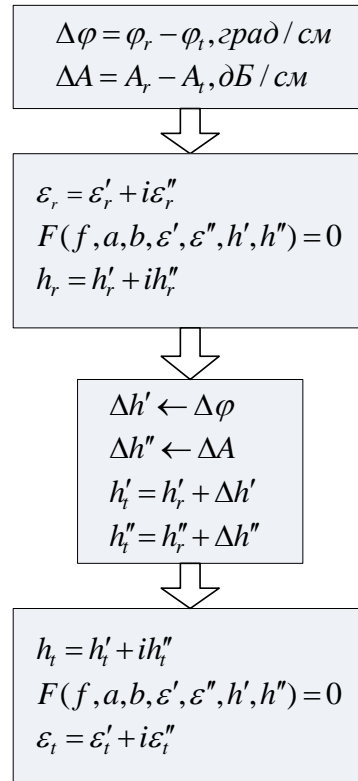


Рис. 2.11. Схематичне зображення процедури визначення дійсної та уявної частин КДП рідин, використовуючи експериментально отримані значення різниці фази $\Delta\varphi$ та амплітуди ΔA електромагнітної хвилі типу HE_{11} , що поширюється в комірках кювети

Частотні залежності дійсної ε' та уявної ε'' частин КДП для води та водно-сольового розчину (0.9% NaCl) представлені на Рис. 2.12. У діапазоні частот від 0 до 20 ГГц дійсна частина КДП води більша за уявну, а для частот більше 20 ГГц – дійсна частина КДП води стає меншою за уявну частину. Це становить інтерес для дослідження діелектричних характеристик сильно поглинаючих рідин в складі круглої хвилевідної шаруватої комірки в сантиметровому діапазоні довжин хвиль.

Значення ε' та ε'' на Рис. 2.12 отримані за формулами Дебая [30]:

$$\varepsilon' = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad \varepsilon'' = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty})\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (2.10)$$

де ε_s – статична діелектрична проникність, ε_∞ – діелектрична проникність на високих частотах (на таких частотах, при яких орієнтація диполів молекули не встигає внести вклад у поляризацію), ω – кругова частота, τ – час релаксації. Відповідні значення ε_s , ε_∞ та τ представлені в літературних джерелах для води [5, 89] та водно-сольового розчину [90, 91].

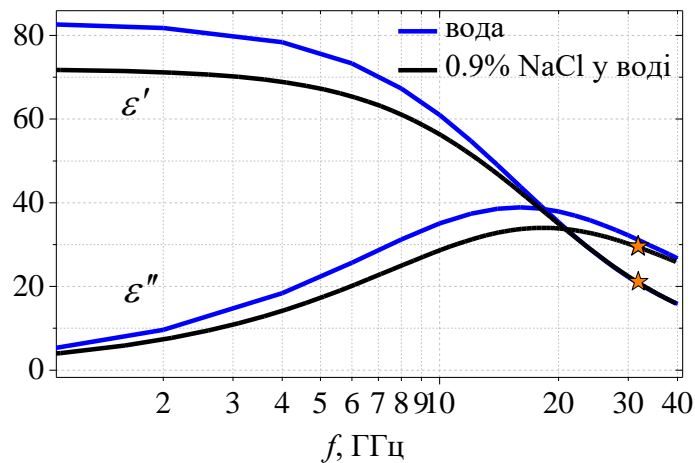


Рис. 2.12. Залежності дійсної та уявної частин КДП для води (синім кольором) та водно-сольового розчину 0.9% NaCl (чорним кольором) від частоти. Зірками позначені експериментально отримані значення КДП для води на частоті 31.82 ГГц методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії [92]

Для структури вимірювальної комірки диференційного діелектрометру з центральним діелектричним стрижнем, оточеним нескінченним шаром рідини, розв'язуємо характеристичне рівняння (2.6) для знаходження КДП досліджуваних розчинів. Для автоматизації процесу, що передбачає чисельне розв'язання характеристичне рівняння, використано комп'ютерну програму з графічним інтерфейсом, алгоритм якої описано в [93, 94]. За цим алгоритмом, впродовж декількох хвилин, можливо знаходити КДП досліджуваних розчинів за значеннями h_{nm} . При розв'язанні характеристичного рівняння (2.6), задаються

значення $h_t' = h_r' + \Delta\varphi$ та $h_t'' = h_r'' + \Delta A$, використовуючи виміряні значення різниці фаз $\Delta\varphi$ та амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється в комірках кювети вздовж кварцових стрижнів, оточених рідиною. Використовуючи значення дійсної ε_r' та уявної ε_r'' частин КДП еталонної рідини, отримаємо відмінні від нуля значення різниці дійсних $\Delta\varepsilon' = \varepsilon_r' - \varepsilon_t'$ та уявних $\Delta\varepsilon'' = \varepsilon_r'' - \varepsilon_t''$ частин КДП досліджуваної рідини. Показано, що метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії має високу чутливість визначення КДП сильно поглинаючих рідин, через виявлення малої відмінності КДП (до 0.1%) двох сильно поглинаючих рідин, які містяться в комірках кювети діелектрометру, коли одна з рідин має відоме значення КДП [94].

Отримані експериментально різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється у вимірювальних комірках з референсною та досліджуваною рідинами, використовуємо для знаходження різниці коефіцієнтів фаз $\Delta h_t'$ та загасання $\Delta h_t''$ хвилі HE_{11} , $\Delta h'' = \Delta A / l$ та $\Delta h' = \Delta\varphi / l$, де $l = 2b$ – довжина кварцових стрижнів. Коефіцієнт загасання h_t'' та фази h_t' хвилі HE_{11} в комірці з досліджуваною рідиною розраховують за формулами: $h_t'' = h_r'' + \Delta h''$ та $h_t' = h_r' + \Delta h'$, відповідно, де h_r'' і h_r' отримані з характеристичного рівняння (2.6) з використанням відомих значень КДП еталонної рідини. Далі розраховуємо значення КДП досліджуваної рідини $\varepsilon_t = \varepsilon_t' + i\varepsilon_t''$ розв'язавши зворотну задачу, використовуючи отримані значення h_t'' та h_t' . Щоб отримати достовірні значення КДП досліджуваної сильно поглинаючої рідини, потрібно з високою точністю знати КДП еталонної рідини, якою є дистильована вода.

Таким чином, методика визначення КДП рідини включає наступні етапи:

1. Визначення КДП досліджуваної рідини починається із визначення різниці фаз $\Delta\varphi_t = (\varphi_r - \varphi_t) / 2b$ [град/см] та різниці амплітуд $\Delta A_t = (A_r - A_t) / 2b$ [дБ/см], коли в обох комірках міститься референсна рідина (φ_r , A_r) та коли в одній із комірок

міститься досліджувана рідина, а в іншій еталонна (φ_r , A_t), де символ r та t позначено для референсної та досліджуваної рідини, відповідно.

2. Розв'язуючи характеристичне рівняння (2.6) за відомою КДП референсної рідини знаходимо коефіцієнти фази $h'_r[\text{рад}/\text{см}]$ та загасання $h''_r[\text{дБ}/\text{см}]$ для HE_{11} хвилі в комірці з референсною рідиною.

3. Потім, за вимірними значеннями різниці фаз і амплітуд хвилі, розраховуємо коефіцієнти фази $h'_t = h'_r + \Delta\varphi$ та загасання $h''_t = h''_r + \Delta A$ хвилі для досліджуваної рідини.

4. Із розв'язання характеристичного рівняння (2.6) розраховується КДП $\varepsilon_t = \varepsilon'_t + i\varepsilon''_t$ досліджуваної рідини за знайденими h''_t і h'_t .

Для калібрування мікрохвильового діелектрометра проводиться вимірювання водно-етанольних розчинів, як типових представників поглинаючих рідин, з відомими діелектричними характеристиками [1, 3, 68, 72]. Також ці рідини використовуються в якості еталонних рідин в діелектрометрії із застосуванням open-ended хвильоводної техніки [1, 68, 95], а значення КДП води часто використовується як точка відліку для порівняння з іншими рідинами, що дозволяє проводити диференційні вимірювання. Дисперсійне співвідношення КДП для таких рідин до K_a діапазону частот добре описується формулою Дебая [30, 33, 89]. На Рис. 2.13 показано діаграми Коул-Коула для дійсної та уявної частин КДП при 23°C та параметрами $\tau, \varepsilon_0, \varepsilon_\infty$ для води та водно-етанольних розчинів, отримані згідно формули:

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}}, \quad (2.11)$$

де параметр α приймає значення від 0 до 1, коли $\alpha = 0$, модель Коула-Коула зводиться до моделі Дебая, для $\alpha > 0$ релаксаційна модель Коула-Коула поширюється на ширший діапазон ω , на відміну від релаксації Дебая. На Рис. 2.13 зображено суцільними лініями – діаграмами Коула-Коула, точками та

Кювета з комітками різної довжини без використання еталонної рідини. В вимірювальній комітці мікрохвильового діелектрометра диференційного типу використовується достатньо товстий шар рідини (товщина шару набагато більше робочої довжини хвилі) для визначення КДП сильно поглинаючих рідин на фіксованій частоті [77]. Це призводить до необхідності

мати достатньо великі об'єми сильно поглинаючих рідин, або до практичної неможливості визначення КДП рідин із відносно низьким коефіцієнтом згасання. Кювету мікрохвильового диференційного діелектрометра з ідентичними комірками розглянуто як прототип вдосконаленої кювети з комірками різної довжини, яка не потребує використання еталонної рідини. Показано, що шарувата хвилевідна структура з сильно поглинаючою рідиною в міліметровому діапазоні довжин хвиль може мати досить малі коефіцієнти згасання в сантиметровому діапазоні хвиль (нижче за частоту відсікання круглого хвилеводу повністю заповненого кварцем) через наявність сильно поглинаючої рідини та може бути реалізована в якості аксіально-симетричної вимірювальної комірки [16]. У роботі [97] показано, що в сантиметровому діапазоні довжин хвиль залежності коефіцієнтів поширення та згасання стають немонотонними при дослідженні діелектричних властивостей сильно поглинаючих рідин у складі шаруватої хвилеводної комірки.

На Рис. 2.14 представлені результати чисельних розрахунків залежностей коефіцієнту фази та згасання хвилі HE_{11} круглого двошарового хвилеводу в залежності від нормованої товщини шару води d/a . Кожній залежності відповідає фіксоване значення частоти від 7 до 30 ГГц, де $d = (b - a)$. Залежності коефіцієнту фази від товщини шару рідини мають періодичний характер. А значення коефіцієнту згасання електромагнітної хвилі мають малі значення в сантиметровому діапазоні довжин хвиль, що спостерігається при певних значеннях шарів рідини та певних частотах (Рис. 2.14, б). Така поведінка залежностей на Рис. 2.14 пов'язана з інтерференцією хвилі HE_{11} в шарі сильно поглинаючої рідини, відбитої від стінки металевого хвилеводу і кордону діелектричного стрижня. Із залежностей на Рис. 2.14 виділено три характерні значення товщини шарів сильно поглинаючої рідини $d = (b - a)$, порівнюючи їх з $1/\Lambda$, де $\Lambda = (k_0 \sqrt{(|\varepsilon_2| - \varepsilon'_2)/2})^{-1}$ – уявна частина хвильового вектора плоскої хвилі в

рідині [18], де $k_0 = 2\pi f / c$ – хвильове число у вільному просторі, а c – швидкість світла.

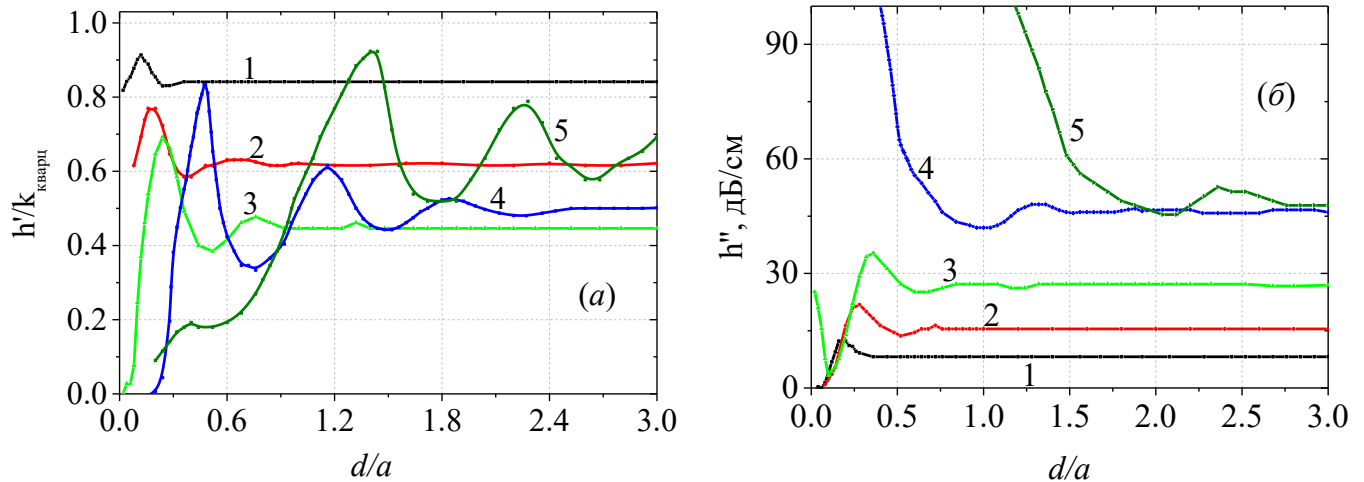


Рис. 2.14. Залежності нормованого коефіцієнту фази $h'_{nm} / (k_0 \sqrt{\epsilon'_1}) = h'_{nm} / k_{\text{кварц}}$ (а) та коефіцієнту згасання h'' (б) хвилі HE_{11} від нормованої товщини шару води d/a для частот в ГГц: 1 – 30; 2 – 20; 3 – 16; 4 – 12; 5 – 10

В області тонких шарів сильно поглинаючої рідини, коли $d \ll \Lambda$, значення коефіцієнтів фази хвилі HE_{11} , що поширюється в круглому металевому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем та коаксіальним шаром води, прагне до значення коефіцієнту фази хвилі H_{11} круглого хвилеводу для частот вище критичної (Рис. 2.14а, залежності 1, 2). В іншому випадку, для частот нижче критичної частоти, значення коефіцієнтів фази прагнуть нуля (Рис. 2.14а, залежності 3-5).

На частотах, вище критичної частоти, коефіцієнти загасання при $b \rightarrow a$ прагнуть до значень, що визначаються втратами в кварцовому циліндрі (Рис. 2.14, залежності 1-3). В іншому випадку втрати різко зростають, як в однорідних хвилеводах поблизу критичної частоти (Рис. 2.14, залежності 4, 5). Поширення

хвиль на частотах нижче критичної частоти хвилеводу з тонким шаром рідини обумовлено зменшенням діелектричних втрат у рідині із зменшенням частоти. Зміни діелектричних властивостей води, а саме $\varepsilon'' < \varepsilon'$ для $f < 18$ ГГц, впливають на поширення хвилі HE_{11} у кварцовому стрижні, оточеному водою. Це відображається у немонотонній поведінці залежностей коефіцієнтів фази та згасання хвилі HE_{11} для круглого шаруватого хвилеводу з водою у сантиметровому діапазоні.

Для величин шарів сильно поглинаючої рідини $d \gg \Lambda$ залежності $h'(d/a)$ та $h''(d/a)$ на Рис. 2.14 наближаються до значень коефіцієнтів фази та загасання хвиль у циліндричному каналі в нескінченному поглинаючому середовищі. Для товщини шарів $d \sim \Lambda$ залежності $h'(d/a)$ та $h''(d/a)$ є немонотонними. Період варіацій залежностей збільшується зі збільшенням довжини хвилі.

Застосування такої круглої шаруватої структури в якості нової комірки з тонкими шарами досліджуваної рідини, дозволяє визначати діелектричні властивості рідин у більш широкому діапазоні частот, а також зменшити кількість рідини, необхідної для вимірювань. Встановлено, що використовуючи комірки з шаром досліджуваної рідини $d \sim \Lambda$ підвищується диференційна чутливість комірки діелектрометра для визначення КДП сильно поглинаючої рідини. Де диференційна чутливість – це можливість розрізняти зміну коефіцієнтів фази та загасання в результаті зміни концентрації C речовини в досліджуваному розчині, яку можна визначити як $\partial h' / \partial C$ та $\partial h'' / \partial C$. Цей висновок підтверджується результатами які представлено в підпункті 2.5 на Рис. 2.18 де зображено залежності коефіцієнтів фази та загасання хвилі HE_{11} в залежності від зовнішнього радіуса хвилеводу b та для різних концентрацій C етанолу у воді.

Завдяки розрахованим залежностям на Рис. 2.14 можна знайти значення частоти та значення параметра d/a для визначення частотного діапазону поширення хвилі HE_{11} з прийнятним значенням коефіцієнту загасання. На підставі

цих параметрів можна вибрати робочий діапазон частот, для якого не виникають хвилі вищих типів.

На Рис. 2.15 представлені тривимірні залежності коефіцієнтів фази та згасання хвилі HE_{11} , що поширюється в круглому двошаровому хвилеводі з сильно поглинаючою рідиною від зміни частоти та нормованої товщини шару рідини d/a . Знайдені три області різкої зміни коефіцієнту згасання, які відповідають максимальним значенням коефіцієнту фази. Немонотонна поведінка залежностей коефіцієнтів фази та згасання хвилі HE_{11} круглого шаруватого хвилеводу з водою в сантиметровому діапазоні пояснюється змінами діелектричних властивостей сильно поглинаючої рідини, тому що в цьому діапазоні частот спостерігається дипольно-релаксаційний механізм поляризації молекул води [5]. На Рис. 2.15 позначеннями 1А, 1В, 1С та 2А, 2В, 2С відмічені значення частот, для яких отримано розподіл тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11} та представлено в Таблиці 2.1.

Аналогічні розрахунки залежності коефіцієнту фази та коефіцієнту загасання виконані для структури з центральним тефловим стрижнем радіуса $a=2.5$ мм [97]. Різка зміна коефіцієнтів фази та загасання для шаруватого хвилеводу з центральним кварцовим $\varepsilon_{\text{кварц}} = 3.8 + i \cdot 0.0001$ або тефлоновим $\varepsilon_{\text{тефлон}} = 2.1 + i \cdot 0.0001$ стрижнем, оточеним шаром сильно поглинаючої рідини, спостерігається при дуже близьких значеннях частоти та величин нормованого шару сильно поглинаючої рідини d/a .

В Таблиці 2.1 зображено структуру поля HE_{11} хвилі при зміні частоти для двох близьких значень шару сильно поглинаючої рідини d/a , які позначені на Рис. 2.15, 1А – 2С.

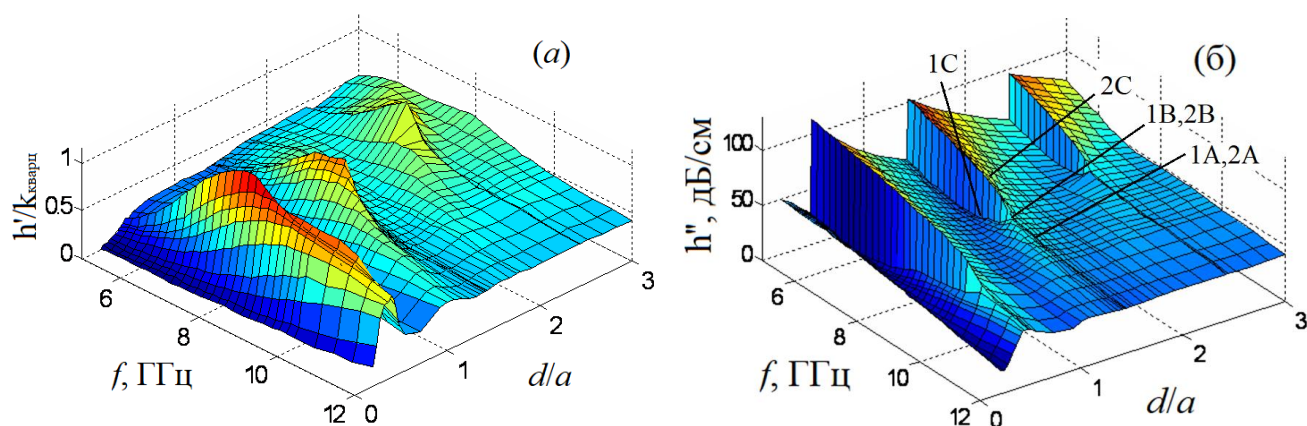
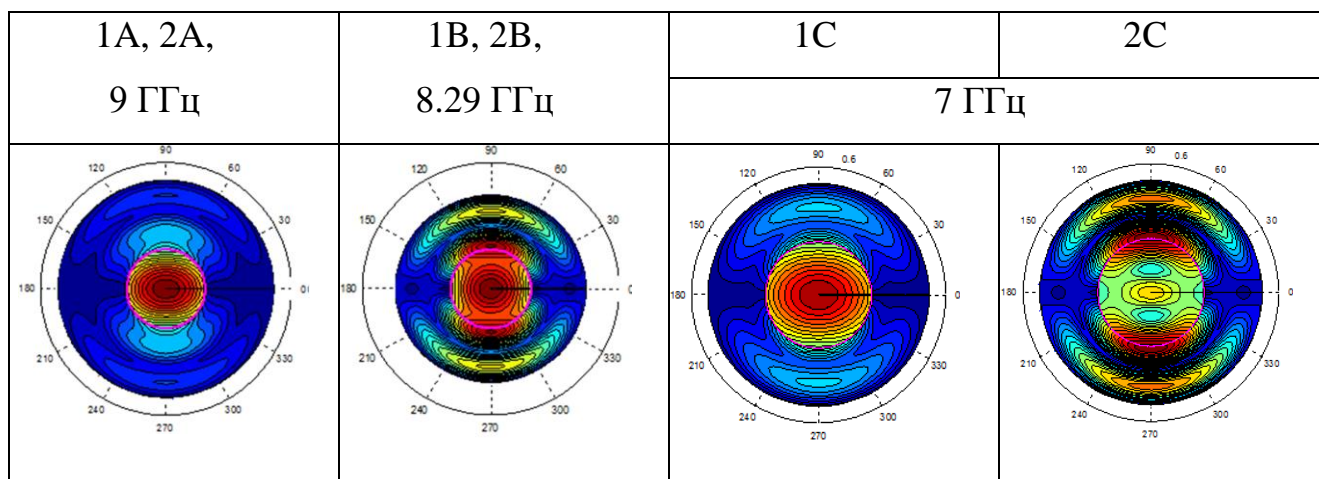


Рис. 2.15. Тривимірна залежність нормованого коефіцієнту фази (а) та загасання (б) HE_{11} хвилі в двошаровому хвилеводі з центральним кварцовим циліндричним стрижнем радіусу $a = 0.25$ см і шаром води від частоти та різних нормованих значень шару сильно поглинаючої рідини d/a при температурі 23°C . Позначеннями 1А, 1В, 1С та 2А, 2В, 2С відмічені значення частот, для яких отримано розподіл тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11}

Таблиця 2.1. Розподіл тангенціальної компоненти поля хвилі HE_{11} в залежності від частоти. Позначення 1А, 2А, 1В, 2В, та 1С 2С відповідають значенням частот на Рис. 2.15



В інтервалі значень $d/a = 1.42276 \div 1.42272$ спостерігається різка зміна значень коефіцієнту згасання хвилі HE_{11} . Зі зменшенням частоти, порівнюючи залежності коефіцієнту згасання хвилі HE_{11} для двох значень $d/a = 1.42276$ та 1.42272 , значення коефіцієнту загасання різко змінюється. А саме, для $d/a \geq 1.42276$ – величина згасання різко збільшується, а для $d/a \leq 1.42272$ – зменшується.

Структура електромагнітного поля хвилі HE_{11} зі зменшенням частоти суттєво змінюється. Максимум амплітуди тангенціальної компоненти електричної складової поля хвилі HE_{11} зосереджений у кварцовому стрижні для частоти 9 ГГц (1А). Такий вигляд розподілу поля хвилі HE_{11} в кварцовому стрижні подібний до розподілу поля хвилі H_{11} круглого однорідного хвилеводу. Для частоти 8.29 ГГц максимум амплітуди поля хвилі HE_{11} зосереджений як у діелектричному стрижні, так і в шарі сильно поглинаючої рідини (1В та 2В, Рис. 2.15). Із подальшим зменшенням частоти спостерігається область розщеплення залежностей коефіцієнтів згасання та структура поля HE_{11} хвилі змінюється для двох близьких величин товщини шару d/a (1В та 2В, Рис. 2.15). Для частоти 7 ГГц вид розподілу поля хвилі HE_{11} (1С та 2С) відрізняється для двох значень $d/a = 1.42276$ та 1.42272 . Максимум амплітуди поля хвилі HE_{11} для величини товщини шару рідини $d/a = 1.42272$ (2С) зі збільшенням частот перестає бути яскраво вираженим у кварцовому стрижні та зміщується у шар рідини, та коефіцієнт згасання збільшується. Для величини товщини шару рідини $d/a = 1.42276$ (1С) максимум амплітуди поля хвилі HE_{11} зосереджений в кварцовому стрижні, та коефіцієнт згасання хвилі має досить малі значення.

Результати визначення КДП поглинаючих рідин з рівняння (2.8) перевірені за допомогою електромагнітного моделювання за допомогою комерційної програми CST Microwave Studio [16] та представлені на Рис. 2.16. Зміна довжини

комірки не впливає на коефіцієнт відбиття S_{11} , а отже, і на перетворення хвилі H_{10} прямокутного хвильоводу в хвилю HE_{11} круглого шаруватого хвильоводу. Таким чином, різниця між амплітудою і фазою, відповідно, коефіцієнтів пропускання S_{21} комірок, поділена на різницю між довжинами комірок, дає значення коефіцієнтів фази h' та загасання h'' . Коефіцієнти відбиття для кювет з різними довжинами для води однакові, тому відбиття від торців кювет не впливатиме на результати вимірювань коефіцієнтів фаз h' та загасання h'' в двох комірках.

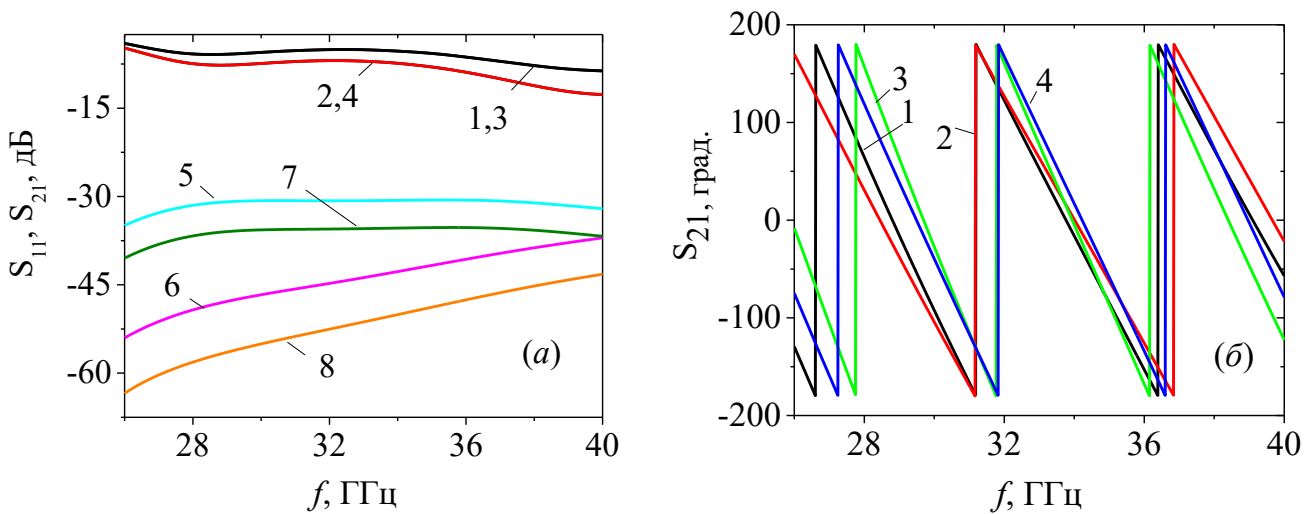


Рис. 2.16. Залежності амплітуди коефіцієнта відбиття S_{11} і коефіцієнта пропускання S_{21} (а) та фази коефіцієнта пропускання (б) для вимірювальних комірок різної довжини, заповнених різними рідинами. Залежності під номерами 1, 2, 5 і 6 відповідають довжині комірки $l = 25$ мм; 3, 4, 7 і 8 для $l = 30$ мм. Панель (а): залежності 1–4 для S_{11} , 5–8 для S_{21} ; 1, 3, 5 і 7 для води; залежності 2, 4, 6 і 8 – для 40% етанолу у воді; Панель (б): залежності 1 і 3 для води; 2 і 4 для 40% етанолу у воді

Результати відновлення значень КДП рідин із даних на Рис. 2.16 показані точками на графіку Коула–Коула (Рис. 2.13) для чотирьох частот. Різниця між

значеннями КДП рідин, отриманими з результатів розрахунку в CST Microwave Studio на основі розрахунку S-параметрів, і значеннями КДП рідин, отриманими з рівняння (2.8) не перевищує кількох десятих відсотка. Цю відповідність даних можна вважати цілком задовільною.

Спроековано нову вдосконалену конструкцію шаруватої хвилевідної вимірювальної комірки з типом хвилі HE_{11} для визначення КДП сильно поглинаючих рідин в тонкому шарі з високою диференційною чутливістю, отримано патент на винахід України [17, 24]. На Рис. 2.17 зображено структуру вдосконаленої вимірювальної кювети, основні елементи якої це: 1 – круглі циліндричні отвори, радіусу $b = 3.2$ мм, у металевому корпусі кювети; 2 – металевий корпус кювети; 3 – центральний круглий циліндричний кварцовий стрижень з радіусом $a = 2.5$ мм та довжиною одного стрижня $l_1 = 25$ та довжиною другого $l_2 = 30$ мм; 4 – коаксіальний шар $d = (b - a)$ досліджуваної рідини ($\varepsilon_2'' / \varepsilon_2' \geq 1$); 5 – перетворювачі типу хвилі H_{10} прямокутного перетину в хвилю HE_{11} шаруватого хвилеводу; 6 – прямокутні хвилеводи; 7 і 8 – отвори для заповнення і зливання рідини, відповідно; 9 – узгоджувальні металеві вставки з круглими отворами. Використовуючи вдосконалену кювету вимірюється різниця амплітуд та різниця фаз хвилі HE_{11} , які виникають через застосування кювети з комірками різної довжини. Для цієї кювети компенсовано виникнення систематичної похибки вимірювання, що спостерігалось для кювети діелектрометру з однаковими комірками, пов'язаної з дифракцією хвилі HE_{11} на бокових поверхнях кожної комірки. Нова вдосконалена кювета відрізняється від кювети діелектрометру тим, що рідина, яка досліджується, міститься в обох комірках, комірки виконані у вигляді круглих отворів у металевому корпусі таким чином, що діелектричні стрижні співвісні отворах, при цьому довжини комірок відмінні одна від одної, а відстань між стрижнями та поверхнями отворів, не перевищує довжину електромагнітної хвилі у рідині.

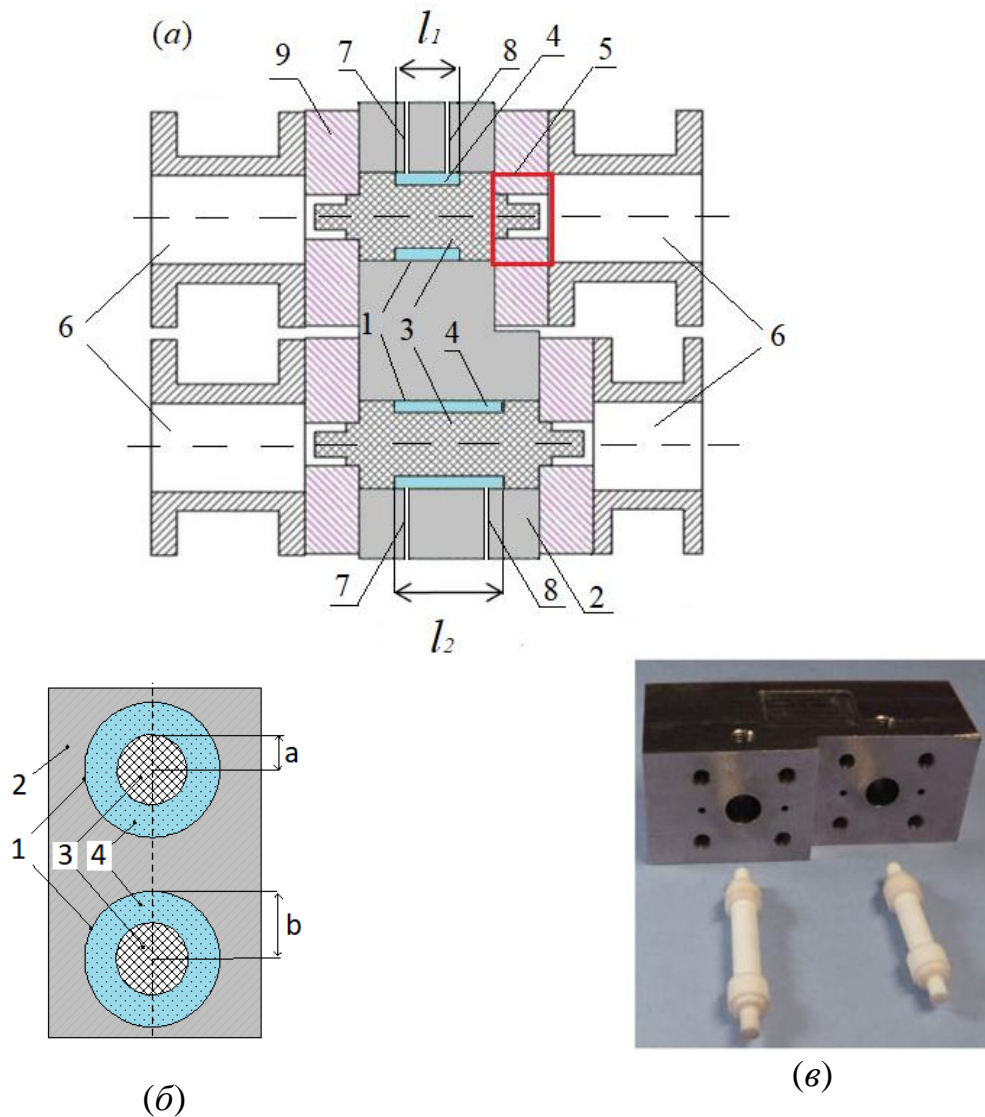


Рис. 2.17. Поздовжній (а), поперечний (б) перетини та фото (в) структури вимірювальної кювети з двома комірками різної довжини [74]. Цифрами позначено: 1 – круглі циліндричні отвори радіусу $b = 3.2$ мм у корпусі кювети із нержавіючої сталі; 2 – металевий корпус; 3 – круглий діелектричний циліндричний стрижень радіусу $a = 2.5$ мм та довжиною стрижнів $l_1 = 25$ та $l_2 = 30$ мм; 4 – досліджувана рідина; 5 – перетворювачі типу хвилі H_{10} прямокутного перетину в хвилю HE_{11} шаруватого хвилеводу; 6 – прямокутні хвилеводи; 7 і 8 – отвори для заповнення і зливання рідини, відповідно; 9 – узгоджувальні металеві вставки з круглими отворами

У випадку використання кювети діелектрометра з комірками різної довжини методика визначення КДП рідини значно спрощується, порівняно з методикою визначення КДП рідини із застосуванням ідентичних комірок. Таким чином, у разі використання діелектрометра з кюветою, що має комірки різної довжини, одразу знаходяться коефіцієнти фази $h'_i[\text{рад/см}]$ та загасання $h''_i[\text{дБ/см}]$ хвилі для досліджуваної рідини. Далі, за знайденими значеннями h'_i і h''_i із розв'язання характеристичного рівняння (2.8) розраховується КДП досліджуваної рідини.

Таким чином, до критеріїв оптимізації вдосконаленої кювети можливо віднести наступне:

- 1) обчислювана геометрія, через те, що для такої шаруватої хвилевідної структури можна отримати точний розв'язок характеристичного рівняння (2.8);
- 2) абсолютне визначення КДП рідин, через те, що тепер немає потреби в еталонній рідині;
- 3) підвищено чутливість визначення КДП рідин;
- 4) можливість визначення КДП рідин в діапазоні частот;
- 5) використання невеликого об'єму рідини близько 1 мл у кожній комірці, навідміну від кювети з ідентичними комірками з об'ємом рідини близько 7 мл у кожній комірці;
- 6) спрощена процедура промивання й дезінфекції комірок.

Таким чином, можна зробити наступні висновки. Вдосконалено кювету діелектрометра з об'ємом досліджуваної рідини близько 1 мл в кожній комірці, яка складається з двох комірок різної довжини, внаслідок чого компенсовано вплив дифракційних ефектів на краях комірок та відсутня потреба у референсній рідині. Використання вдосконаленої кювети дозволить визначати КДП сильно поглинаючих рідин в широкому діапазоні частот від міліметрових до

сантиметрових довжин хвиль з основним типом хвилі HE_{11} типу з найменшим значенням коефіцієнту загасання поміж інших типів хвиль. Отримано добре узгодження експериментальних даних КДП води та водно-етанольних розчинів із даними, отриманими за формулою Дебая.

2.5 Чутливість методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії визначення КДП

Виконано оцінку чутливості методу визначення КДП сильно поглинаючої рідини, пов'язану з вибором оптимальної товщини шару досліджуваної рідини на прикладі водного розчину етанолу. За результатами числових розрахунків отримано значення коефіцієнтів фаз та коефіцієнтів згасання хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцового стрижня, оточеного сильно поглинаючою рідиною – водним розчином етанолу у воді різної концентрації [98].

На Рис. 2.18 зображено залежності коефіцієнтів фаз і коефіцієнтів згасання HE_{11} хвилі, що поширюється в досліджуваній структурі з водним розчином етанолу на частоті 31.82 ГГц, для різних значень радіусу металевого хвилеводу b . Знайдено максимуми коефіцієнтів поширення та загасання хвилі HE_{11} , які добре розрізняються для різних концентрацій етанолу у воді для достатньо тонкого шару рідини, завдяки чому чутливість визначення КДП рідин зростає. А саме, чутливість визначення КДП рідин зростає у 5 разів за коефіцієнтом фази та у 2 рази за коефіцієнтом загасання, наприклад для $b \sim 0.31 \div 0.4$ см [98] порівняно із $b > 0.4$ см [77] при дослідженні рідин з концентрацією етанолу у воді 20%. Таким чином, вибір оптимального радіусу b залежить від КДП досліджуваної рідини.

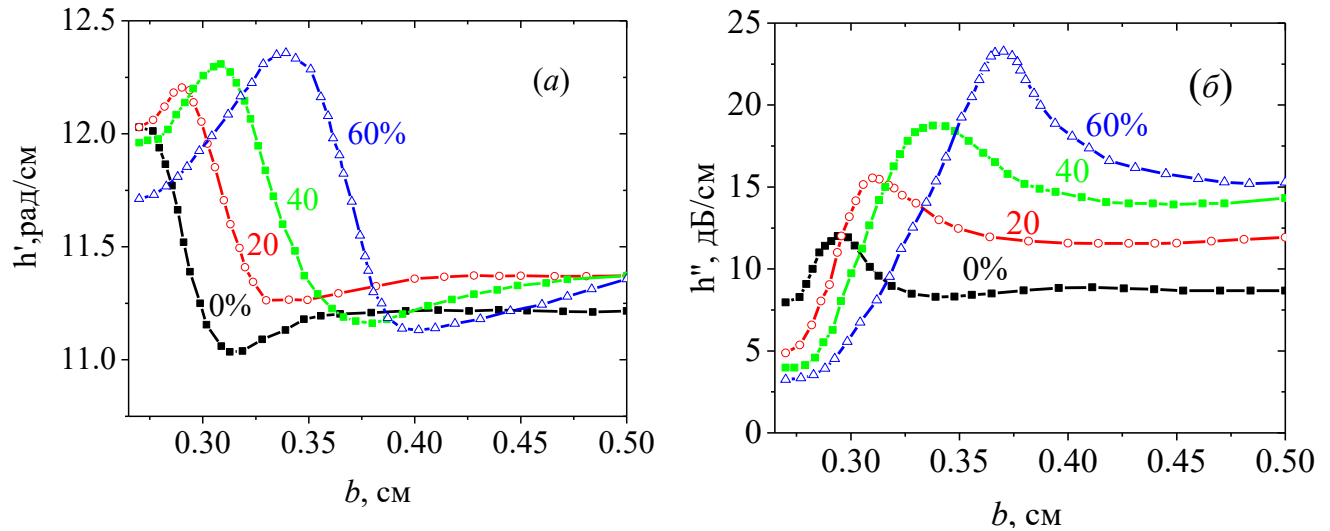


Рис. 2.18. Залежності коефіцієнтів фази (а) та згасання (б) хвилі HE_{11} від товщини шару водно-етанольного розчину з концентрацією 0÷60% етанолу на частоті 31.82 ГГц

На Рис. 2.19 представлені розраховані залежності коефіцієнтів фази та загасання хвилі HE_{11} круглої шаруватої хвилевідної структури від концентрації етанолу у водному розчині для ряду значень радіусу b металевого хвилеводу для частоти 32.82 ГГц [77, 99]. Максимальна зміна коефіцієнтів фази та згасання спостерігається при відповідному виборі значення шару сильно поглинаючої рідини $d = (b - a)$, від чого залежить чутливість визначення КДП цієї рідини. Вибір значення d залежить від КДП досліджуваної рідини. Чим більша зміна стиліх поширення та згасання при зміні концентрації спирту від 0 до 60 %, тим вища чутливість визначення КДП досліджуваного розчину. Таким чином, наприклад, при вимірюванні рідин з концентрацією етанолу у воді від 20 до 40% можливо використовувати кювету з шаром рідини $d = 0.07$ см (Рис. 2.19, залежність 5).

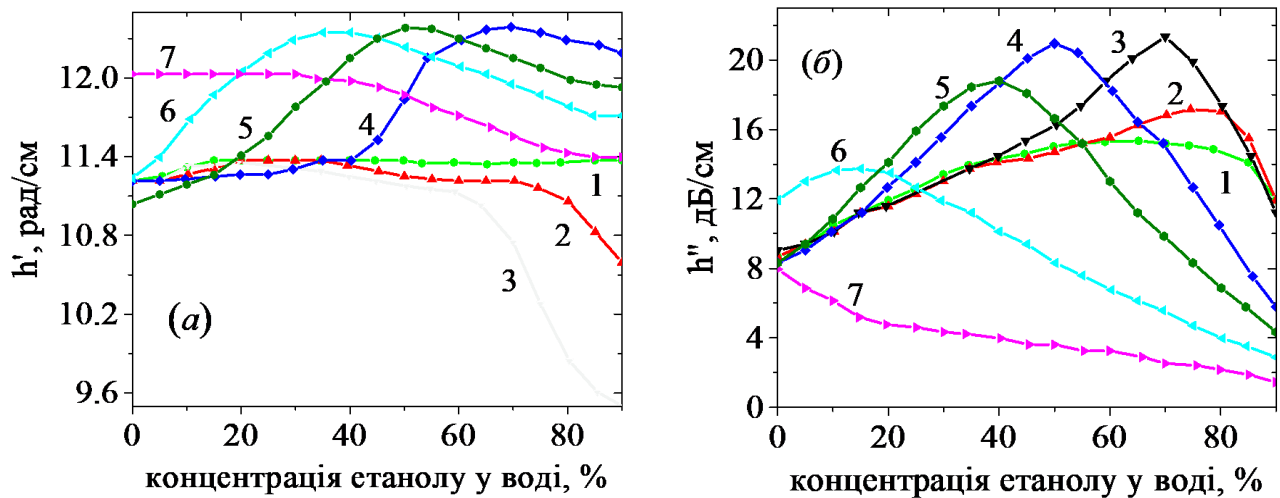


Рис. 2.19. Залежності коефіцієнтів фази (а) та згасання (б) хвилі HE_{11} від концентрації етанолу 0÷60 % у воді на частоті 31.82 ГГц для різних значень радіусу b металевого хвильоводу: 1 – 1.0 см; 2 – 0.45 см; 3 – 0.4 см; 4 – 0.35 см; 5 – 0.32 см; 6 – 0.3 см; 7 – 0.28 см

На Рис. 2.20 показано тривимірні залежності коефіцієнтів фази та коефіцієнтів згасання хвилі HE_{11} від товщини шару $d = (b - a)$ водного розчину етанолу з концентрацією від 0 до 60 % на частоті 15 ГГц. Чутливість визначення КДП водно-етанольного розчину тим вище, чим більша зміна значень коефіцієнтів фази та згасання при зміні концентрації етанолу від 0 до 60% у воді. Максимальна зміна коефіцієнтів фази та коефіцієнтів згасання спостерігається відповідно при малих значеннях $b = 0.3 \div 0.5$ см та $b = 0.33 \div 0.45$ см зовнішнього металевого хвильоводу, що відповідають меншим об'ємам досліджуваних розчинів. Таким чином, вибір оптимальної товщини шару досліджуваного розчину впливає на чутливість методу визначення КДП рідини.

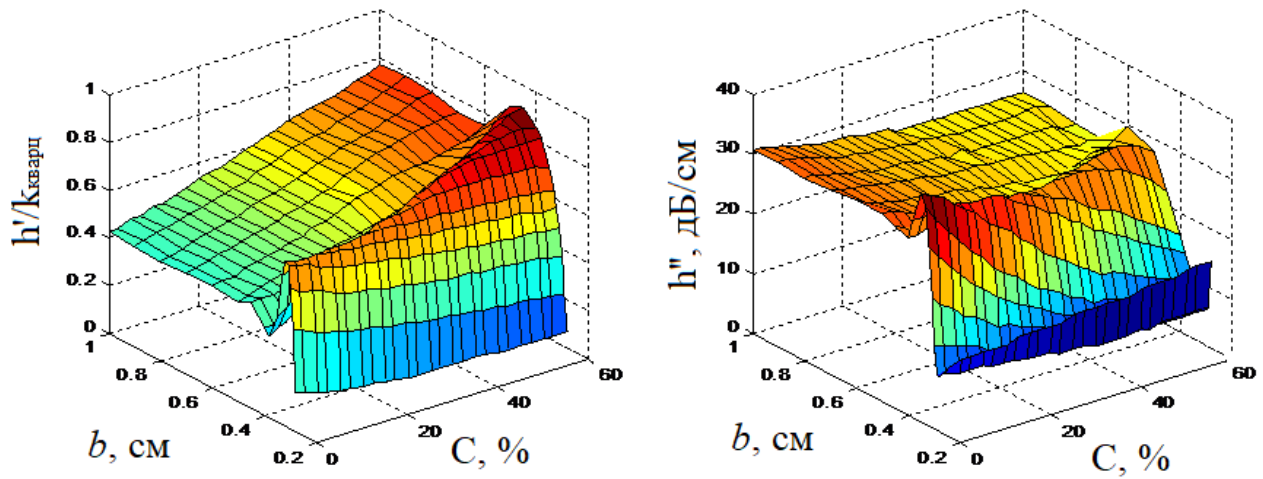


Рис. 2.20. Тривимірні графіки залежності нормованих коефіцієнтів фази та згасання хвилі HE_{11} шаруватої хвилевідної структури для різних величин зовнішнього радіусу b з шаром водного розчину етанолу $d = (b - a)$ з концентрацією етанолу $C = 0 \div 60$ % на частоті 15 ГГц

Таким чином, підвищено чутливість визначення КДП сильно поглинаючих рідин у 5 разів, визначаючи коефіцієнт фази, та у 2 рази, визначаючи коефіцієнт загасання хвилі HE_{11} для вдосконаленої кювети з об'ємом досліджуваної рідини близько 1 мл у кожній комірці при дослідженні водно-етанольних розчинів.

2.6 Висновки до розділу 2

1. За результатами чисельних розрахунків ідентифіковано типи хвиль, що поширюються в круглому двошаровому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем оточеним шаром сильно поглинаючої рідини відповідно до класифікації типів хвиль, що поширюються в металевому хвилеводі, заповненому кварцом. Показано добре узгодження чисельно отриманих даних з експериментальними даними для хвилі HE_{11} . Встановлено, що наявність сильно поглинаючої рідини в круглому двошаровому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем призводить

до відсутності частот відсікання мод, на відміну від однорідно-заповнених хвильоводів, яким властиві частоти відсікання мод.

2. Виявлено три області максимумів коефіцієнту фази та періодичної зміни коефіцієнту згасання хвилі HE_{11} в сантиметровому діапазоні довжин хвиль при незначній зміні частоти або величини товщини шару досліджуваної рідини d . При великих величинах шарів сильно поглинаючої рідини $d = 0.75$ см у вимірювальних комірках, максимум електромагнітного поля хвилі HE_{11} зосереджений в кварцовому стрижні і має вигляд поля хвилі H_{11} однорідного хвильоводу. При зменшенні зовнішнього радіусу металевого хвильоводу, де коефіцієнт загасання має значення вище 55 дБ/см відбувається перерозподіл структури поля хвилі HE_{11} . Таким чином, змінюючи частоту та величину шару досліджуваної сильно поглинаючої рідини можливо оптимізувати чутливість структури вимірювальної комірки до змін КДП сильно поглинаючої рідини, з прийнятним для практичних застосувань коефіцієнтом загасання хвилі HE_{11} , що поширюється в структурі, від сантиметрового до міліметрового діапазону довжин хвиль.

3. Розроблено вимірювальну комірку з підвищеною чутливістю визначення КДП сильно поглинаючих рідин без використання еталонної рідини на основі шаруватої хвильовідної аксіально-симетричної структури з центральним діелектричним стрижнем та тонким шаром досліджуваної рідини $d = 0.07$ см, в порівнянні з коміркою діелектрометра з більшим шаром досліджуваної рідини $d = 0.75$ см. Чутливість визначення КДП рідин зростає у 5 разів, визначаючи коефіцієнт фази та у 2 рази, визначаючи коефіцієнт загасання, при дослідженні водно-етанольних розчинів. Нова конструкція комірок, в порівнянні з прототипом, має спрощену процедуру промивання й дезінфекції комірок з об'ємом досліджуваної рідини 1 мл у кожній комірці, що має істотне значення при дослідженні діелектричних властивостей водних розчинів в області малих концентрацій біологічно активних речовин.

РОЗДІЛ 3

ДИЕЛЕКТРОМЕТРІЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У МІКРОХВИЛЬОВОМУ ДІАПАЗОНІ ЧАСТОТ

У мікрохвильовому діапазоні частот розташована область максимальної частотної дисперсії дійсної та уявної частин КДП води, тому цей діапазон є найбільш прийнятним для дослідження водних розчинів біологічно активних речовин. В результаті взаємодії біологічно активних речовин (БАР) між собою (які значно більші за молекули води) та з молекулами води, на поверхні молекул БАР утворюється шар зв'язаних молекул води [12, 27, 43]. Це позначається на поглинанні електромагнітного поля розчином, через те, що біологічно активні речовини призводять до зменшення кількості вільних молекул води, доступних для поляризації, внаслідок чого КДП розчину зменшується [58]. Збільшення кількості молекул води, зв'язаних із розчиненими молекулами, загалом призводить до зменшення як дійсної, так і уявної частин КДП водного розчину, оскільки зв'язані молекули води мають обмежену рухливість і знижену поляризованість [4, 12].

Визначення концентрації БАР в розчинах є важливою сферою досліджень, зокрема в технологічних процесах фармацевтичної та харчової промисловості, в медичних діагностичних процедурах у клінічних лабораторіях, а також напрямків досліджень, що стосуються екологічної безпеки водного господарства. Точне визначення концентрації білка в різних технологічних розчинах або в біологічних розчинах, включаючи сироватку крові, наприклад найпоширенішого білка плазми крові людини – сироваткового альбуміну людини, є однією з найбільш затребуваних діагностичних процедур у клінічних лабораторіях та завдань, пов'язаних з технологічними процесами фармацевтичної чи харчової промисловості. Сироваткового альбуміну людини є найпоширенішим білком плазми людини, який відіграє важливу фізіологічну роль – має антиоксидантну та

антикоагулянтну дію та є ефективним буфером рН плазми [100], та високий рівень цього білка свідчить про дегідратацію організму [101, 102]. Тому визначення рівня альбуміну в сироватці або плазмі крові є одним із важливих параметрів фізіологічного стану пацієнта і активно використовується у біомедичній галузі для діагностики патологічних станів, в тому числі печінки та нирок [103].

На сьогодні більшість методів визначення кількості БАР, зокрема визначення залишкових кількостей антибіотиків у різноманітних зразках, проводяться в лабораторних умовах з використанням спеціалізованого обладнання, тварин, витратних матеріалів, які є довготривалі та трудомісткі, а існуючі комерційні тест-системи закордонного виробництва є високовартісними та, найчастіше, недоступні для широкого використання. Серед методів визначення складу і властивостей БАР найбільш поширеними є мікробіологічні, імунологічні методи і метод високоефективної рідинної хроматографії, чутливість останнього становить $0.5 \div 5$ мкг/г. Для більшості мікробіологічних методів, чутливість яких складає одиниці нг/г, можливе проведення контролю вмісту БАР в розчині тільки в умовах довготривалого і трудомісткого процесу в лабораторних умовах з використанням додаткового обладнання. Також існує потреба в розробці надійних методів екологічного контролю щодо залишкових кількостей антибіотиків та органічних забруднювачів у пробах води з навколишнього середовища.

В даному розділі приведено результати експериментальних досліджень визначення концентрації БАР (етанол, глюкоза, антибіотики, дифтерійний анатоксин, сироватковий альбумін людини) за показниками їх діелектричних властивостей у мікрохвильовому діапазоні на частоті 31.82 ГГц, застосовуючи мікрохвильовий диференційний діелектрометр, характеристики якого порівняно з іншими методами, та представлено в Таблиці 1.2. Отримані значення КДП водних розчинів БАР зменшуються від збільшення концентрації, через зменшення кількості вільних молекул води в розчині. Ці експериментальні дані діелектрометричних вимірювань на прикладі таких самих розчинів білків та

розчинів антибіотиків підтверджено двома іншими методами: методом молекулярної динаміки (МД) [15] та методом спектрофотометрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах довжин хвиль (UV-Vis) [14].

У порівнянні з класичними методами контролю, згаданими вище, радіофізична методика, зокрема, мікрохвильова диференційна діелектрометрія в області частотної дисперсності дійсної та уявної частин КДП води, є перспективним методом моніторингу БАР у розчинах. Метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії для визначення рівню БАР в розчині за показниками дійсної та уявної частин КДП є альтернативним серед існуючих методів. Цей метод є перспективним для контролю безпеки зразків імунобіологічних лікарських засобів (вакцин), зокрема процесу переходу дифтерійного токсину в нетоксичну форму – анатоксин [104]. Ідентифікацію переходу токсину в безпечну форму можливо проводити в лабораторних умовах із застосуванням методу флуориметрії, але все ще іноді передбачаються рутинні випробування з використанням морських свинок або кроликів [105]. Але є рекомендації щодо виключення використання тварин для експериментальних цілей при виготовленні вакцин [106].

У цьому розділі представлено результати визначення КДП деяких розчинів БАР та рідких зразків живильного середовища із вмістом дифтерійного анатоксину за допомогою мікрохвильової диференційної діелектрометрії. Результати, представлені в розділі, опубліковані в статтях [14, 15, 20], увійшли у главу книги [19] та доповідалися на конференціях [92, 98, 104, 107–109].

3.1 КДП водних та сольових розчинів глюкози

Метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії застосовано для кількісного визначення глюкози ($C_6H_{12}O_6$) у водному та фізіологічному розчинах за показниками дійсної та уявної частин КДП розчинів [19, 92, 108]. Проведено дослідження щодо визначення КДП водних та сольових розчинів глюкози різної

концентрації. Для цього використовували водні розчини глюкози та фізіологічні розчини (0.9 % NaCl) глюкози із концентрацією від 0 до 1111 ммоль/л, що відносяться до лікарських розчинів та застосовується у біомедичній практиці. На Рис. 3.1 представлено графіки залежностей різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} від концентрації глюкози у водному розчині на частоті 31.82 ГГц при кімнатній температурі ($t = 23^\circ C$).

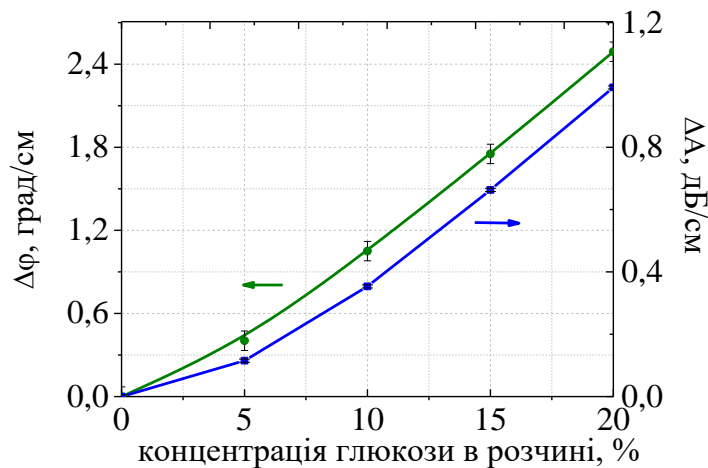


Рис. 3.1. Залежності різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} від концентрації глюкози у воді

Абсолютна похибка визначення різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцових стрижнів у вимірювальних комірках діелектрометра, дорівнюють відповідно 0.4 град та 0.01 дБ [77, 88]. Ці похибки визначення різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , нормовані на довжину стрижня, що відповідає діаметру комірки $D = 2$ см, дорівнюють $\delta\varphi_{meas.} = \pm 0.2$ град/см і $\delta A_{meas.} = \pm 0.005$ дБ/см. Довжина стрижня дорівнює діаметру комірки з похибкою, яка не перевищує 2% [88].

В якості референсної рідини при визначенні КДП водних та водно-сольових розчинів глюкози використовували дистильовану воду та фізіологічний

розчин (0.9 % NaCl), відповідно. Відсутність відмінностей фази та амплітуди спостерігається у випадку, коли еталонна рідина (дистильована вода) міститься в обох комірках діелектрометра $\Delta\varphi, \Delta A = 0$, тоді як спостерігається їх різниця $\Delta\varphi, \Delta A \neq 0$, коли одна з комірок заповнена досліджуваною рідиною – водним розчином глюкози, а інша – еталонною. Збільшення концентрації глюкози в розчині на 20% призводить до збільшення різниці фаз та амплітуд хвилі HE_{11} на 2.5 град/см та 1.0 дБ/см, відповідно. На Рис. 3.2 представлено залежності дійсної та уявної частини комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} для розчинів глюкози у воді та розчині 0.9% NaCl.

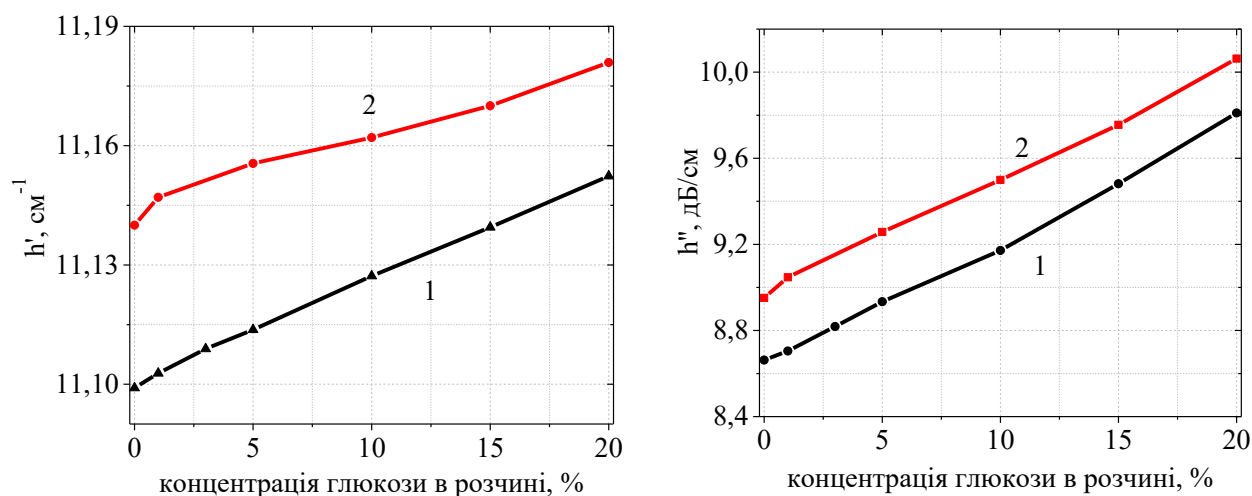


Рис. 3.2. Залежності дійсної та уявної частини комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} для водних розчинів глюкози (1) та водно-сольових розчинів глюкози (2) від концентрації глюкози в розчині

Визначено дійсну та уявну частини КДП водних розчинів глюкози та водно-сольових розчинів глюкози з концентрацією NaCl 0.9% в залежності від збільшення концентрації глюкози. На Рис. 3.3 представлені залежності дійсної та уявної частин КДП розчинів глюкози від концентрації. Водно-сольовий розчин глюкози з концентрацією солі 0.9 % NaCl обрано з метою визначення того, якою

мірою на значення КДП розчину глюкози впливає вміст солі NaCl. Тому використано два типи розчинників: дистильована вода та фізіологічний розчин з концентрацією NaCl 0.9%. Знаходження КДП досліджуваної рідини виконано за методикою, що представлена на Рис. 2.11 в розділі 2 з використанням даних КДП відповідної референсної рідини.

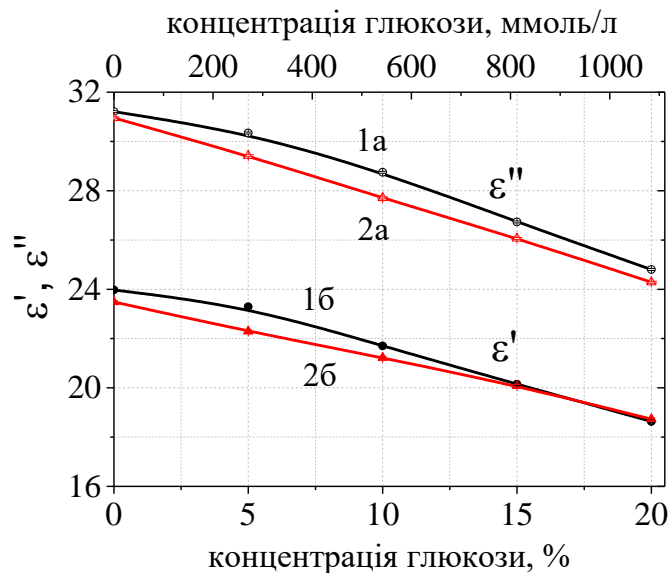


Рис. 3.3. Залежність дійсної та уявної частин КДП водних розчинів глюкози (1а, 1б) та глюкози у фізіологічному розчині (2а, 2б) з концентрацією солі NaCl 0.9% в залежності від концентрації глюкози

При збільшенні концентрації глюкози у водному та фізіологічному розчині відбувається монотонне зменшення дійсної та уявної частин КДП розчину, що відбувається через зменшення кількості вільних молекул води в досліджуваному розчині. Зі збільшенням концентрації глюкози в'язкість розчину зростає, як показано в [110], що призводить до збільшення часу релаксації. Це пов'язано з тим, що хімічна структура молекули глюкози $C_6H_{12}O_6$ має спільно пов'язані ОН- і Н-зв'язки, які протидіють орієнтації іонів після взаємодії електромагнітного випромінювання з молекулами води, що призводить до зменшення КДП розчину

[35]. Значення КДП водно-сольових розчинів глюкози менші значень КДП водних розчинів глюкози, через те, що додана сіль зменшує кількість вільних молекул води. Аналогічно в [58] показано, що з додаванням солі в досліджуваний розчин спостерігається зменшення КДП.

На Рис. 3.4 представлено залежності різниці дійсної $\Delta\varepsilon' = \varepsilon'_{\text{reff.}} - \varepsilon'_{\text{test.}}$ та уявної $\Delta\varepsilon'' = \varepsilon''_{\text{reff.}} - \varepsilon''_{\text{test.}}$ частин КДП для водно-глюкозних розчинів від концентрації глюкози в діапазоні від 0 до 20%.

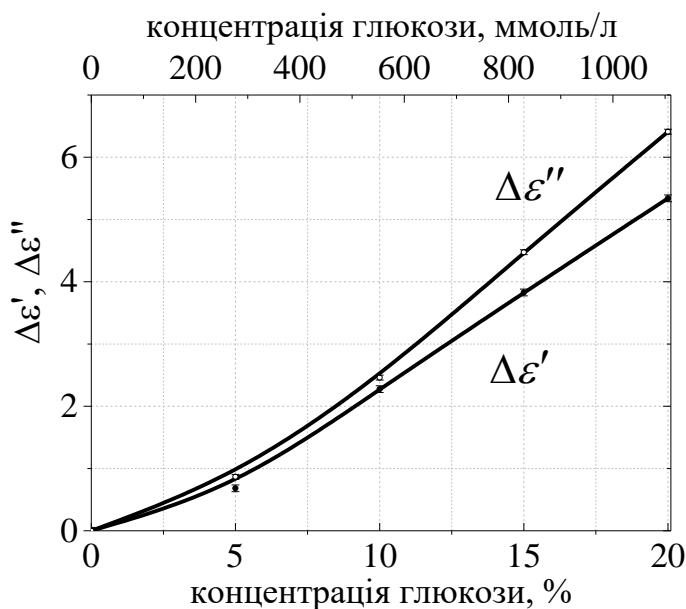


Рис. 3.4. Різниця дійсної $\Delta\varepsilon' = \varepsilon'_{\text{reff.}} - \varepsilon'_{\text{test.}}$ та уявної $\Delta\varepsilon'' = \varepsilon''_{\text{reff.}} - \varepsilon''_{\text{test.}}$ частин КДП водно-глюкозних розчинів від концентрації глюкози [19, 108]

Наявність різниць дійсної $\Delta\varepsilon'$ та уявної $\Delta\varepsilon''$ частин КДП показує здатність мікрохвильового диференційного діелектрометра фіксувати зміну концентрації глюкози у розчині. Отримані значення КДП розчинів глюкози методом диференційної мікрохвильової діелектрометрії знаходяться в межах значень КДП

аналогічних розчинів глюкози, отримані іншими методами, ці дані приведені в Таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Порівняння значень дійсної та уявної частин КДП водних розчинів глюкози, отримані методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії з іншими методами, на частоті 31.82 ГГц та кімнатній температурі

Концентрація глюкози у воді, %	ε'	ε''	Метод	
5	23.29	30.34	Хвилевідний	[92]
	23	30.34	Резонаторний	[70]
10	22.3	31	Хвилевідний	[111]
	21.7	28.75	Хвилевідний	[92]
15	20.14	26.73		
20	18.63	24.8		
	18.1	22.28	Резонаторний	[70]

Знайдено мінімальну межу виявлення глюкози за значеннями КДП водно-глюкозних розчинів. Мінімальна концентрація речовини у розчині, при якій КДП еталонної рідини відрізняється від КДП рідини, що вимірюється – є мінімальною межею виявлення $C_{\min 1} = \frac{\delta \varepsilon'_{num}}{\Delta \varepsilon' / \Delta C}$, $C_{\min 2} = \frac{\delta \varepsilon''_{num}}{\Delta \varepsilon'' / \Delta C}$, де $\delta \varepsilon'_{num.}$ та $\delta \varepsilon''_{num.}$ – чисельні похибки, які виникають при визначенні дійсної та уявної частин КДП, за допомогою рівняння (2.6) або (2.8), пов'язані із використанням високоосцилюючих циліндричних функцій Бесселя в рівняннях; ΔC – зміна концентрації; $\Delta \varepsilon'$, $\Delta \varepsilon''$ – зміна ε' та ε'' , відповідно. $C_{\min 1,2}$ – це найменший вміст виявленого компонента, при якому він може бути виявлений у досліджуваній рідині за умови $\Delta \varepsilon' > \delta \varepsilon'_{num.}$ та $\Delta \varepsilon'' > \delta \varepsilon''_{num.}$ або $\Delta \varphi > \delta \varphi_{meas.}$ та $\Delta A > \delta A_{meas.}$, де значення $\delta \varepsilon'_{num.} = \varepsilon'_{direct} - \varepsilon'_{inverse} = \pm 0.34\%$ та $\delta \varepsilon''_{num.} = \varepsilon''_{direct} - \varepsilon''_{inverse} = \pm 0.62\%$. Це похибки, пов'язані

з чисельними розрахунками дійсної та уявної частин КДП. Мінімальна межа виявлення глюкози у водному розчині, застосовуючи мікрохвильовий диференційний діелектрометр, дорівнює 2.02 мг/мл та 1.22 мг/мл, відповідно за визначенням дійсної та уявної частин КДП. В Таблиці 3.2 представлено порівняння мінімальної межі виявлення глюкози у водному розчині, отриманої мікрохвильовим диференційним методом з іншими методами.

Таблиця 3.2. Порівняння мінімальної межі виявлення глюкози у водному розчині, отриманої мікрохвильовим диференційним методом з іншими методами

Вимірювальна система	Концентрація, мг/мл	Мінімальна межа виявлення глюкози, мг/мл
Мікрохвильовий диференційний діелектрометр	0÷200	1.22 мг/мл
Мікрохвильовий біосенсор на основі резонатора [35]	0.3÷5	0.35 мг/мл
Мікрохвильовий сенсор [112]	0÷25	0.192 мг/мл

Таким чином, показана можливість використання мікрохвильового диференційного діелектрометра для визначення КДП розчинів глюкози. Дійсна та уявна частини КДП розчинів глюкози зменшуються лінійно зі збільшенням концентрації глюкози, через зменшення кількості вільних молекул води в розчині. Мінімальна межа виявлення глюкози у водному розчині становить 1.22 мг/мл.

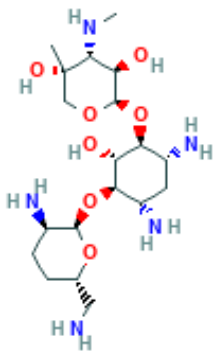
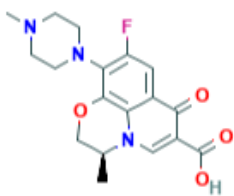

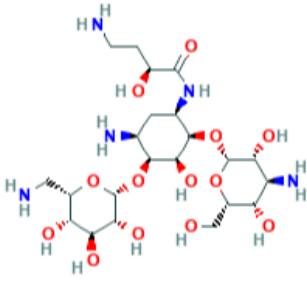
3.2 КДП водних розчинів антибіотиків

Методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії отримано значення КДП водних розчинів антибіотиків [14], таких як: лінкоміцину гідрохлорид, левофлоксацину напівгідрат, гентаміцину сульфат, амікацину сульфат. Для приготування модельних розчинів антибіотиків використовували такі

фармацевтичні сполуки: лінкоміцину гідрохлорид $C=300$ мг/мл (“Дарниця”, Київ), левофлоксацину напівгідрат $C=5$ мг/мл (“Інфузія”, Київ), гентаміцину сульфат $C=40$ мг/мл (“Артеріум”, Київ), амікацину сульфат $C=250$ мг/мл (“Лекхім”, Харків), Mg сульфат (“Дарниця”, Київ). Значення концентрації антибіотиків (приготованих шляхом розведення вихідних фармацевтичних розчинів дистильованою водою) у водних розчинах, молекулярна та структура формула досліджуваних антибіотиків представлена в Таблиці 3.3. Усі вимірювання проводили в той же день, коли готували зразки. Визначення КДП водних розчинів антибіотиків різної концентрації (Таблиця 3.3) виконано за допомогою методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії [14].

На Рис. 3.5 наведено залежності різниці фази та різниці амплітуди хвилі HE_{11} , що поширюється в кюветі діелектрометра з референсною рідиною в одній комірці, та досліджуваним водним розчином антибіотику – в іншій, для різних концентрацій антибіотику. Зсув фази хвилі та значення різниці її амплітуди зростають для більшості досліджуваних розчинів препаратів із збільшенням їх концентрації (залежності 1–4 на Рис. 3.5), за винятком гентаміцину (залежність 5 на Рис. 3.5). Подібна поведінка спостерігається для залежностей на Рис. 3.6 для дійсної h' та уявної h'' частин комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} для досліджуваних розчинів антибіотиків. Дійсна та уявна частини комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} для досліджуваних водних розчинів антибіотиків отримані відповідно до процедури, описаної в розділі 2, використовуючи такі виміряні дані, як різниця фаз $\Delta\varphi$ та різниця амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , коли одна комірка містить еталонну рідину – дистильовану воду, та інша комірка містить досліджувану рідину – водний розчин антибіотику.

Таблиця 3.3. Концентрація та структурна формула досліджуваних антибіотиків

зразок	концентрація, мг/мл	структурна формула
гентаміцину сульфат $C_{60}H_{125}N_{15}O_{25}S$	0.00235 0.0047 0.01953 0.039 0.3125 0.625 1.25 2.5 5 10	 $\cdot 1/3H_2SO_4$
левофлоксацин $C_{36}H_{42}F_2N_6O_9$	0.1825 0.3625 0.625 1.25 2.5 5	
лінкоміцин гідрохлорид $C_{18}H_{35}ClN_2O_6S$	0.9375 1.875 3.75 7.5 15	 HCl
амікацину сульфат $C_{22}H_{47}N_5O_{21}S_2$	0.2441 0.48825 0.9765 1.953 3.906 7.8125 15.625 31.25 62.5 125	 $\cdot 2H_2SO_4$

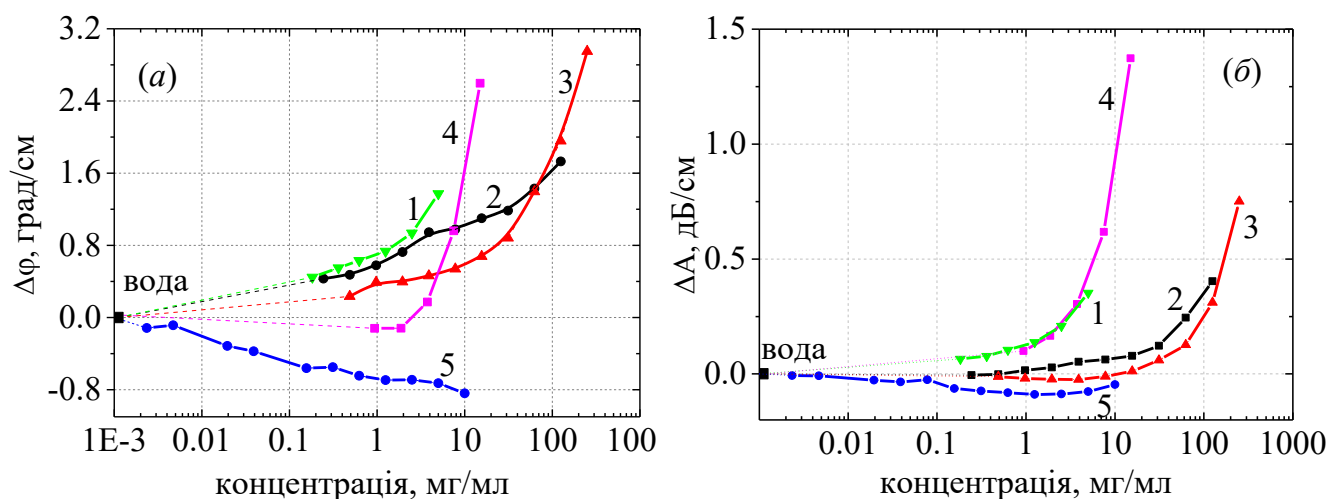


Рис. 3.5. Залежності зсуву фази $\Delta\varphi$ (а) та різниці амплітуд ΔA (б) хвилі HE_{11} від концентрації фармацевтичних препаратів у водних розчинах. Позначення кривих цифрами відповідають наступним фармацевтичним препаратам: 1 – левофлоксацину гемігідрат, 2 – амікацину сульфат, 3 – Mg сульфат, 4 – лінкоміцину гідрохлорид, 5 – гентаміцину сульфат. Чорний квадрат – значення $\Delta\varphi$ та ΔA для дистильованої води

Значення коефіцієнту фази h' та коефіцієнту загасання h'' комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} для досліджуваних розчинів зростають (Рис. 3.6) зі збільшенням концентрації фармацевтичних препаратів у водних розчинах, за винятком водного розчину гентаміцину. Це означає, що поглинання та зсув фази хвилі HE_{11} в комірці з досліджуваним розчином стає більшим зі збільшенням концентрації в порівнянні з даними для іншої комірки з дистильованою водою. Ці значення комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} використовуються для отримання значень КДП досліджуваних водних розчинів антибіотиків.

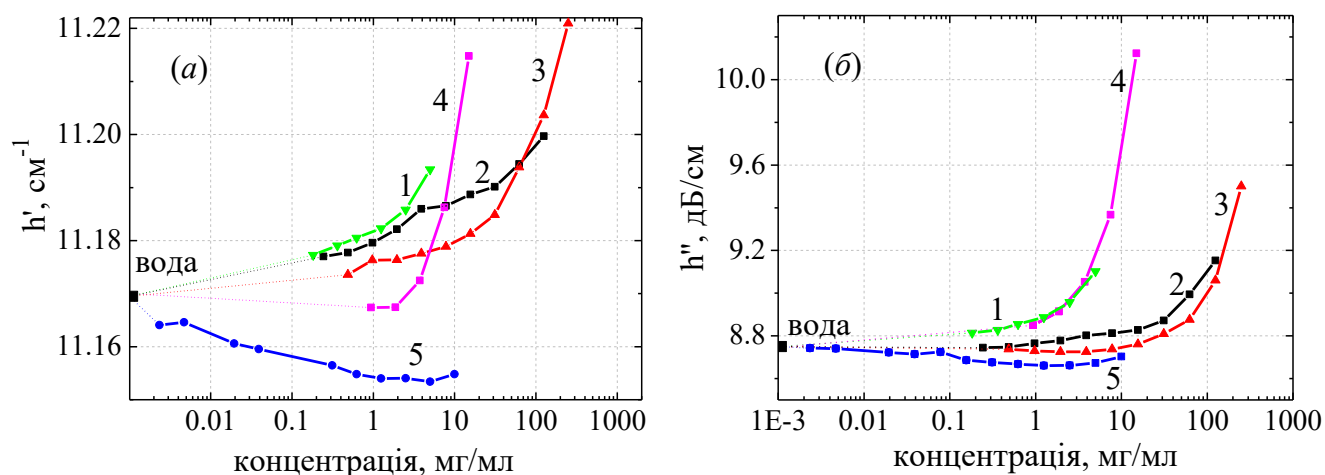


Рис. 3.6. Залежності дійсної (а) та уявної (б) частин комплексного коефіцієнту поширення хвилі HE_{11} від концентрації фармацевтичних препаратів у водних розчинах. Позначення кривих цифрами відповідають наступним фармацевтичним препаратам: 1 – левофлоксацину гемігідрат, 2 – амікацину сульфат, 3 – Mg сульфат, 4 – лінкоміцину гідрохлорид, 5 – гентаміцину сульфат. Чорний квадрат – значення h' та h'' для дистильованої води

На Рис. 3.7 наведено залежності дійсної та уявної частини КДП, а на Рис. 3.8 – модуль КДП для досліджуваних фармацевтичних розчинів. Значення дійсної та уявної частин КДП та модуль КДП зменшуються для більшості досліджуваних антибіотиків із зростанням їх концентрацій у розчинів, крім гентаміцину (Рис. 3.7 і 3.8, залежність 5).

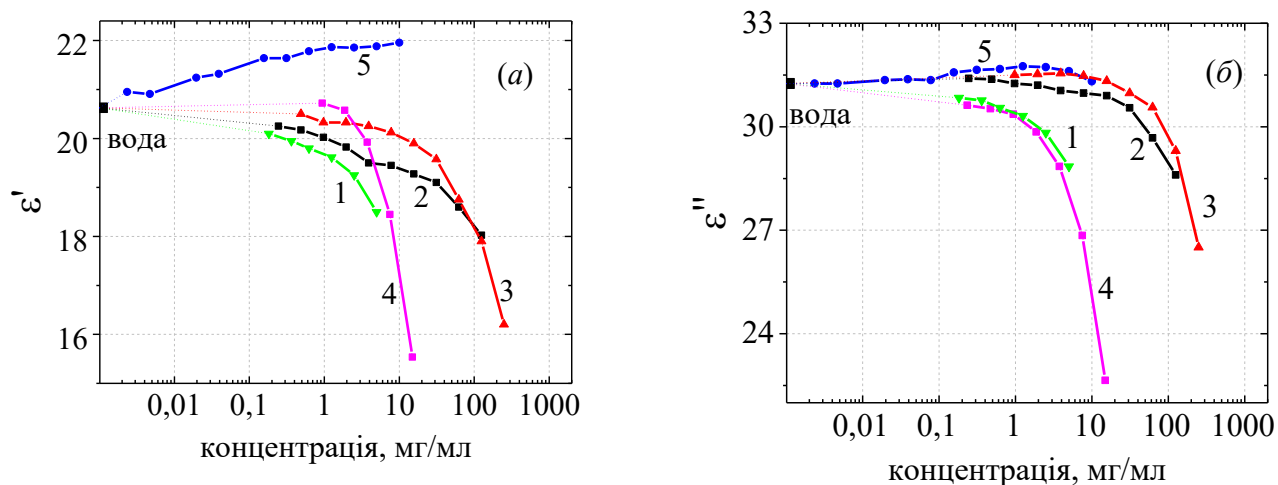


Рис. 3.7. Залежності дійсної (а) та уявної (б) частин КДП від концентрації фармацевтичних препаратів у розчинах. Позначення цифрами відповідають наступним фармацевтичним препаратам: 1 – левофлоксацину гемігідрат, 2 – амікацину сульфат, 3 – Mg сульфат, 4 – лінкоміцину гідрохлорид, 5 – гентаміцину сульфат. Чорний квадрат – значення ε' та ε'' для дистильованої води

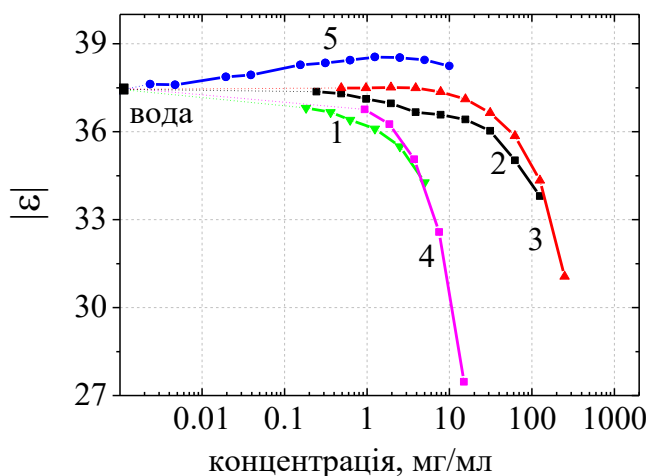


Рис. 3.8. Залежності модуля КДП від концентрації фармацевтичних препаратів у водних розчинах. Цифрами позначено фармацевтичні препарати: левофлоксацину гемігідрат (1), амікацину сульфат (1), Mg сульфат (3), лінкоміцину гідро хлорид (4), гентаміцину сульфат (5). Чорний квадрат – значення модуля КДП для дистильованої води

Мінімальна межа виявлення антибіотиків у водному розчині за показниками змін дійсної та уявної частин КДП приведена у Таблиці 3.4. Цю мінімальну межу виявлення антибіотиків у водних розчинах можна порівняти з цими показниками, які дають високо затратні методи. Наприклад, для методу іммуно-афінної хроматографії мінімальна межа виявлення кількості тетрацикліну у молоці становить 0.019 мкг/мл, для методу високоефективної рідинної хроматографії цей показник становить 0.002 мкг/мл [113].

Таблиця 3.4. Мінімальна межа виявлення антибіотиків у водному розчині за визначенням значень дійсної та уявної частин КДП

Зразок	Концентрація, мг/мл	Мінімальна межа виявлення, C_{\min} мг/мл	
		ε'	ε''
левофлорксацин	1÷5	0.13	0.14
амікацин		0.28	0.83
лінкоміцин		0.11	0.1
гентаміцин		2.6	1.12

Результати вимірювань показали високу чутливість щодо зміни концентрації досліджуваних речовин у водному розчині, чим доведено перспективність застосування діелектрометричного методу та приладу мікрохвильового диференційного діелектрометра для виявлення антибіотиків, навіть в діапазоні низьких концентрацій.

Таким чином, за результатами діелектрометричних досліджень отримано значення КДП водних розчинів фармацевтичних речовин залежно від їх концентрації в розчинах. Встановлено, що значення КДП для розчинів лінкоміцину, левофлорксацину та амікацину знижуються через зменшення кількості вільних молекул води в розчині зі збільшенням концентрації антибіотиків у водних розчинах. Для водного розчину гентаміцину сульфату спостерігалася нетипова поведінка КДП, значення модуля КДП розчину

гентаміцину збільшувались зі збільшенням концентрації антибіотика, що можливо пов'язано зі структурними особливостями молекул гентаміцину і потребує подальшого вивчення.

3.3 Порівняння результатів визначення КДП водних розчинів антибіотиків спектрофотометричним методом

Результати діелектричних вимірювань водних розчинів антибіотиків (окремо лінкоміцин, левофлоксацин, амікацин, гентаміцин) різної концентрації порівняні із результатами вимірювання спектрів поглинання цих розчинів, отримані методом UV-Vis спектрофотометрії [14]. Для вимірювань UV-Vis спектрофотометричним методом готували водні розчини тих самих антибіотиків, як для діелектрометричних вимірювань, всі розчини готувались з концентрацією антибіотиків 1 мг/мл. Для всіх водних розчинів антибіотиків отримано залежність спектрів поглинання від довжин хвиль. Метод спектрофотометрії ультрафіолетового та видимого (UV-Vis) діапазонів застосовано в якості додаткового методу досліджень коефіцієнта поглинання електромагнітних хвиль UV-Vis діапазонів водних розчинів антибіотиків. Результати спектрофотометричних досліджень отримані та надані Мартиновим А.В. (Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМНУ, Харків, Україна), використовуючи спектрофотометр Biochrom GeneQuant 1300 (США, General Electric). Метод UV-Vis спектрофотометрії є добре відомим фармакопейним методом аналізу фармацевтичних препаратів та є одним із найбільш широко використовуваних лабораторних методів у біомедичних дослідженнях [114, 115]. Основним принципом UV-Vis спектрофотометрії є визначення коефіцієнта поглинання електромагнітних хвиль ультрафіолетового та видимого діапазонів молекулами хімічних сполук, що містяться в досліджуваному розчині, спектральних нахилів тощо [116].

На Рис. 3.9 та 3.10 визначено смуги поглинання для водних розчинів лінкоміцину та левофлоксацину. На спектрі оптичної щільності для розчину лінкоміцину визначається найбільш помітний максимум смуги поглинання в області 200÷230 нм (Рис. 3.9), а для левофлоксацину – 284 нм (Рис. 3.10).

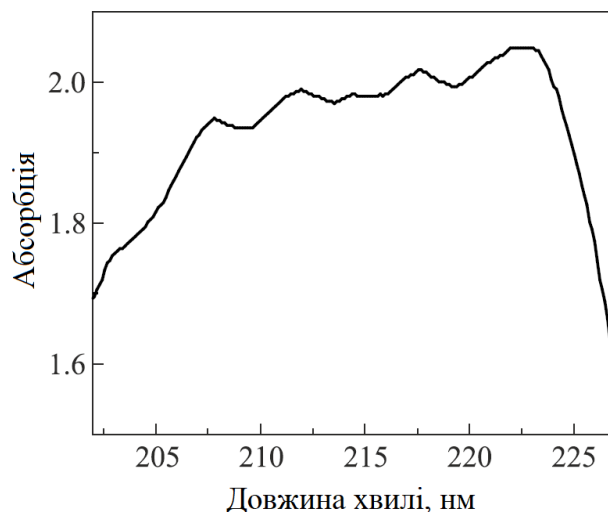


Рис. 3.9. Спектр поглинання водного розчину лінкоміцину в області 200÷230 нм, отриманий методом UV-Vis спектrophотометрії [14]

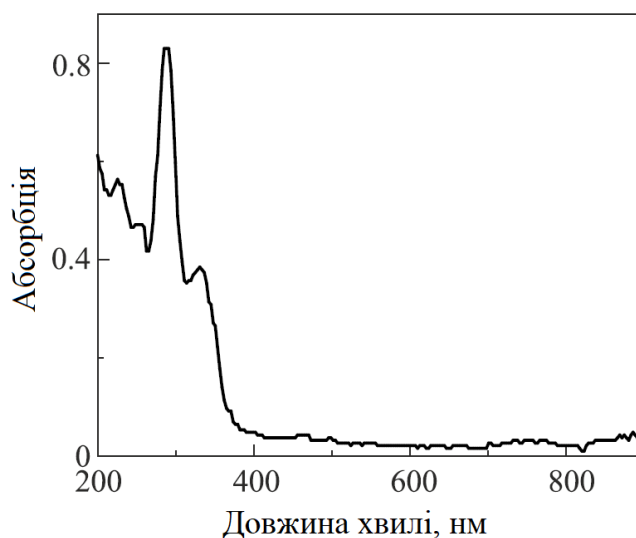


Рис. 3.10. Спектр поглинання для водного розчину левофлоксацину, отриманий методом UV-Vis спектrophотометрії [14]

На Рис. 3.11 представлено смуги поглинання для водних розчинів гентаміцину та амікацину, в спектрах яких не виявлено чітких смуг поглинання. Це може бути пов'язано з відсутністю подвійних зв'язків та/або ароматичних залишків у молекулярних структурах гентаміцину та амікацину.

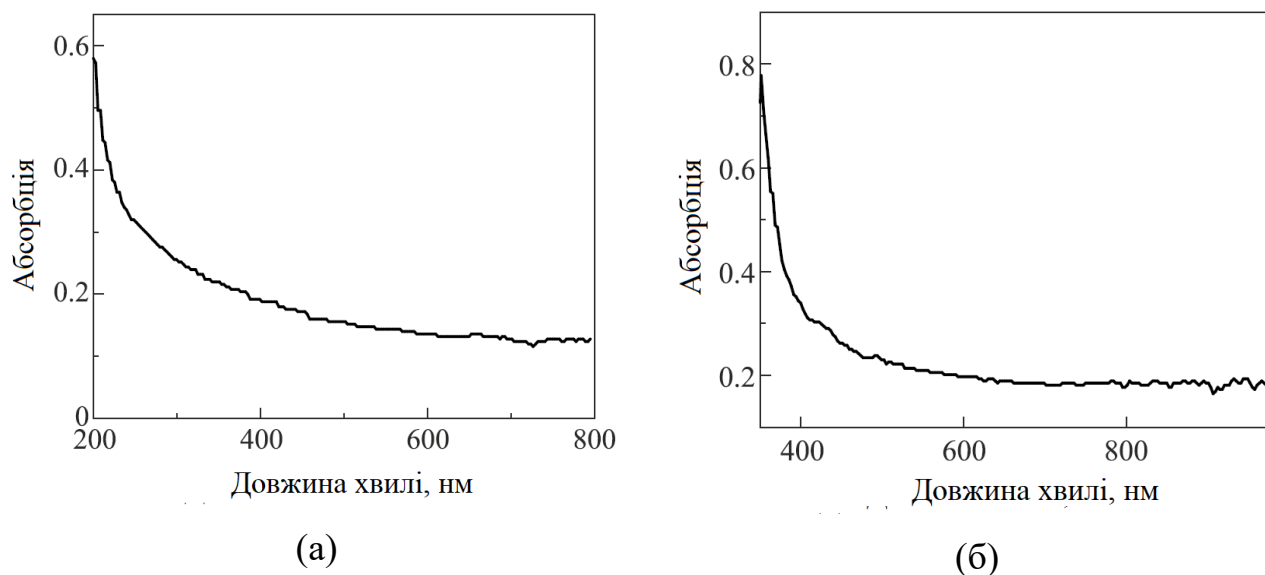


Рис. 3.11. Спектр поглинання для водних розчинів амікацину (а) та гентаміцину (б) , отриманий методом UV-Vis спектроскопії [14]

На Рис. 3.12 представлено залежності абсорбції водного розчину лінкоміцину та левофлораксацину від концентрації антибіотиків. Інтенсивності поглинання розчину лінкоміцину при 225 нм від концентрації лінкоміцину в діапазоні 0.075÷1.0 мг/мл, а також аналогічна залежність для левофлораксацину при 284 нм мають майже лінійну залежність. Ці залежності можливо застосувати для фармацевтичного аналізу при валідації вимірювань концентрації лінкоміцину та левофлораксацину у водних розчинах мікрохвильовим диференційним діелектрометричним методом згідно з принципами Державної Фармакопеї України [115]. Щоб розглянути можливість включення розробленого мікрохвильового диференційного діелектрометричного методу до переліку

фармакопейних методів, нам необхідно підтвердити результати діелектрометричних вимірювань, порівнявши їх із результатами фармакопейного методу, в нашому випадку, з методом UV-Vis спектрофотометрії. Якщо коефіцієнт кореляції між двома методами близький до одиниці, то мікрохвильовий диференційний діелектрометричний метод можна запропонувати як фармакопейний після подальших численних перевірочних вимірювань ряду лікарських засобів. Для порівняння використані дані абсорбції двох представлених методів, а саме використовуємо значення уявної частини коефіцієнта поширення хвилі HE_{11} та значення абсорбції цих водних розчинів антибіотиків, що представлені на Рис. 3.6 (б) та 3.12 для двох водних розчинів антибіотиків: лінкоміцину та левофлораксацину. Ці антибіотики вибрані для порівняння, тому що вони мають залежності близькі до лінійного виду в діапазоні довжин хвиль близько 200÷300 нм. При вимірюваннях абсорбції водних розчинів інших антибіотиків методом UV-Vis спектрофотометрії не спостерігалось жодних піків у цьому діапазоні довжин хвиль.

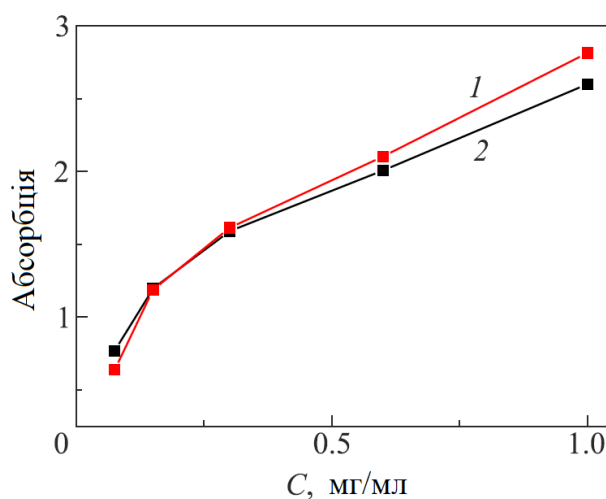


Рис. 3.12. Залежності абсорбції водного розчину лінкоміцину (1) від концентрації антибіотику на довжині хвилі 225 нм та абсорбції водного розчину левофлораксацину (2) від концентрації антибіотику на довжині хвилі 284 нм

Дані поглинання, отримані методами мікрохвильової діелектрометрії та UV-Vis спектрофотометрії, підтверджені статистично з використанням співвідношення коефіцієнта кореляції Фішера, який зазвичай використовується для оцінки кореляції даних у біомедичних дослідженнях [117]:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (h_i'' - \bar{h}'')(A_i - \bar{A})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (h_i'' - \bar{h}'')^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})^2}}, \quad (3.1)$$

де h'' – коефіцієнт загасання, отриманий методом діелектрометрії; A – данні поглинання, отримані методом UV-Vis спектрофотометрії; $(h_i'' - \bar{h}''), (A_i - \bar{A})$ – відхилення від відповідних середніх значень. Коефіцієнт кореляції для даних поглинання водних розчинів левофлоксацину дорівнює $F = 0.97$ та для водних розчинів лінкоміцину $F = 0.968$. Таким чином, одержано гарний збіг результатів вимірювань двох представлених методів на прикладі двох водних розчинів антибіотиків.

Таким чином, отримані дані мікрохвильової діелектрометрії на прикладі визначення антибіотиків левофлоксацину та лінкоміцину у водних розчинах підтверджені результатами UV-Vis спектрофотометричного методу, про що свідчать близькі до одиниці коефіцієнти кореляції Фішера для цих розчинів. Розроблений підхід та пристрій мікрохвильовий диференційний діелектрометр є перспективними для виявлення деяких біологічно активних речовин у водних розчинах, у тому числі у фармацевтиці для контролю якості фармацевтичної продукції з метою виявлення концентрації лікарських речовин в розчинах.

3.4 КДП розчинів дифтерійного анатоксину

В процесі виробництва вакцин використовують токсини з яких виробляють бактеріальні анатоксини із застосуванням густих або рідких живильних середовищ

[106]. Токсичність анатоксинів сильно ослаблюють або повністю усувають зі збереженням імунізуючої активності. Дифтерійний анатоксин – це препарат із токсину але без токсичних властивостей, який спонукає вироблення антитіл до вихідного токсину. Живильні середовища використовують під час виробництва бактеріальних анатоксинів.

Одним з можливих практичних застосувань мікрохвильового диференційного діелектрометра є контроль процесу перетворення дифтерійного токсину в нетоксичну форму – анатоксин. Проведені дослідження діелектричних характеристик на прикладі модельних розчинів рідкого живильного середовища з додаванням дифтерійного анатоксину. Зразки для цього дослідження приготовані та надані Надією Іванівною Скляр (Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМНУ, Харків, Україна). Виявлення дифтерійного анатоксину в живильному середовищі, використовуючи діелектрометр є альтернативним способом отримання інформації, що токсин перейшов у нетоксичну форму, замість використання тварин.

На Рис. 3.13 представлені залежності різниці фаз та різниці амплітуд хвилі HE_{11} та відповідно на Рис. 3.14 залежності дійсної та уявної частин КДП рідкого живильного середовища без дифтерійного анатоксину та розчинів живильного середовища з дифтерійним анатоксином. Фаза і амплітуда електромагнітної хвилі HE_{11} змінюються, що відповідає зміні реальної та уявної частин КДП, коли в одній комірці міститься живильне середовище без анатоксину та з анатоксином, в порівнянні з еталонною рідиною в іншій комірці. Спостерігаються відмінні від нуля різниці фаз $\Delta\varphi$ та різниці амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , які більші за абсолютну похибку вимірювань, $\Delta\varphi > \delta\varphi_{meas.}$ та $\Delta A > \Delta A_{meas.}$.

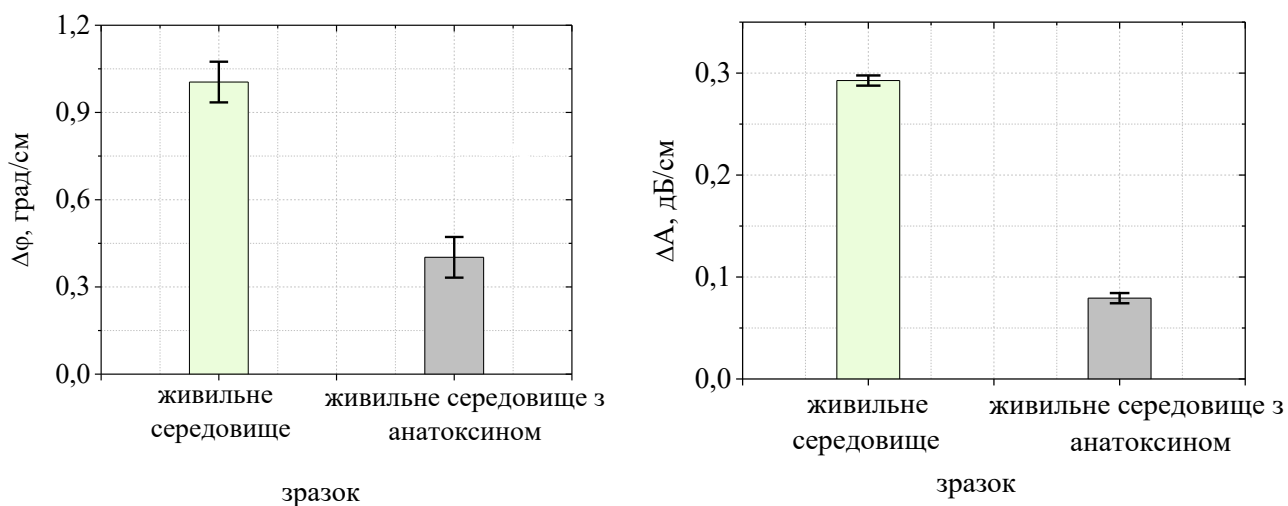


Рис. 3.13. Залежності різниці фаз $\Delta\phi$ та амплітуд ΔA рідкого живильного середовища без дифтерійного анатоксину та розчину живильного середовища, що містить дифтерійний анатоксин

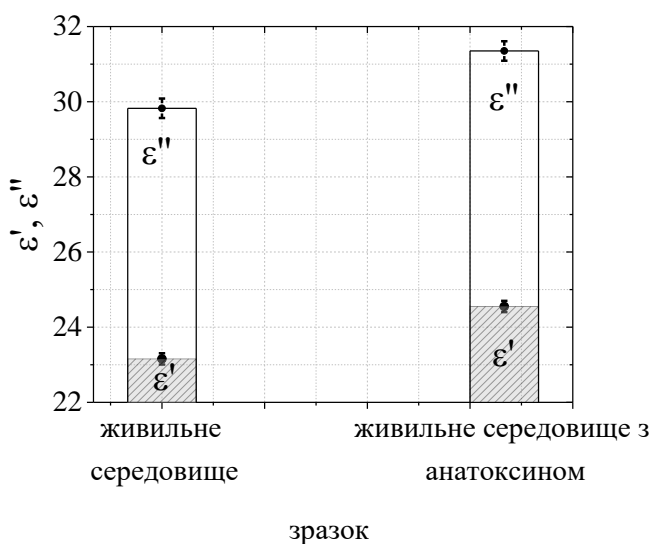


Рис. 3.14. Залежності дійсної та уявної частин КДП рідкого живильного середовища без дифтерійного анатоксину та розчину живильного середовища, що містить дифтерійний анатоксин

Таким чином, метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії дозволяє визначати наявність дифтерійного анатоксину в живильному середовищі. Отримані результати вимірювань розчинів дифтерійного анатоксину вказують на можливість застосування методу діелектрометрії в практичній медицині для розробки методів контролю фармацевтичних інгредієнтів в досліджуваному розчині.

3.5 КДП водних та сольових розчинів альбуміну з глюкозою

Методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії отримано значення КДП водних розчинів білку сироваткового альбуміну людини в діапазоні концентрацій від 0 до 50 мг/мл [15]. Для приготування розчинів білка альбуміну використовували водний розчин альбуміну з початковою концентрацією 10% («Біофарма», Україна), водний розчин глюкози з початковою концентрацією 40% («Фармак», Україна), сольовий водний розчин NaCl з концентрацією 10%. Модельні білкові розчини альбуміну різної концентрації у воді, з додаванням глюкози та солі готували розведенням розчинів вихідної концентрації. Для приготування модельних систем білок альбумін розчиняли у водно-глюкозних розчинах з концентрацією глюкози 100 мг/мл та 200 мг/мл.

Отримані експериментальні дані різниці зсувів фази $\Delta\varphi$ та амплітуди ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється крізь комірку з еталонною рідиною та комірку з досліджуваною рідиною, комплексний коефіцієнт поширення $h=h'+h''$ для досліджуваних рідин, дійсна та уявна частини КДП досліджуваних зразків альбуміну різної концентрації у воді та сольовому розчині без додавання глюкози та з глюкозою різної концентрації, представлені у Таблиці 3.5.

Таблиця 3.5. Експериментальні дані мікрохвильових діелектрометричних вимірювань альбуміну у воді, водних розчинах NaCl та водних розчинах глюкози

		Альбумін розчинено у:				Альбумін розчинено у:			
Концентрація альбуміну		10% NaCl у водному розчині	Вода	Водний розчин глюкози, мг/мл		10% NaCl у водном у розчині	Вода	Водний розчин глюкози, мг/мл	
				100	200			100	200
%	мг/мл	Δφ , град/см				ΔA , дБ/см			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.25	12.5	0.602	0.282	1.775	3.115	0.134	0.112	0.652	1.201
2.5	25	0.731	0.387	2.156	3.248	0.243	0.188	0.785	1.362
5	50	0.888	0.612	2.523	3.493	0.358	0.315	0.964	1.524
			h' , 1/cm			h'' , dB/cm			
0	0	11.141	11.125	11.147	11.179	8.796	8.605	9.1857	9.714
1.25	12.5		11.131	11.160	11.183		8.731	9.3003	9.850
2.5	25	11.142	11.132	11.165	11.186	8.891	8.807	9.43	10.01
5	50	11.143	11.136	11.171	11.188	8.992	8.934	9.5983	10.15
		ε'				ε''			
0	0	22.662	24.437	21.225	18.642	30.2375	31.475	27.375	24.89
1.25	12.5		23.612	20.15	17.6		30.525	26.825	23.71
2.5	25	22.375	23.25	19.3875	17.112	29.4875	29.95	26	22.83
5	50	22.025	22.625	18.7875	16.712	28.725	29.025	25.05	22.03
		h				ε			
0	0	14.195	14.064	14.4447	14.826	37.787	39.848	34.639	31.41
1.25	12.5		14.147	14.52767	14.903		38.591	33.550	29.53
2.5	25	14.2549	14.195	14.614	15.012	37.015	37.915	32.432	28.53
5	50	14.318	14.277	14.728	15.111	36.197	36.801	31.312	27.65

На Рис. 3.15 представлені залежності різниці зсувів фази $\Delta\varphi$ та амплітуди ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється крізь комірку з еталонною рідиною та комірку з

досліджуваною рідиною. Дані на Рис. 3.15 демонструють різницю фазового та амплітудного зсувів, найбільші зміни спостерігаються для альбуміну, розчиненого у водно-глюкозних розчинах, причому фазові та амплітудні зсуви більші при малих концентраціях глюкози до 20%, порівняно з рештою досліджуваних розчинів. У проведеному діелектрометричному дослідженні водних розчинів альбуміну досліджено вплив присутності глюкози в розчинах на зміну діелектричних параметрів досліджуваних розчинів. На наступному етапі досліджено вплив присутності солі натрію хлориду у розчині альбуміну на дійсну та уявну частини КДП досліджуваного розчину, беручи до уваги, що зазвичай усі зразки екологічних та промислових стічних вод мають розчинені залишкові солі.

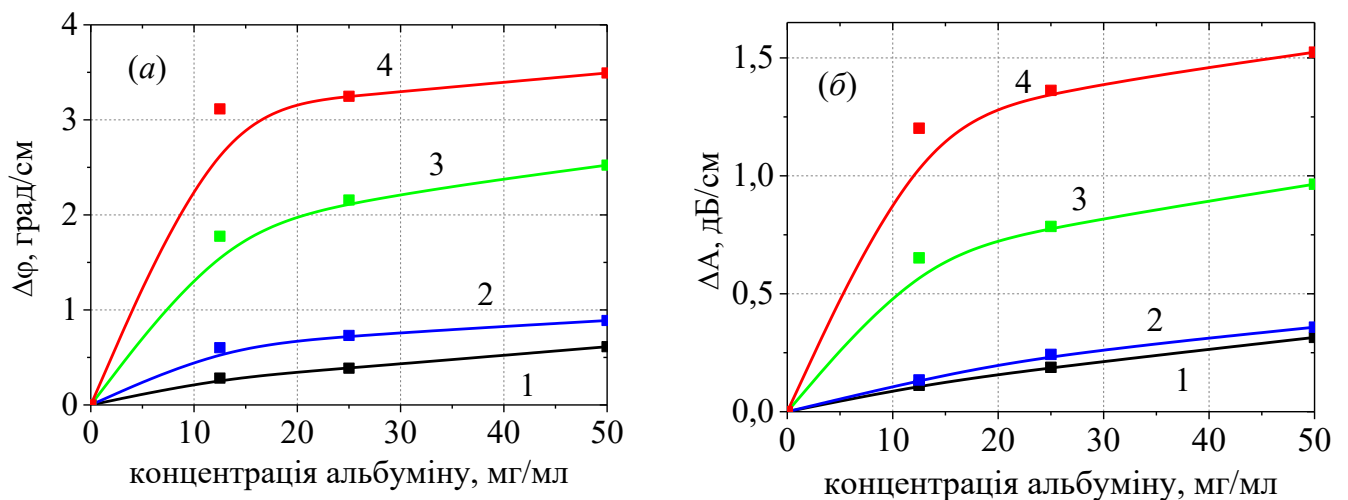


Рис. 3.15. Залежність різниці фаз (а) та амплітуд (б) хвилі HE_{11} для різної концентрації білку сироваткового альбуміну людини в розчині. Позначення залежностей цифрами відповідають наступним розчинам: водний розчин білку (1); водно-сольовий розчин білку з концентрацією солі NaCl 10% (2); водний розчин білку із глюкозою 100 мг/мл (3) та 200 мг/мл (4)

На Рис. 3.16 представлено залежності дійсної та уявної частин комплексного коефіцієнта поширення $h=h'+h''$ хвилі від концентрації альбуміну у водних та сольовому розчинах із додаванням глюкози. Дійсна та уявна частини комплексного коефіцієнта поширення хвилі всіх розчинів альбуміну зростають зі збільшенням концентрації альбуміну.

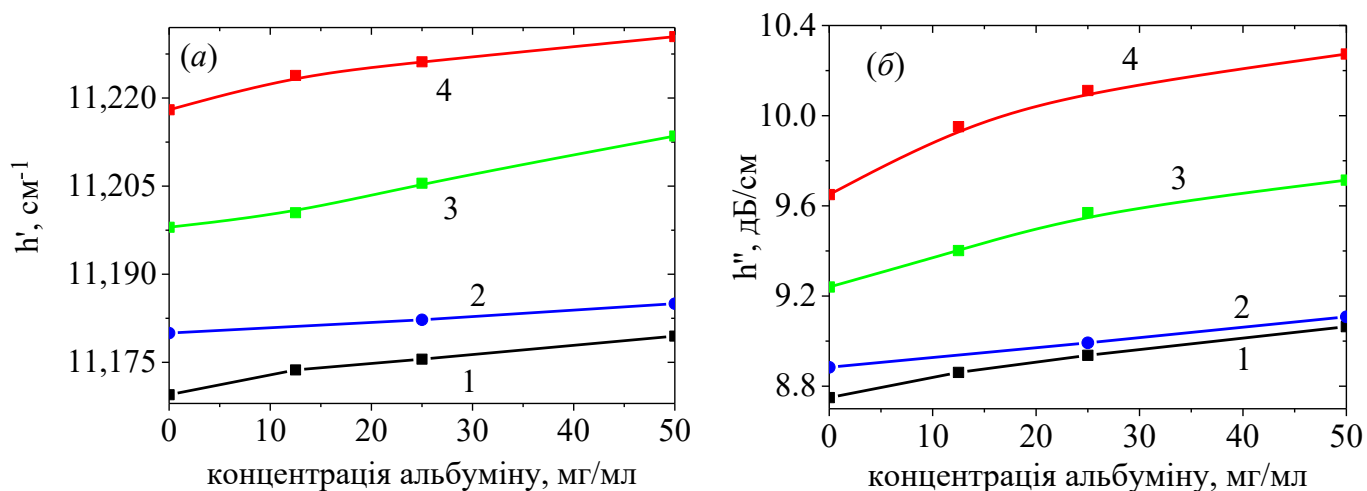


Рис. 3.16. Залежність дійсної (а) та уявної (б) частин комплексного коефіцієнта поширення хвилі від концентрації білку сироваткового альбуміну людини в розчині. Позначення залежностей цифрами відповідають наступним розчинам: водний розчин білку (1); водно-сольовий розчин білку з концентрацією солі NaCl 10% (2); водний розчин білку із глюкозою 100 мг/мл (3) та 200 мг/мл (4)

На Рис. 3.17 представлено залежності дійсної та уявної частин КДП від концентрації альбуміну у водних та сольовому розчинах із додаванням глюкози. Отримані дані показують, що дійсна та уявна частини КДП водних розчинів альбуміну зменшуються зі збільшенням концентрації білка в досліджуваних розчинах. Такі результати пов'язані зі зменшенням кількості вільних молекул води в розчині альбуміну за рахунок збільшення кількості зв'язаних молекул води з

молекулами альбуміну шляхом процесу гідратації зі збільшенням концентрації альбуміну в розчині.

Значення дійсних та уявних частин КДП для розчинів альбуміну з NaCl відрізняються від значень дійсних та уявних частин КДП водних розчинів альбуміну з такою ж концентрацією альбуміну без солі NaCl. Це свідчить про те, що наявність доданої солі NaCl в розчинах змінює діелектричні параметри розчинів за рахунок зміни кількості вільних молекул води в розчинах. Зі збільшенням концентрації альбуміну (в діапазоні низьких концентрацій 0-5%) у водно-сольових розчинах дійсні та уявні значення КДП зменшуються, що узгоджується з даними наших попередніх експериментів, а саме збільшення кількості зв'язаних молекул води (за рахунок підвищення гідратації білкових молекул з молекулами води) у розчині білка зі зростанням концентрації. Дослідження систем, що містять альбумін з такою ж концентрацією, розчинених у 10% водних розчинах NaCl, показує, що присутність NaCl сприяє зниженню значень дійсної та уявної частин КДП. Це також можна пояснити зменшенням кількості молекул вільної води (незв'язаних з білком) у водно-сольових розчинах порівняно з водними розчинами через зв'язування молекул води з іонами солі (дійсна та уявна частини КДП для 10% розчину NaCl менші значень КДП для чистої води). Різниця між дійсною $\Delta\epsilon'$ та уявною $\Delta\epsilon''$ частинами КДП для розчину альбуміну з 10% NaCl та для водного розчину альбуміну менша, у порівнянні з різницею дійсної $\Delta\epsilon'$ та уявної $\Delta\epsilon''$ частин КДП для 10% водного розчину NaCl без альбуміну з чистою водою для обох концентрацій альбуміну (2.5% і 5%). Отже, іони Na^+ та Cl^- у розчинах можуть взаємодіяти або з молекулами білка, або з водою, отже, можуть впливати на конформацію молекул альбуміну, змінюючи структуру гідратації молекул альбуміну. Важливо відзначити, що отримані експериментальні дані КДП для розчинів альбуміну від концентрації білка на частоті 31.82 ГГц мають подібну поведінку залежності значень КДП альбуміну від концентрації, представлені в [67].

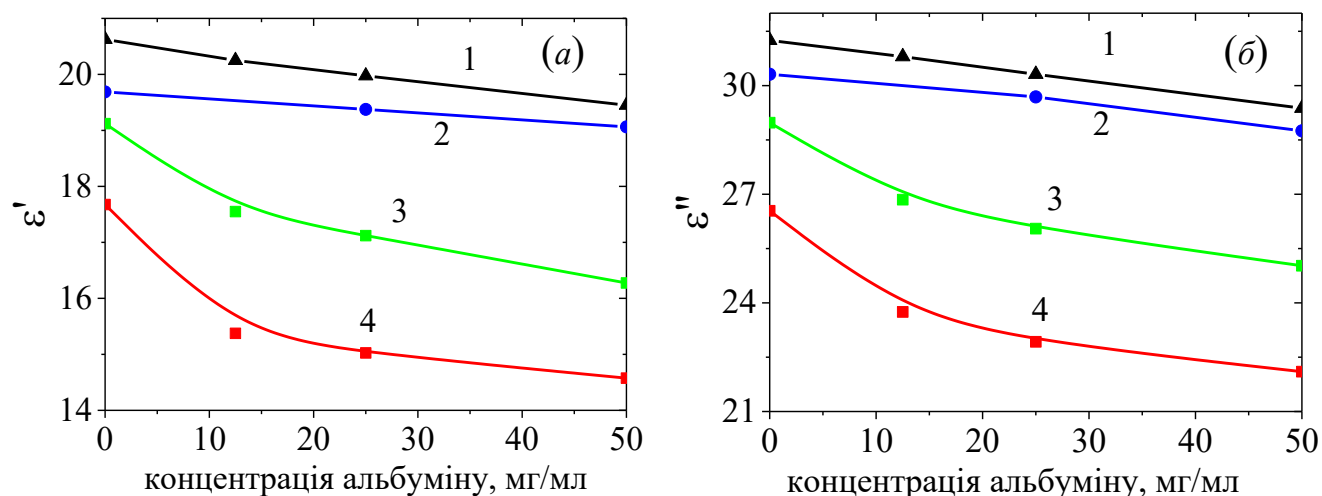


Рис. 3.17. Залежність дійсної (а) та уявної (б) частин КДП від концентрації білку сироваткового альбуміну людини в розчині. Позначення залежностей цифрами відповідають наступним розчинам: водний розчин білку (1); водно-сольовий розчин білку з концентрацією солі NaCl 10% (2); водний розчин білку із глюкозою 100 мг/мл (3) та 200 мг/мл (4).

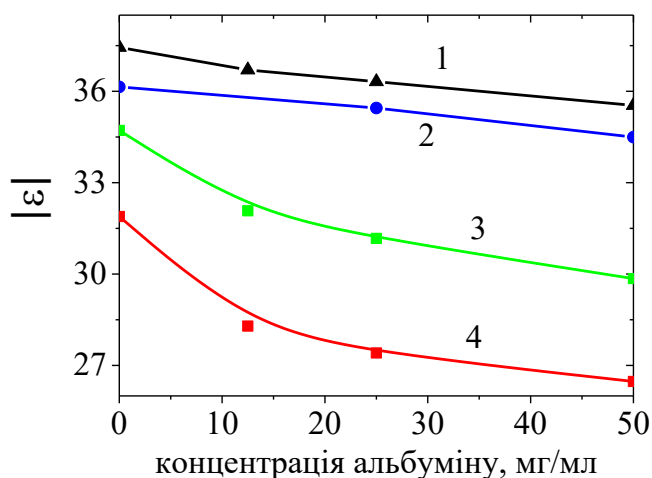


Рис. 3.18. Залежність модуля КДП від концентрації білку сироваткового альбуміну людини. Позначення залежностей цифрами відповідають наступним розчинам: водний розчин білку (1); водно-сольовий розчин білку з концентрацією солі NaCl 10% (2); водний розчин білку із глюкозою 100 мг/мл (3) та 200 мг/мл (4).

Залежності 1 і 2 (Рис. 3.17, 3.18) дійсної та уявної частин КДП та модуля КДП водних розчинів білку альбуміну зменшуються лінійно в залежності від збільшення концентрації альбуміну (0÷50 мг/мл). Залежності для розчинів із вмістом глюкози мають нелінійний характер дійсної та уявної частин КДП при малій концентрації альбуміну у водно-глюкозних розчинах (залежності 3 та 4 на Рис. 3.17, 3.18). Зменшення значень дійсної та уявної частин КДП водних розчинів альбуміну з і без NaCl добре узгоджується з даними для аналогічних водних розчинів NaCl з альбуміном, отриманими в [67].

Таким чином, методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії встановлено, що зменшення дійсної та уявної частин КДП досліджуваних водних та сольових розчинів альбуміну, водних розчинів альбуміну з глюкозою – зменшуються зі збільшенням концентрації альбуміну у розчині, що можна пояснити зменшенням кількості вільних молекул води у досліджуваних розчинах.

3.6 Порівняння результатів визначення КДП водних і сольових розчинів альбуміну з глюкозою методом молекулярно-динамічного моделювання

Результати, отримані методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії водних розчинів альбуміну, які представлені в пункті 3.4, доповнені та підтверджені даними, отриманими методом молекулярної динаміки (МД) щодо гідратації подібних модельних водних розчинів альбуміну [15]. Ці результати МД моделювання водних розчинів альбуміну різних концентрацій з NaCl і глюкозою отримані та надані Бабаком Мінофаром та Анастасією Шапошніковою (Інститут мікробіології Чеської академії наук, Прага, Чехія). МД моделювання альбуміну у водних розчинах було застосовано в нашому спільному дослідженні як додатковий метод для надання інформації про гідратацію альбуміну у водних розчинах для пояснення експериментальних результатів мікрохвильової диференційної діелектрометрії на молекулярному рівні. Метод

МД моделювання є широко використовуваним обчислювальним інструментом для опису та динаміки органічних та неорганічних водних розчинів і біомолекул. Метод МД моделювання застосовує другий закон Ньютона для опису руху частинок у класичних системах. Силowe поле використовується для обчислення повної енергії модельної системи та оцінки сил між взаємодіючими частинками. Під час процесів моделювання інтегрування рівняння руху Ньютона генерує конфігурації системи та забезпечує траєкторії, які визначають положення атомів у часі в масштабі наносекунд. Ці МД-траєкторії можна використовувати для розрахунку різноманітних властивостей, включаючи енергію, що бере участь у молекулярних взаємодіях, та інші макроскопічні величини, які можна порівняти з експериментальними показниками спостереження досліджуваної моделі систем.

Пакет GROMACS [118] використовувався для проведення МД моделювання систем за участю білка та NaCl у різних концентраціях. За допомогою аналізу водневих зв'язків молекул білка альбуміну та води в різних розчинах з присутністю NaCl та глюкози як домішок досліджено вплив гідратаційної структури та динаміки води. Структурні та динамічні властивості, отримані в результаті МД моделювання, порівнювали з експериментальними результатами, щоб пояснити процеси на молекулярному рівні. МД моделювання проводилося протягом 100 нс при сталій температурі 300 К і тиску 1 бар. Траєкторії аналізували для розрахунку кількості водневих зв'язків, а також часу життя водневих зв'язків для розчину альбуміну у воді та у водних розчинах NaCl з концентраціями 0.5, 1.0 та 1.5 М.

На Рис. 3.19 показано знімок МД моделювання альбуміну у 0.5 М водних розчинах NaCl. Для розрахунків на першому етапі використовували 0.00075 М розчин альбуміну у воді, на другому – три різні концентрації NaCl 0.5, 1 та 1.5 М.

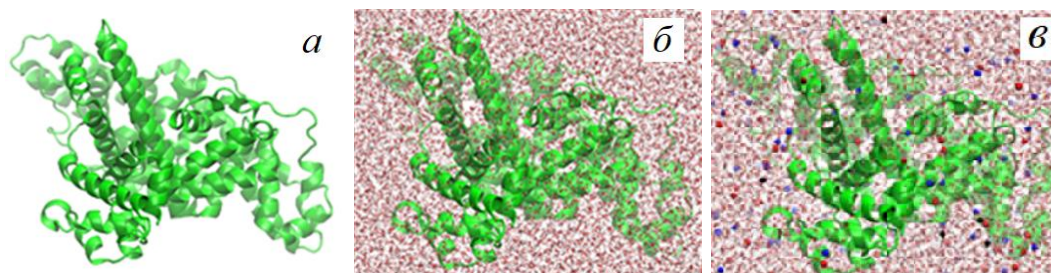


Рис. 3.19. Зображення знімків МД моделювання альбуміну – зеленим кольором (а, б, в) в розчині 0.5 М NaCl (б, в); (б): Атоми кисню води – червоним і атоми водню – білим кольором; (в): іони Na^+ – синім кольором і Cl^- – червоним кольором [119]

Дані МД моделювання дозволяють дослідити вплив концентрації альбуміну та NaCl на кількість водневих зв'язків (ВЗ) у системах і ці дані можна порівняти з експериментальними даними діелектрометрії. Зокрема, за кількістю водневих зв'язків між молекулами білка і води (зв'язаних молекул води) можна оцінити кількість вільних молекул води в розчинах. Таким чином, відсоток вільних молекул води (незв'язаних з білком) у кожній системі можна оцінити. Ці дані корисні для пояснення результатів мікрохвильового диференційного методу визначення КДП водних розчинів альбуміну у водному та сольовому розчинах NaCl в області максимальної частотної дисперсії КДП води.

На Рис. 3.20 показано залежність кількості водневих зв'язків між альбуміном (з концентрацією 0.00075 М) та молекулами води в розчинах з різною концентрацією NaCl (0.5, 1 та 1.5 М). Кількість водневих зв'язків між альбуміном і молекулами води різко зростає з додаванням NaCl у розчин, тоді як різниця числа ВЗ при зміні концентрації солі незначна. Використовуючи данні кількості ВЗ можна оцінити кількість молекул води, зв'язаних з білком та кількість вільних молекул води в досліджуваному розчині. У Таблиці 3.6 наведено значення кількості зв'язаних молекул води з альбуміном (з концентрацією білка 0.00075 М) в залежності від концентрації NaCl (0.5, 1 та 1.5 М).

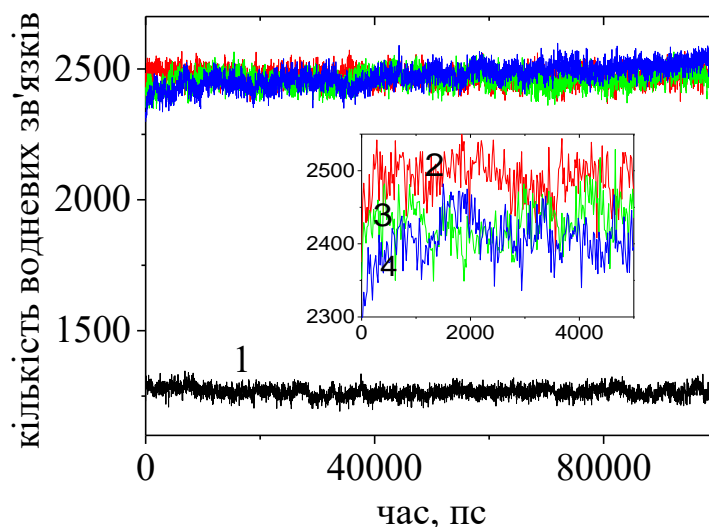


Рис. 3.20. Залежність кількості водневих зв'язків між молекулами альбуміну (0.00075M) і молекулами води у водному розчині (1) та сольовому розчині з концентрацією NaCl: 2 – 0.5 M, 3 – 1 M та 4 – 1.5 M

Подібне моделювання було виконано для водних розчинів альбуміну із додаванням солі NaCl. Дані моделювання показали, що при збільшенні концентрації альбуміну з 0.00075 M до 0.005 M відсоток зв'язаних молекул води з білком значно збільшився з 1.82 % до 10.5 % відповідно для 0.5 M розчинів солі. При подальшому збільшенні концентрації солі до 1.0 M NaCl та 1.5 M NaCl в розчинах альбуміну (0.005 M) подібної тенденції збільшення відсотка зв'язаної води з білком не спостерігалось. Це явище може бути пов'язане з агрегацією білкових молекул в розчині з концентрацією 0.005 M та з більш високими концентраціями 1 M та 1.5 M NaCl в розчині.

Аналіз даних МД моделювання дозволив зробити висновок, що зі збільшенням концентрації альбуміну в розчині – значно збільшується кількість водневих зв'язків між водою та білком, що добре узгоджується з експериментальними даними, отриманими для водних розчинів альбуміну

методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії. (див. Рис. 3.17, Рис. 3.18, залежності 1 і 2).

Таблиця 3.6. Відсоток кількості зв'язаних з білком молекул води в білковому розчині з концентрацією альбуміну 0.00075M в залежності від різної концентрації солі NaCl (0.5 M, 1 M та 1.5 M) в розчині

Концентрація NaCl (M) у водному розчині альбуміну (0.00075 M)	Відсоток молекул води, зв'язаних з молекулами альбуміну
0	1.73
0.5	1.81
1.0	1.82
1.5	1.86

Методом МД моделювання для чистої води отримано час життя водневих зв'язків, який становить 0.35 пс, а додавання 0.5 M NaCl збільшує час життя ВЗ до 0.49 пс (див. Таблицю 3.7). Додавання солі до розчину альбуміну викликає збільшення часу життя водневих зв'язків молекул води між собою. Так, додавання солі до розчинів альбуміну також призводить до більшого часу життя водневих зв'язків молекул води, зв'язаних з білком, з 49.5 пс для 0 M NaCl до 51.7 пс для розчину з концентрацією солі 0.5 M.

На наступному етапі МД моделювання проводили розрахунок час життя водневих зв'язків та відсотку вільних молекул води у водних розчинів альбуміну з додаванням глюкози, результати цього моделювання приведено в Таблиці 3.7. Показано, що відсоток вільних молекул води зменшується з 94.2% до 85.0% із збільшенням концентрації глюкози в розчині. Ці дані добре узгоджуються з експериментальними даними мікрохвильової діелектрометрії, отриманими при дослідженні водних розчинів альбуміну з різною кількістю доданої глюкози (див. Рис. 3.17, Рис. 3.18 вище, залежності 3 і 4).

Таблиця 3.7. Час життя водневих зв'язків між молекулами води та альбуміну, води та глюкози, глюкози з білком та відсоток вільних молекул води в розчинах для концентрації альбуміну 0.00075 М з різними концентраціями глюкози в розчині, де G – данні для глюкози, P – для білка, W – для води

Концентрація глюкози у водному розчині альбуміну (0.00075M), г/л	Час життя, пс (W-P)	Час життя, пс (G-W)	Час життя, пс (G-P)	Час життя, пс (W-W)	% вільних молекул води
100	95.3	23	2164	1.8	94.2
200	123.1	46	2618.8	2.5	91.9
300	137.6	58	2985.7	3.1	88.7
400	169.3	64	4412.7	3.5	85.0

Експериментальні та теоретичні дослідження інших дослідників аналогічних білкових розчинів показують, що молекули води навколо білків мають більш жорстку структуру, у порівнянні з молекулами води в об'ємі, що означає, що час життя їх водневих зв'язків та динаміка повільніша [120, 121]. Гідратаційна оболонка на поверхні білків має вирішальне значення для стабільності їх структури та функціонування, а час перебування молекул води на поверхні білків є ознакою її рухливості та зв'язування [121]. Аналогічно, за отриманими результатами МД моделювання можна зробити висновок, що динаміка перегрупування молекул води поблизу молекул білка або глюкози є повільнішою, у порівнянні з молекулами води в об'ємі. В об'ємній воді час життя водневих зв'язків становить 0.35 пс, тоді як для розчину білка з додаванням глюкози 100 г/л час життя водневих зв'язків становить 1.8 пс.

Таким чином, щоб отримати інформацію на молекулярному рівні для пояснення результатів діелектрометричного дослідження розчинів альбуміну з різними концентраціями та оцінити вплив солі та глюкози на явища гідратації альбуміну, ці результати порівняно з результатами молекулярно-динамічного

моделювання. Молекулярно-динамічне моделювання водних розчинів альбуміну показало, що збільшення концентрації альбуміну викликає збільшення кількості водневих зв'язків між молекулами води та білка, що призводить до зниження дійсних та уявних частин КДП досліджуваних розчинів. Таким чином, дані мікрохвильової діелектрометрії добре узгоджуються з даними молекулярно-динамічного моделювання для водних розчинів альбуміну з додаванням NaCl і глюкози.

3.7 Висновки до розділу 3

1. Показано, що в залежності від збільшення концентрації біологічно активних речовин в розчині, відбувається зниження КДП досліджуваних розчинів, внаслідок зменшення вільних молекул води у розчині. Значення КДП цих розчинів розрізняються в діапазоні низьких концентрацій біологічно активних речовин. Для водного розчину гентаміцину спостерігається нетипова поведінка, для якого значення КДП збільшувались зі збільшенням концентрації антибіотика, пов'язана із структурними особливостями молекули гентаміцину. Мінімальна межа виявлення біологічно активних речовин у водному розчині, отримана діелектрометричним методом порівняна з межею виявлення іншими методами, та дорівнює 1.22, 0.08, 1.73 та 0.07 мг/мл, відповідно для глюкози, левофлорсацину, амікацину та лінкоміцину. Ці показники вказують на перспективність практичного застосування методу діелектрометрії для моніторингу біологічно активних речовин в розчині та виявлення залишкової кількості антибіотиків в рідких харчових продуктах, пробах води з навколишнього середовища.

2. Результати діелектрометричних досліджень на прикладі зменшення значень КДП водних розчинів антибіотиків окремо левофлорсацину та лінкоміцину, зі збільшенням концентрації антибіотика, підтверджені даними збільшення абсорбції цих розчинів методом UV-Vis спектрофотометрії, про що свідчать близькі до одиниці розраховані коефіцієнти кореляції Фішера для цих розчинів. Таке

узгодження отриманих результатів стає передумовою включення мікрохвильового диференційного діелектрометричного методу до переліку фармакопейних методів. Це дасть можливість застосування методу діелектрометрії для фармацевтичного аналізу згідно із принципами Державної Фармакопеї України при валідації вимірювань концентрації антибіотиків у водних розчинах.

3. Методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії в режимі реального часу визначено наявність дифтерійного анатоксину у живильному середовищі за визначенням значень їх КДП. Ці результати вказують на можливість застосування методу діелектрометрії в якості альтернативного методу для контролю процесу перетворення дифтерійного токсина в нетоксичну форму – анатоксин, це дозволить уникнути використання тварин в процесі виробництва імунобіологічних лікарських засобів у ветеринарній медицині.

4. Отримано узгодження даних зменшення кількості вільних молекул води в білкових розчинах з додаванням солі та глюкози методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії за показниками зменшення значень дійсної та уявної частин КДП цих розчинів, в порівнянні із отриманими даними збільшення гідратації та часу існування водневих зв'язків між молекулами білка та молекулами води методом молекулярно-динамічного моделювання. Розроблений підхід можливо застосовувати для моніторингу та опису поведінки молекул білків у водних розчинах, включаючи промислові відходи та зразки води з навколишнього середовища.

РОЗДІЛ 4

МОНІТОРИНГ ПЕРЕБІГУ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ ГІДРОЛІЗУ БІЛКІВ МЕТОДОМ МІКРОХВИЛЬОВОЇ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Ферментативні реакції є основою багатьох сучасних біомедичних лабораторних методів діагностики, зокрема методу імуноферментного аналізу (ІФА), методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-діагностика) для виявлення збудників інфекційних захворювань (таких як герпес, гепатит, COVID-19, тощо). Впродовж ферментативного гідролізу білка відбувається зменшення концентрації субстрату (білку) та збільшення концентрації продуктів реакції (поліпептидів, амінокислот), внаслідок розщеплення білкових молекул, що спричинено дією гідролітичних ферментів, які руйнують пептидні зв'язки у білку [128]. Контроль наявності та кількості біологічно активних сполук, які беруть участь у ферментативних процесах, є найважливішою процедурою лабораторної діагностики в медицині, ветеринарії та у біотехнологічних процесах виробництва фармацевтичної та харчової продукції [128, 129, 130]. Для дослідження реакції ферментативного гідролізу білків, визначення швидкості реакції та зміни в структурі та складі білка під час гідролізу, застосовують аналітичні методи (спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія, мас-спектрометрія, електрофорез білків, амінокислотний аналіз). Ці методи застосовуються повсякденно для моніторингу ферментативних процесів в промисловості та медицині та передбачають відбор проб з реакційної зони де відбувається ферментативна реакція гідролізу білків. Далі, визначення концентрації вихідного субстрату (білку) або продукту реакції (поліпептидів, амінокислот) вимагає додаткової хімічної реакції, як правило, шляхом додавання барвника та вимірювання оптичної щільності досліджуваного зразка. Таким чином, хід реакції можна визначити лише шляхом дискретного відбору проб із реактора через певні

проміжки часу. Після цього фермент інактивується. В ці періоди «невизначеності» ферментативний процес в реакторі може або повністю припинитися, або прискоритися за рахунок появи нових продуктів, що можуть визвати бродіння, та бути активаторами або інгібіторами основного ферменту реакції. Всередині реактора є датчики температури і кислотності реакційного середовища.

Часто застосовуваним методом дослідження ферментативних реакцій гідролізу білків та визначення концентрації кінцевого продукту цих реакцій є спектрофотометричний метод [125]. Метод заснований на вимірюванні абсорбції забарвленого продукту, що утворюється під час реакції гідролізу, яка пропорційна концентрації продукту. Для визначення ступеня гідролізу спектрофотометричним методом та іншими аналітичними хімічними методами [122, 123] потребується переривання реакції гідролізу у різні моменти часу, що є основним недоліком.

Таким чином, актуальною задачею в сучасній біотехнології виробництва лікарських засобів, харчових продуктів є розробка методів безперервного моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка без відбору проб із реакційної зони та без зупинки реакції. Оскільки системи, в яких відбуваються ферментативні реакції, є водними розчинами органічних речовин, вони характеризуються сильним поглинанням в НВЧ-діапазоні, та дійсна та уявна частини КДП води швидко змінюються в залежності від частоти в цьому діапазоні частот [28]. Діелектрометричні вимірювання КДП в області дисперсії дійсної та уявної частин КДП води дозволяють отримати інформацію про перебіг біохімічних реакцій [25, 126]. Зміна співвідношення зв'язаних та вільних молекул води в ході ферментативних процесів призводить до зміни КДП цих розчинів. В результаті взаємодії біомолекул з розчинником на поверхні молекул утворюється шар зв'язаних молекул води, який характеризується часом релаксації (часом встановлення термодинамічної рівноваги) значно більшим, у порівнянні з вільними молекулами води та зменшенням рухливості приповерхневих молекул води, що призводить до зниження КДП розчину [15], [65, 95].

Розуміючи актуальність розробки безперервних методів моніторингу біологічно активних речовин та враховуючи описані в розділі 1 переваги методу мікрохвильової диференційної діелектрометрії для дослідження біологічно активних речовин у водному розчині, запропоновано новий підхід для моніторингу перебігу ферментативних реакцій у реальному часі за показниками КДП цих реакційних сумішей, властивості яких змінюються з часом реакції [25, 126]. Результати мікрохвильової диференційної діелектрометрії визначення КДП реакційних сумішей, в яких відбувається ферментативна реакція гідролізу білка підтверджені результатами методу UV-Vis спектрофотометрії [126]. Метод мікрохвильової діелектрометрії стрімко розвивається завдяки ряду переваг перед традиційними технологіями моніторингу ферментативних реакцій. На відміну від існуючих методів моніторингу ферментативних реакцій гідролізу білків, запропонований метод мікрохвильової диференційної діелектрометрії не потребує відбору проб із зони реакції, не потребує використання фарбників та дозволяє безперервно визначати діелектричні характеристики реакційної суміші з можливістю подальшого визначення концентрації субстрату.

4.1 Результати визначення КДП сумішей, в яких відбувається ферментативна реакція гідролізу білка

Запропоновано новий підхід моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка, який засновано на визначенні дійсних та уявних частин КДП реакційної суміші, може здійснюватися безперервно та не інвазивно без відбору проб із реакційної суміші. Коли необхідні властивості реакційної суміші досягнуті (а саме отримано необхідне співвідношення субстрату та продуктів гідролізу), реакцію гідролізу зупиняють. Для дослідження в динаміці перебігу ферментативної реакції гідролізу білка використовувався мікрохвильовий диференційний діелектрометр на частоті 31.82 ГГц (глава 2, Рис. 2.7), який раніше не використовувався для динамічних вимірювань [16, 19, 20, 66].

Застосовано такі модельні суміші в яких відбувається ферментативна реакція гідролізу з використанням субстрату, на прикладі білка імуноглобуліну G людини або альбуміну з додаванням гідролітичного ферменту трипсин. Трипсин є глобулярним білком середнього розміру, головною властивістю якого є участь у перетравленні білків. Трипсин виділяють з підшлункової залози великої рогатої худоби, він володіє субстратною специфічністю, що заснована на розриві пептидних зв'язків в білку тільки між карбоксильною групою аргініну або карбоксильною групою лізину та аміногрупою сусідньої амінокислоти [127].

Проведено динамічне визначення діелектричних параметрів на прикладі двох ферментативних систем, що містять білковий субстрат (імуноглобулін G людини або сироватковий альбумін людини) з додаванням трипсину, методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії. Для приготування ферментативної реакційної суміші для мікрохвильових діелектрометричних вимірювань використовували наступні концентрації розчинів білків альбуміну, імуноглобуліну G та трипсину: 1) водний розчин альбуміну 2.5% («Біофарма», Київ, Україна) з трипсином 0.1% («Біофарма», Київ, Україна); 2) водний розчин альбуміну 10% з трипсином 0.1%; 3) водний розчин імуноглобуліну G 10% («Біофарма», Київ, Україна) з трипсином 0.1%. В діелектрометричних вимірюваннях використовували протеолітичний фермент трипсин з підшлункової залози великої рогатої худоби («Merck», ЄС), з концентрацією 0.1%, який каталізує гідроліз білків до амінокислот і поліпептидів. Перебіг ферментативних реакцій спостерігали за кімнатної температури $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

На Рис. 4.1 зображено результати динамічного визначення різниць дійсної $\Delta h' = h'_t - h'_r$ та уявної $\Delta h'' = h''_t - h''_r$ частин комплексного коефіцієнта поширення хвилі HE_{11} для дистильованої води (1), водних розчинів імуноглобуліну G з концентрацією 2.5 % (2), альбуміну з концентрацією 2.5% (3) і 10 % (4), та для

водно-білкової ферментативної реакційної суміші від часу реакції гідролізу окремо білків імуноглобуліну G (5) і сироваткового альбуміну людини (6 та 7).

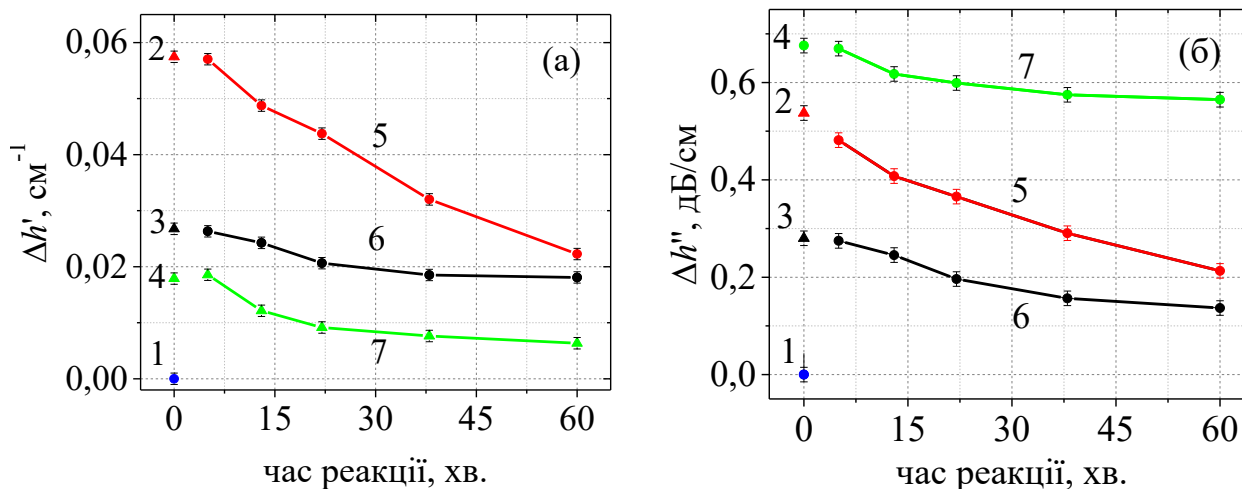


Рис. 4.1. Залежність різниць дійсної (а) та уявної (б) частин комплексного коефіцієнта поширення хвилі від часу реакції гідролізу білка імуноглобуліну G людини або сироваткового альбуміну людини. Цифрами позначено: 1 – базова нульова точка для води, 2 – значення для водного розчину імуноглобуліну G з концентрацією 2.5 %, 3 – водного розчину альбуміну 2.5 %, 4 – водного розчину альбуміну 10 %, 5 – імуноглобуліну G 2.5 % з трипсином 0.1 %, 6 – альбуміну 2.5 % з трипсином 0.1 %, 7 – альбуміну 10 % з трипсином 0.1%

Похибки, нанесені на графіках, включають середні значення похибок вимірювань на основі п'яти серій вимірювань ($\overline{\delta h'} = \pm 0.001 \text{ cm}^{-1}$ і $\overline{\delta h''} = \pm 0.015 \text{ дБ/см}$) і абсолютні похибки визначення різниці фаз та амплітуд хвилі HE_{11} . Зі збільшенням часу ферментативної реакції зменшується різниця дійсної та уявної частин комплексного коефіцієнта поширення хвилі. Таким чином, продемонстровано можливість діелектрометра фіксувати відмінності дійсної та уявної частин комплексного коефіцієнта поширення хвилі впродовж часу реакції гідролізу білка порівняно з еталонною рідиною. Значення КДП води, водних

розчинів імуноглобуліну G 2.5%, альбуміну 2.5% та 10%, водних розчинів білків та трипсину 0.1% від часу реакції представлені в Таблиці 4.1.

На Рис. 4.2 представлено залежності різниці дійсної $\Delta\varepsilon' = \varepsilon'_r - \varepsilon'_t$ та різниці уявної $\Delta\varepsilon'' = \varepsilon''_r - \varepsilon''_t$ частин КДП, коли в одній комірці міститься референсна рідина (r), та в іншій – рідина, що досліджується (t). Цифрами на Рис. 4.2 позначено значення для: дистильованої води (1), водних розчинів імуноглобуліну G з концентрацією 2.5 % (2), альбуміну з концентрацією 2.5% (3) і 10 % (4), та для водно-білкової ферментативної реакційної суміші від часу реакції гідролізу окремо білків імуноглобуліну G (5) і сироваткового альбуміну людини (6 та 7).

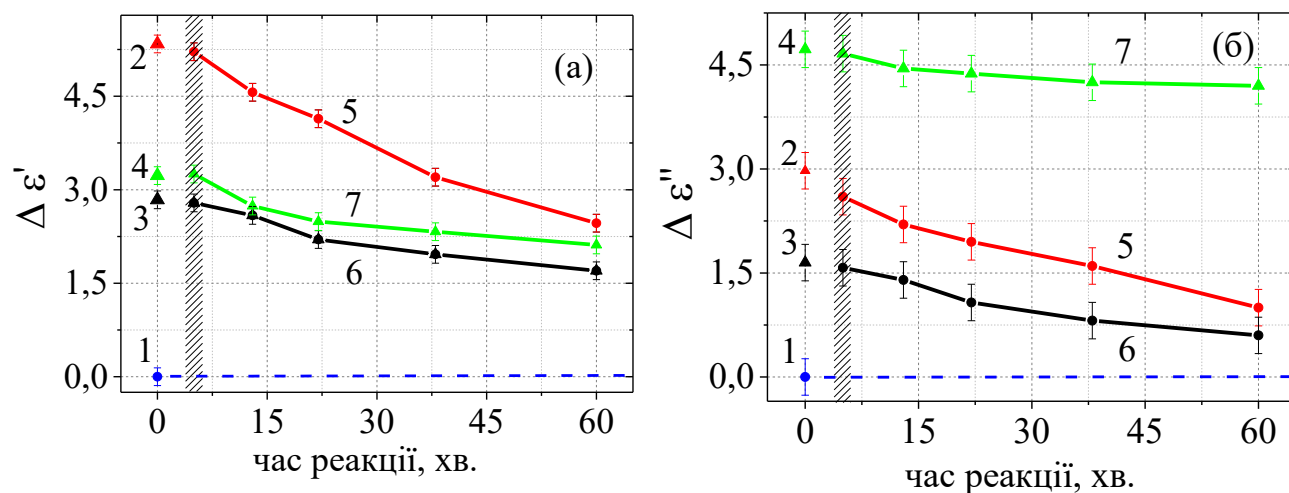


Рис. 4.2. Залежності різниць дійсної (а) та уявної (б) частин КДП від часу реакції гідролізу білка для: 1 – води, базова нульова точка, 2 – водного розчину імуноглобуліну G 2.5 %, 3 – водного розчину альбуміну 2.5 %, 4 – водний розчин альбуміну 10 %, 5 – імуноглобуліну G 2.5 % з трипсином 0.1 %, 6 – альбуміну 2.5 % з трипсином 0.1 %, 7 – альбуміну 10 % з трипсином 0.1%. Пунктирна синя лінія – різниця дійсної $\Delta\varepsilon'$ та уявної $\Delta\varepsilon''$ частин КДП для води з урахуванням нагріву рідин у комірках на 1°C впродовж часу реакції. Заштрихована область – початок ферментативної реакції гідролізу білків (додавання трипсину до водно-білкових розчинів)

Таблиця 4.1. Дійсна та уявна частини КДП води, водних розчинів білку імуноглобуліну G 2.5%, сироваткового альбуміну людини 2.5% та 10% та водних розчинів білків з трипсином 0.1% в залежності від часу реакції

Час реакції, хв.	ε'	ε''
Вода		
0	23.714	31.00
Імуноглобулін G 2.5%		
0	18.375	28.025
Імуноглобулін G 2.5% і трипсин 0.1%		
1	18.5	28.4
9	19.15	28.8
18	19.575	29.05
34	20.512	29.4
56	21.25	30
альбумін 2.5%		
0	20.875	29.35
альбумін 2.5% і трипсин 0.1%		
1	20.925	29.425
7	21.125	29.6
17	21.512	29.925
29	21.75	30.187
39	21.825	30.35
альбумін 10%		
0	20.487	26.275
альбумін 10% і трипсин 0.1%		
1	20.462	26.337
7	20.975	26.55
18	21.225	26.625
34	21.387	26.75
40	21.5	26.8

Зменшення значень різниць дійсної та уявної частин КДП реакційної суміші та наближення до значень КДП води, впродовж часу ферментативної

реакції гідролізу білка, можна пояснити збільшенням кількості вільних молекул води в досліджуваному водному розчині білка з трипсином. Це відбувається внаслідок розщеплення білкових молекул на більш дрібні пептиди, що спричинено дією трипсину. Внаслідок чого поступово знижується концентрація білку з часом реакції гідролізу, та чим нижча концентрація білка, тим більше значення КДП водно-білкового розчину наближуються до значень КДП води.

Значення КДП водних розчинів білків з трипсином впродовж моніторингу ферментативної реакції гідролізу білків мають тенденцію до збільшення зі збільшенням часу реакції та прагнуть до значень КДП води, що відбувається внаслідок збільшення кількості вільних молекул води у водному розчині білку з трипсином. Зі збільшенням концентрації альбуміну від 2.5% до 10% спостерігаємо зменшення дійсної та уявної частин КДП цих водно-білкових розчинів, ці результати добре узгоджуються зі значеннями КДП для тих самих водно-білкових розчинів, отриманими в [70, 111, 128].

Динамічні умови визначення діелектрометричних властивостей ферментативної реакції гідролізу білка. Визначення дійсної та уявної частин КДП водно-білкових розчинів в залежності від концентрації проводили в статичних умовах при кімнатній температурі, та температурні датчики в комірках визначають однакову температуру рідини в обох вимірювальних комірках. Відмінності КДП виникають внаслідок збільшення кількості вільних молекул води в реакційній суміші, пов'язані з перебігом ферментативних біохімічних реакцій.

Моніторинг перебігу ферментативної реакції гідролізу білка проводився в динамічних умовах вимірювань, в процесі чого спостерігалось підвищення температури рідин в кюветах діелектрометра не більше 1°C впродовж близько 60 хвилин ферментативної реакції. Підвищення температури рідин в двох вимірювальних комірках відбувається внаслідок мікрохвильового нагріву комірок з досліджуваною та еталонною рідиною під час динамічних умов вимірювання. Підвищення температури рідини в обох комірках з часом ферментативної реакції є

еквівалентним. Відмінність значення температури на початку реакції відрізняється від значення температури після 60 хв. спостереження за реакцією на величину Δt близько 1°C .

Потужність мікрохвильового сигналу від генератора дорівнює 100 мВт. Ця потужність розподіляється на дві комірки навпіл. Перед кожною коміркою встановлено атенюатор із загасанням на рівні 10 дБ. Таким чином, потужність мікрохвильового сигналу на вході кожної комірки дорівнює 5 мВт. Ця потужність мікрохвильового сигналу призводить до нагрівання комірок, що містять еталону та досліджувану рідини. Варто відзначити, що виявлення різниці між значеннями КДП досліджуваної рідини в одній комірці та еталонної рідини в іншій – відбувається за однакових температур, що визначається датчиками температур в обох комірках. У розрахунках КДП рідин враховано цю зміну температури в комірках діелектрометра під час динамічних умов вимірювання. Для цього застосовано скориговану методику визначення КДП досліджуваної рідини, яка полягає в наступному: 1) при поточному значенні температури вимірюємо різницю фаз $\Delta\varphi$ і амплітуд ΔA хвилі HE_{11} , що поширюється вздовж кварцових стрижнів у комірці з еталоною рідиною та комірці з досліджуваною рідиною; 2) знаючи КДП еталонної рідини, $\varepsilon_r = \varepsilon'_r + i\varepsilon''_r$, при поточному значенні температури та розв'язуючи характеристичне рівняння (2.8) знаходимо коефіцієнт фази h'_t та коефіцієнт загасання h''_t хвилі для досліджуваної рідини; 3) наступним кроком є розв'язання оберненої задачі, розв'язуючи характеристичне рівняння (2.8), для визначення КДП досліджуваної рідини $\varepsilon_t = \varepsilon'_t + i\varepsilon''_t$. Усі результати динамічних вимірювань отримані відповідно до описаної вище процедури, таким чином, враховано вплив підвищення температури на значення КДП досліджуваної рідини внаслідок мікрохвильового нагріву.

Значення КДП досліджуваних розчинів отримані з розв'язання рівняння (2.8), використовуючи комп'ютерну програму. Чисельні похибки визначення

дійсної та уявної частин КДП сильно поглинаючих рідин дорівнюють $\delta\varepsilon'_{\text{nut.}} = \pm 0.34\%$ та $\delta\varepsilon''_{\text{nut.}} = \pm 0.62\%$ відповідно, що виникають внаслідок використання високо осцилюючих функцій Бесселя які входять до рівняння (2.8). Таким чином, осцилюючий характер цих функцій може впливати на точність отриманих результатів. Чутливість визначення КДП сильно поглинаючих рідин, пов'язана з абсолютними похибками, які дорівнюють 0.5% та 3÷5%, відповідно при визначенні дійсної та уявної частин КДП водних розчинів біологічно активних речовин, які отримані за формулами:

$$\begin{aligned}\delta\varepsilon'_{\text{abs.}} &= \sqrt{\left(\frac{\Delta\varepsilon'}{\Delta\varphi}\delta\varphi_{\text{meas.}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\varepsilon'}{\Delta A}\delta A_{\text{meas.}}\right)^2}, \\ \delta\varepsilon''_{\text{abs.}} &= \sqrt{\left(\frac{\Delta\varepsilon''}{\Delta\varphi}\delta\varphi_{\text{meas.}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\varepsilon''}{\Delta A}\delta A_{\text{meas.}}\right)^2}\end{aligned}\quad (4.1)$$

Отримані значення похибок визначення дійсної та уявної частин КДП порівняні з похибками, отриманими іншими мікрохвильовими методами для водно-білкових розчинів [67, 70]. Це означає, що використовуючи діелектрометр для моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка, можливо розрізнити невеликі відмінності досліджуваного розчину від еталонної рідини, спричинені зміною концентрації білка в розчині під час перебігу ферментативної реакції, за показниками дійсної та уявної частин КДП розчину.

Таким чином, вперше продемонстровано можливість безперервного моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка у реальному часі без відбору проб, що заснований на визначенні дійсної та уявної частин КДП реакційної суміші, застосовуючи мікрохвильовий диференційний діелектрометр. Збільшення значень КДП досліджуваної реакційної суміші відповідає зміні в співвідношенні вільних та зв'язаних молекул води в розчині впродовж моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка, та спричинене поступовим зменшенням концентрації білку з часом реакції.

4.2 Результати вимірювання абсорбції ферментативних реакційних сумішей гідролізу білка спектрофотометричним методом

Для підтвердження результатів вимірювання ферментативних реакцій діелектрометричним методом оцінено кореляцію результатів диференційного мікрохвильового діелектрометричного вимірювання водного розчину білка (імуноглобуліну G або альбуміну) з трипсином з результатами, отриманими методом UV-Vis спектрофотометрії (Мартинів А.В., ДУ Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМНУ, Харків, Україна). Для досліджень UV-Vis спектрофотометричним методом приготовані наступні розчини: 1) водний розчин імуноглобуліну G людини («Біофарма», Київ, Україна) з концентрацією 0.1% та трипсином («Merck», ЄС) з концентрацією 0.001%; 2) водний розчин сироваткового альбуміну людини («Біофарма», Київ, Україна) з концентрацією білка 0.002% та трипсином («Merck», ЄС) з концентрацією 0.00002%. Методи спектрофотометрії та діелектрометрії використовуються для вимірювання різних фізичних властивостей речовин. Варто зазначити, що метод UV-Vis спектрофотометрії ефективний саме при низькій концентрації речовини в розчині, оскільки високі концентрації можуть призводити до насичення сигналу і ускладнювати точне вимірювання абсорбції. Отже, вимірюючи абсорбцію методом UV-Vis спектрофотометрії зазвичай використовують менші концентрації речовини в розчині.

На Рис. 4.3 порівняно часові залежності результатів вимірювання абсорбції для ферментативних реакційних сумішей водних розчинів імуноглобуліну G людини з трипсином та сироваткового альбуміну людини з трипсином для двох методів з використанням коефіцієнту кореляції Фішера.

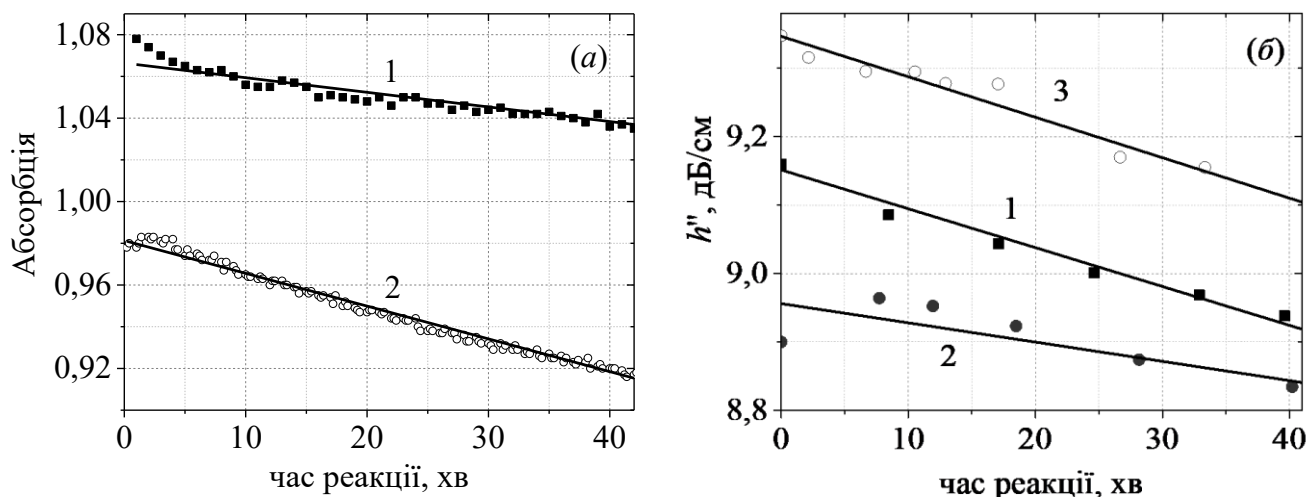


Рис. 4.3 (а): Залежність інтенсивності поглинання (абсорбції) пептидних зв'язків у білку, розчиненому у воді з трипсином від часу реакції гідролізу білка, що міститься у комірці спектрофотометра UV/Vis при довжині хвилі 210 нм для двох типів білків: 1 – імуноглобулін G з концентрацією 0.1 % і трипсину з концентрацією 0.001 %; 2 – альбумін з концентрацією 0.002 % і трипсин з концентрацією 0.00002 %; (б): Залежності уявних частин комплексного коефіцієнту поширення хвилі для досліджуваної рідини від часу реакції для водних розчинів: 1 – імуноглобуліну G 2.5 % з трипсином 0.1 %; 2 – альбуміну 2.5 % з трипсином 0.1 %; 3 – альбуміну 10 % з трипсином 0.1 %

На Рис. 4.3 (а) наведено лінійні залежності абсорбції на довжині хвилі 210 нм для білкових розчинів від часу реакції. За цією залежністю можна спостерігати за перебігом ферментативної реакції, визначаючи кількість білка імуноглобуліну G людини або сироваткового альбуміну людини. Зменшення значень абсорбції від часу для розчинів білка з трипсином пов'язана зі зміною концентрації білку в розчині від часу реакції внаслідок дії трипсину, що добре узгоджується з отриманими результатами інших авторів в [125, 129]. Подібний результат отримуємо для залежності уявної частини h'' комплексного коефіцієнта

поширення HE_{11} хвилі для водно-білкового розчину з ферментом трипсин від часу ферментативної реакції, що представлено на Рис. 4.3 (б). Зменшення коефіцієнту загасання HE_{11} хвилі в комірках діелектрометра для водно-білкового розчину з трипсином в залежності від часу реакції (Рис. 4.3, а) корелює зі зменшенням числа пептидних зв'язків -CO-NH-, внаслідок процесу гідролізу білка (імуноглобуліну G або альбуміну) трипсином (Рис. 4.3, б).

Розраховано коефіцієнт кореляції Фішера з рівняння 3.1, використовуючи отримані значення уявної частини h'' коефіцієнта поширення хвилі (загасання HE_{11} хвилі) на довжині хвилі 9.4 мм (метод диференціальної мікрохвильової діелектрометрії) та значення інтенсивності поглинання (абсорбції) пептидних зв'язків у білку, розчиненому у воді з трипсином на довжині хвилі 210 нм (метод UV-Vis спектрофотометрії) від часу реакції гідролізу білка. Значення поглинання за допомогою двох експериментальних методів корелюють, якщо співвідношення концентрацій розчинених речовин «білок:фермент» становить 1:100 (тобто 1 мг/мл трипсину та 100 мг/мл білка). Коефіцієнти кореляції Фішера для водних розчинів білку (імуноглобуліну G або альбуміну) з трипсином зі значеннями концентрацій представлені в Таблиці 4.2 та Таблиці 4.3.

Таблиця 4.2. Коефіцієнт кореляції Фішера для водних розчинів імуноглобуліну G з трипсином, представлені на Рис. 4.3. Тип вимірювальної системи: мікрохвильовий диференційний діелектрометр (1), UV-Vis спектрофотометричний метод (2)

Тип вимірювання	Концентрація імуноглобуліну G, %	Концентрація трипсину, %	Співвідношення розчинених речовин (трипсин:білок)	F
1	2.5	0.1	1:25	0.87
2	0.1	0.001	1:100	

Таблиця 4.3. Коефіцієнт кореляції Фішера для водних розчинів альбуміну з трипсином, представлені на Рис. 4.3. Тип вимірювальної системи: мікрохвильовий диференційний діелектрометр (1), UV-Vis спектрофотометричний метод (2)

Тип вимірювання	Концентрація альбуміну, %	Концентрація трипсину, %	Співвідношення розчинених речовин (трипсин:білок)	F
1	10	0.1	1:100	0.93
2	0.002	0.00002		
1	2.5	0.1	1:25	0.64
2	0.002	0.00002	1:100	

Виявлена хороша кореляція для часової залежності абсорбції для досліджуваного розчину двома використаними методами, для яких коефіцієнт кореляції Фішера дорівнює 0.93 для водного розчину альбуміну з трипсином з концентрацією альбуміну 0.002 % та концентрацією трипсину 0.00002 % та розчинів з концентрацією альбуміну 10 % та концентрацією трипсину 0.1 % (Рис. 4.1 а, б, залежності під номером 2). Порівнюючи значення абсорбції для розчину із співвідношенням концентрації 1:100 для трипсину та білку, отримуємо коефіцієнт кореляції Фішера, близький до одиниці.

Тоді у випадку, коли співвідношення концентрацій відрізняється від 1:100, коефіцієнт кореляції Фішера дорівнює 0.647. Таким чином, якщо взяти однакове співвідношення концентрацій 1:100 розчинених речовин (до початку реакції) для порівняння двох методів, отримуємо коефіцієнт кореляції Фішера, близький до одиниці, можливо сказати, що метод мікрохвильової діелектрометрії підтверджено відомим фармакопейним методом UV-Vis спектрофотометрії.

Коефіцієнт кореляції Фішера отримав значення, близькі до одиниці, що є доказом доброї кореляції. Це підтверджує можливість використання діелектрометра для динамічного моніторингу ферментативного гідролізу білка. Незважаючи на те, що для дослідження були взяті різні концентрації

ферментативного субстрату (наприклад, імуноглобулін G або альбумін), але співвідношення розчинених речовин «білок:фермент» має бути незмінним (у нашому випадку це 1:100), щоб мати можливість порівняти та перевірити розглянуті методи.

Таким чином, зі збільшенням часу реакції в процесі розщеплення складних білкових молекул на більш дрібні пептиди трипсином відбувається збільшення кількості вільних молекул води в розчині, що призводить до збільшення значень дійсної та уявної частин КДП. Ці результати знайшли підтвердження в процесі порівняння з результатами, отриманими UV-Vis спектрофотометричним методом, про що свідчить коефіцієнт кореляції Фішера близький до одиниці.

4.3 Висновки до розділу 4

1. Представлено новий підхід застосування мікрохвильового диференційного діелектрометра та безперервну методику моніторингу перебігу ферментативної реакції гідролізу білка, що засновано на визначенні дійсної та уявної частин КДП ферментативних систем, що містять білковий субстрат (імуноглобулін G або сироватковий альбумін людини) та фермент трипсин в режимі реального часу на основі вимірювальної комірки діелектрометра. За допомогою мікрохвильового диференційного діелектрометра вперше отримані та узагальнені дані про зміну діелектричних параметрів складних динамічних реакційних систем, в яких відбувається ферментативний процес гідролізу білків без руйнування ферменту і зупинки процесу гідролізу. Встановлено, що після додавання трипсину до водно-білкового розчину спостерігається поступове зниження концентрації білку, внаслідок розщеплення молекул білку на більш дрібні пептиди під дією трипсину. Значення КДП реакційної суміші з часом реакції збільшуються та наближуються до значень КДП води, що відбувається внаслідок збільшення кількості вільних молекул води в досліджуваному розчині.

2. Результати моніторингу ферментативної реакції гідролізу білків у реальному часі, отримані методом мікрохвильової диференційної діелектрометрії, підтверджені результатами UV-Vis спектрофотометричних досліджень. Показано, що зменшення коефіцієнту загасання хвилі HE_{11} у вимірювальній комірці із сумішшю, в якій відбувається ферментативний гідроліз білка в залежності від часу реакції, корелює зі зменшенням кількості пептидних зв'язків в білку внаслідок процесу гідролізу білка з трипсином. Ці дані отримали добру кореляцію, про що свідчать близькі до одиниці розраховані коефіцієнти кореляції Фішера. Таким чином, запропонована методика з новим застосуванням мікрохвильового диференційного діелектрометра, з можливістю проточних вимірювальних комірок, є перспективними для моніторингу реакції гідролізу білка у реальному часі в промислових масштабах.

ВИСНОВКИ

Представлені в дисертаційній роботі висновки засновано на результатах експериментального і чисельного аналізу поширення електромагнітних хвиль у хвилевідних структурах, які включають сильно поглинаючу рідину. Розглянуто практичне застосування досліджуваних структур для визначення комплексної діелектричної проникності різноманітних розчинів біологічно активних речовин.

1. Класифіковано типи хвиль, що поширюються у круглому металевому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем оточеним шаром сильно поглинаючої рідини відповідно до типів хвиль, що поширюються у металевому хвилеводі, заповненому кварцом. Отримано добре узгодження чисельно отриманих даних з експериментальними даними для HE_{11} типу хвилі. Встановлено, що наявність сильно поглинаючої рідини у круглому двошаровому хвилеводі з центральним кварцовим стрижнем призводить до відсутності частот відсікання мод, на відміну від однорідно-заповнених хвилеводів, яким властиві частоти відсікання мод.

2. Набуло подальшого розвитку конструкція кювети мікрохвильового диференційного діелектрометра з підвищеною чутливістю визначення КДП сильно поглинаючих рідин без використання референсної рідини, яка складається з двох комірок різної довжини, внаслідок чого компенсовано вплив дифракційних ефектів на краях комірок, а центральний діелектричний стрижень та тонкий шар досліджуваної рідини співвісні.

3. Показано, що в залежності від збільшення концентрації біологічно активних речовин (антибіотики, глюкоза, сироватковий альбумін людини, імуноглобулін G людини, водні та сольові розчини альбуміну з глюкозою, дифтерійний анатоксин) у розчині, відбувається зменшення значень КДП цих розчинів, внаслідок зменшення кількості вільних молекул води у розчині. Значення КДП цих розчинів розрізняються для різних біологічно активних речовин у розчинах в діапазоні низьких концентрацій. Отримано узгодження даних зменшення кількості вільних

молекул води у водних та сольових розчинах альбуміну з глюкозою методом молекулярно-динамічного моделювання згідно збільшення гідратації та часу існування водневих зв'язків між молекулами води з молекулами білка та глюкози. Мінімальна межа виявлення біологічно активних речовин у водному розчині, отримана діелектрометричним методом порівняна з межею виявлення іншими методами, та дорівнює 1.22, 0.13, 0.28 та 0.1 мг/мл, відповідно для глюкози, левофлоксацину, амікацину та лінкоміцину.

4. Представлено новий підхід застосування мікрохвильового диференційного діелектрометра та безперервну методику моніторингу ферментативної реакції гідролізу білка, що засновано на визначенні дійсної та уявної частин КДП ферментативних реакційних сумішей, що містять білковий субстрат (сироватковий альбумін людини або імуноглобулін G людини) та фермент трипсин. Показано, що значення КДП реакційної суміші з часом реакції гідролізу білка збільшуються та наближуються до значень КДП води, через поступове зниження концентрації білку, внаслідок чого кількість вільних молекул води в розчині збільшується.

5. Встановлено, що зменшення коефіцієнту загасання хвилі HE_{11} у вимірювальній комірці мікрохвильового диференційного діелектрометра із сумішшю, в якій відбувається ферментативна реакція гідролізу білка, корелює зі зменшенням кількості пептидних зв'язків у білку внаслідок процесу гідролізу білка з трипсином за даними визначення абсорбції, отриманих методом UV-Vis спектrophотометрії, в залежності від часу реакції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wang Y. Measurement of complex permittivity of liquids using waveguide techniques / Y. Wang, M. N. Afsar // Progress In Electromagnetics Research. – 2003. – Vol. 42. – P. 131–142.
2. Krupka J. Frequency domain complex permittivity measurements at microwave frequencies / J. Krupka // Measurement Science and Technology. – 2006. – Vol. 17, No. 6. – P. R55–R70.
3. Abduljabar A. A. Novel microwave microfluidic sensor using a microstrip splitting resonator / A. A. Abduljabar, D. J. Rowe, A. Porch, D. A. Barrow // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 2014. – Vol. 62, No. 3. – P. 679–688.
4. Grenier K. Recent advances in microwave-based dielectric spectroscopy at the cellular level for cancer investigations / K. Grenier, D. Dubuc, T. Chen, [et al.] // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 2013. – Vol. 61, No. 5. – P. 2023–2030.
5. Ellison W. J. Permittivity of pure water, at standard atmospheric pressure, over the frequency range 0-25thz and the temperature range 0-100°C / W. J. Ellison // Journal of Physical and Chemical Reference Data. – 2007. – Vol. 36, No. 1. – P. 1–18.
6. Juan C. G. Microwave planar resonant solutions for glucose concentration sensing: a systematic review / C. G. Juan, B. Potelon, C. Quendo, E. Bronchalo // Applied Sciences. – 2021. – Vol. 11, No. 15. – P. 7018.
7. Joshi K. H. Online monitoring of milk quality using electromagnetic wave sensors / K. H. Joshi, A. Mason, A. Shaw, [et al.]. – Int. Conf. on Sensing Technology (ICST), Auckland, New Zealand, 2015, – PP. 700–705.
8. Mason A. Microwave sensors for real-time nutrients detection in water / A. Mason, O. Korostynska, A. I. Al-Shamma'a // Smart Sensors for Real-Time Water Quality Monitoring / S. C. Mukhopadhyay, A. Mason. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 197–216.

9. Carballo M. Occurrence of tetracycline residues and antimicrobial resistance in gram negative bacteria isolates from cattle farms in Spain / M. Carballo, F. Esperón, C. Sacristán, [et al.] // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 4, No. 2. – P. 295–303.
10. Shumilova O. Impact of the Russia–Ukraine armed conflict on water resources and water infrastructure / O. Shumilova, K. Tockner, A. Sukhodolov, [et al.] // *Nature Sustainability*. – 2023. – Vol. 6, No. 5. – P. 578–586.
11. Zhang K. Microwave sensing of water quality / K. Zhang, R. K. Amineh, Z. Dong, D. Nadler // *IEEE Access*. – 2019. – Vol. 7. – P. 69481–69493.
12. Grenier K. Detection of a macromolecule denaturation with microwave dielectric spectroscopy based on hydration modifications / K. Grenier, G. Pratviel, H. Mazur, D. Dubuc. // 2020 IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference (IMBioC): int. conf., Dec. 2020: conf.proc. – Toulouse, France, 2020. – PP. 1–4.
13. Duan R. Real-time monitoring of the enzymatic reaction of urease by using whispering gallery mode lasing / R. Duan, Y. Li, H. Li, J. Yang // *Optics Express*. – 2019. – Vol. 27, No. 24. – P. 35427.
14. Eremenko Z. E. Development of experimental techniques for antibiotics detection in aqueous solutions: real-time microwave dielectrometry and UV-Vis spectrophotometry study / Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, K. S. Kuznetsova, A. V. Martunov // *Low Temperature Physics*. – 2021. – Vol. 47, No. 12. – P. 1041–1049.
15. Eremenko Z. E. Combined microwave dielectrometry and molecular dynamic study of aqueous solutions of human serum albumin with additives / Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, K. S. Kuznetsova, [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2022. – Vol. 364. – P. 119981.
16. Skresanov V. N. Circular layered waveguide use for wideband complex permittivity measurement of lossy liquids / V. N. Skresanov, Z. E. Eremenko, E. S. Kuznetsova, [et al.] // *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. – 2014. – Vol. 63, No. 3. – P. 694–701.

17. Диференційна кювета для виміру комплексної діелектричної проникності рідини: пат. 109485 Україна. заявл. 10.12.2013; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16. 12 с.
18. Kuznetsova K. S. Influence of high loss liquid on the bandwidth of a circular two-layer waveguide at microwaves / K. S. Kuznetsova, Z. E. Eremenko // *Journal of Electromagnetic Waves and Applications*. – 2018. – Vol. 32, No. 14. – P. 1834–1846.
19. Eremenko Z. E. Measuring complex permittivity of high-loss liquids / Z. E. Eremenko, K. S. Kuznetsova, N. I. Sklyar, A. V. Martynov / Ed. by P. K. Choudhury// *Dielectric Materials and Applications*. – 2019. – Chapter 2. – PP. 41–75.
20. Eremenko Z. Microwave dielectrometer application to antibiotic concentration control in water solution / Z. Eremenko, V. Pashynska, K. Kuznetsova, [et al.] // *RADIOFIZIKA I ELEKTRONIKA*. – 2021. – Vol. 26, No. 3. – P. 30–37.
21. Eremenko Z. E. The absence of fixed cut-off frequencies in a circular layered waveguide with lossy liquid / Z. E. Eremenko, E. S. Kuznetsova // 9th International Kharkiv Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submilli-meter Waves (MSMW): int. conf., June 20 – 24, 2016: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2016, – PP. 1 – 3.
22. Eremenko Z. E. High loss liquid in layered waveguide at microwaves and applications / Z. E. Eremenko, E. S. Kuznetsova, A. I. Shubnyi, A. V. Martunov // *IEEE 17th International Conference on Mathematical Methods in Electromagnetic Theory (MMET): int. conf., July 02 – 05, 2018: conf. proc.* – Kyiv, Ukraine, 2018, – PP. 246 – 249.
23. Eremenko Z. E. Determination method of water-glucose solution concentration at microwaves / Z. E. Eremenko, E. S. Kuznetsova, A. I. Shubnyi, [et al.] // *2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO): int. conf., April 18-20, 2017: conf. proc.* – Kyiv, Ukraine, – PP. 259 – 262.
24. Eremenko Z. E. Differential waveguide cuvette for complex permittivity measurement of high loss liquids at microwaves / Z. E. Eremenko, V. M. Skresanov, E.

S. Kuznetsova, [et al.]. // 2017 47th European Microwave Conference (EuMC): int. conf., October 10-12, 2017: conf. proc. – Nuremberg, Germany, 2017. – PP. 707-710.

25. Kuznetsova K. Monitoring of the proteins hydrolysis reaction using the microwave dielectrometry method / K. Kuznetsova, V. Pashynska, Z. Eremenko // 2022 IEEE 2nd Ukrainian Microwave Week (UkrMW): int. conf., November 14-18, 2022: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2022. – PP. 142-146.

26. Foster K. R. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review / K. R. Foster, H. P. Schwan // Critical Reviews in Biomedical Engineering. – 1989. – Vol. 17, No. 1. – P. 25–104.

27. Grant E. H. The dielectric method of investigating bound water in biological material: an appraisal of the technique / E. H. Grant // Bioelectromagnetics. – 1982. – Vol. 3, No. 1. – P. 17–24.

28. Ellison W. J. Water: a dielectric reference / W. J. Ellison, K. Lamkaouchi, J.-M. Moreau // Journal of Molecular Liquids. – 1996. – Vol. 68, No. 2–3. – P. 171–279.

29. Buchner R. The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C / R. Buchner, J. Barthel, J. Stauber // Chemical Physics Letters. – 1999. – Vol. 306, No. 1–2. – P. 57–63.

30. Debye P. J. W. Polar molecules / P. J. W. Debye. – New York : The Chemical Catalog Company, Inc., 1929.

31. Kaatze U. Broadband dielectric spectrometry of liquids and biosystems / U. Kaatze, Y. Feldman // Measurement Science and Technology. – 2006. – Vol. 17, No. 2. – P. R17–R35.

32. Khaled D. E. Dielectric spectroscopy in biomaterials: agrophysics / D. E. Khaled, N. Castellano, J. Gázquez, [et al.] // Materials. – 2016. – Vol. 9, No. 5. – P. 310.

33. Cole K. S. Dispersion and absorption in dielectrics i. alternating current characteristics / K. S. Cole, R. H. Cole // The Journal of Chemical Physics. – 1941. – Vol. 9, No. 4. – P. 341–351.

34. Schwan H. P. Analysis of dielectric data: experience gained with biological materials / H. P. Schwan // IEEE Transactions on Electrical Insulation. – 1985. – Vol. EI-20, No. 6. – P. 913–922.
35. Kumar A. High-sensitivity, quantified, linear and mediator-free resonator-based microwave biosensor for glucose detection / A. Kumar, C. Wang, F.-Y. Meng, [et al.] // Sensors. – 2020. – Vol. 20, No. 14. – P. 4024.
36. Wolf M. Broadband dielectric spectroscopy on human blood / M. Wolf, R. Gulich, P. Lunkenheimer, A. Loidl // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. – 2011. – Vol. 1810, No. 8. – P. 727–740.
37. Robert J.-J. Continuous monitoring of blood glucose / J.-J. Robert // Hormone Research in Paediatrics. – 2002. – Vol. 57, No. Suppl. 1. – P. 81–84.
38. IEEE standard for safety levels with respect to human exposure to radio frequency electromagnetic fields, 3 kHz to 300 GHz / in IEEE Std C95.1 – 2005. – PP. 1–238.
39. Schwan H. P. Electrical properties of bound water / H. P. Schwan // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 125, No. 2. – P. 344–354
40. Feldman Y. Time domain dielectric spectroscopy study of biological systems / Y. Feldman, I. Ermolina, Y. Hayashi // IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2003. – Vol. 10, No. 5. – P. 728–753.
41. Sasisanker P. Hydration dynamics of water near an amphiphilic model peptide at low hydration levels: a dielectric relaxation study / P. Sasisanker, H. Weingärtner // ChemPhysChem. – 2008. – Vol. 9, No. 18. – P. 2802–2808.
42. Schwan H. P. Microwave dielectric properties of tissue. some comments on the rotational mobility of tissue water / H. P. Schwan, K. R. Foster // Biophysical Journal. – 1977. – Vol. 17, No. 2. – P. 193–197.
43. Alekseev S. I. Millimeter wave reflectivity used for measurement of skin hydration with different moisturizers / S. I. Alekseev, I. Szabo, M. C. Ziskin // Skin Research and Technology. – 2008. – Vol. 14, No. 4. – P. 390–396.

44. Busra T. Dielectric properties of foods / T. Busra, S. Dede, F. L. Altay // Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 7, No. 11. – P. 1805–1816.
45. Thakur O. P. Analysis of dielectric relaxation in water at microwave frequency / O.P. Thakur, A. K. Singh // 2008. – Vol. 2, No. 13. – P. 637–644.
46. Nyfors E. Cylindrical microwave resonator sensors for measuring materials under flow / E. Nyfors. – Espoo: Helsinki University of Technology, 2000.
47. Kouzai M. Complex permittivity measurement at millimetre-wave frequencies during the fermentation process of japanese sake / M. Kouzai, A. Nishikata, K. Fukunaga, S. Miyaoka // Journal of Physics D: Applied Physics. – 2007. – Vol. 40, No. 1. – P. 54–60.
48. Baquero F. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments / F. Baquero, J.-L. Martínez, R. Cantón // Current Opinion in Biotechnology. – 2008. – Vol. 19, No. 3. – P. 260–265.
49. Mason A. Real-time microwave, dielectric, and optical sensing of lincomycin and tylosin antibiotics in water: sensor fusion for environmental safety / A. Mason, M. Soprani, O. Korostynska, [et al.] // Journal of Sensors. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–11.
50. Mahmood A. R. Detection of antibiotics in drinking water treatment plants in baghdad city, iraq / A. R. Mahmood, H. H. Al-Haideri, F. M. Hassan // Advances in Public Health. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–10.
51. World Health Organization Pharmaceuticals in drinking-water / World Health Organization // 2012. – P. 35.
52. Jendrike N. ISO 15197: 2013 Evaluation of a blood glucose monitoring system's measurement accuracy / N. Jendrike, A. Baumstark, U. Kamecke, [et al.] // Journal of Diabetes Science and Technology. – 2017. – Vol. 11, No. 6. – P. 1275–1276.
53. Taleb N. Comparison of two continuous glucose monitoring systems, dexcom g4 platinum and medtronic paradigm veo enlite system, at rest and during exercise / N.

Taleb, A. Emami, C. Suppere, [et al.] // *Diabetes Technology & Therapeutics*. – 2016. – Vol. 18, No. 9. – P. 561–567.

54. Turgul V. Characterization of the complex permittivity of glucose/water solutions for noninvasive rf/microwave blood glucose sensing / V. Turgul, I. Kale. // 2016 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference: int. conf., May 2016: conf.proc. – Taipei, Taiwan, 2016. – P. 561–567.

55. Schwan H. P. Electrical properties of blood and its constituents: alternating current spectroscopy / H. P. Schwan // *Blut*. – 1983. – Vol. 46, No. 4. – P. 185–197.

56. Caduff A. First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system / A. Caduff, E. Hirt, Y. Feldman, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2003. – Vol. 19, No. 3. – P. 209–217.

57. Caduff A. Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: a novel system based on impedance spectroscopy / A. Caduff, F. Dewarrat, M. Talary, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – Vol. 22, No. 5. – P. 598–604.

58. Bogale Teseme W. Review on the study of dielectric properties of food materials / W. Bogale Teseme, H. Weldemichael Weldeselassie // *American Journal of Engineering and Technology Management*. – 2020. – Vol. 5, No. 5. – P. 76–83

59. Fang D. Hydration dominates dielectric spectroscopy-based high accuracy quantification of lactose content in cow's milk / D. Fang, K. Yang, J. Zhu, [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2023. – Vol. 103, No. 12. – P. 5873–5882.

60. Fanali G. Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, [et al.] // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2012. – Vol. 33, No. 3. – P. 209–290.

61. K. M. Boberg, E. Aadland, J. Jahnse Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a norwegian population / K. M. Boberg, E. Aadland, J. Jahnse // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 33, No. 1. – P. 99–103.

62. Uchida Y. Controversies in the determination of serum albumin concentration in chronic liver diseases / Y. Uchida, Y. Okuzumi, M. Fujishiro, [et al.] // *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*. – 2006. – Vol. 54, No. 10. – P. 1008–1012.
63. Liu F. Application of different methods to determine urease activity in enzyme engineering experiment and production / F. Liu, X. Cheng, J. Miu, [et al.] // *E3S Web of Conferences*. – 2021. – Vol. 251. – P. 02057.
64. Simas R. G. An improved method for simple and accurate colorimetric determination of l-asparaginase enzyme activity using nessler's reagent / R. G. Simas, E. Krebs Kleingesinds, A. Pessoa Junior, P. F. Long // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2021. – Vol. 96, No. 5. – P. 1326–1332.
65. McKee J. M. Real-time chemical sensing of aqueous ethanol glucose mixtures / J. M. McKee, B. P. Johnson // *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. – 2000. – Vol. 49, No. 1. – P. 114–119.
66. Eremenko Z. E. Complex permittivity measurement of high loss liquids and its application to wine analysis / Z. E. Eremenko, V. N. Skresanov, A. I. Shubnyi, [et al.] / Ed. by V. Zhurbenko // *Electromagnetic Waves*. – 2011. – PP. 403–422.
67. Schmidt S. All liquid based calibration scheme for microwave dielectrometry / S. Schmidt, M. Schusler, R. Jakoby. // 2017 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS): int. conf., 04-09 June, 2017: conf. proc. – Honolulu, HI, USA, 2017. – PP. 1266-1269.
68. Barthel J. Dielectric spectra of some common solvents in the microwave region. water and lower alcohols / J. Barthel, K. Bachhuber, R. Buchner, H. Hetzenauer // *Chemical Physics Letters*. – 1990. – Vol. 165, No. 4. – P. 369–373.
69. В.А. Кашпур, В.Я. Малеев, О.В. Хорунжая Застосування методу диференціальної нвч діелектрометрії в молекулярній біофізиці / В.А. Кашпур, В.Я. Малеев, О.В. Хорунжая // 2008. – Vol. 3, No. спец. випуск. – P. 446–454.

70. Gubin A. I. Whispering-gallery-mode resonator technique with microfluidic channel for permittivity measurement of liquids / A. I. Gubin, A. A. Barannik, N. T. Cherpak, [et al.] // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 2015. – Vol. 63, No. 6. – P. 2003–2009.
71. Artis F. Microwaving biological cells: intracellular analysis with microwave dielectric spectroscopy / F. Artis, T. Chen, T. Chretiennot, [et al.] // IEEE Microwave Magazine. – 2015. – Vol. 16, No. 4. – P. 87–96.
72. Shibata K. Measurement of complex permittivity for liquid materials using the open-ended cut-off waveguide reflection method / K. Shibata // IEICE Transactions on Electronics. – 2010. – Vol. E93-C, No. 11. – P. 1621–1629.
73. Keysight Technologies, Keysight N1501A Dielectric Probe Kit 10 MHz to 50 GHz [Online]. Available: <https://www.keysight.com/us/en/assets/7018-04631/technical-overviews/5992-0264.pdf> [Accessed: Oct 17, 2023].
74. Eremenko Z. E. High loss liquid dielectric characterization: comparison of microwave waveguide and resonator measurement techniques / Z. E. Eremenko, A. I. Shubnyi, A. Y. Kogut, R. S. Dolia // International Journal of Microwave and Wireless Technologies. – 2020. – Vol. 12, No. 9. – P. 892–899.
75. Vainshtein L. A. Elektromagnitnye volny / L. A. Vainshtein. – Moskva : Radio i sviaz, 1988. – 440 p.
76. Holloway C. L. Radio wave propagation characteristics in lossy circular waveguides such as tunnels, mine shafts, and boreholes / C. L. Holloway, D. A. Hill, R. A. Dalke, G. A. Hufford // IEEE Transactions on Antennas and Propagation. – 2000. – Vol. 48, No. 9. – P. 1354–1366.
77. Skresanov V. N. Improved differential ka band dielectrometer based on the wave propagation in a quartz cylinder surrounded by high loss liquid under test / V. N. Skresanov, Z. E. Eremenko, V. V. Glamazdin, A. I. Shubnyi // Measurement Science and Technology. – 2011. – Vol. 22, No. 6. – P. 065403.

78. З. Е. Еременко, Электромагнитные СВЧ колебания в структурах с регулярными и случайными неоднородностями, Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук, Харьков – 2011.

79. Ganapolskii E. M. A millimeter wave dielectrometer for high loss liquids based on the zenneck wave / E. M. Ganapolskii, Z. E. Eremenko, V. N. Skresanov // Measurement Science and Technology. – 2009. – Vol. 20, No. 5. – P. 055701.

80. Stratton J. A. Electromagnetic theory / J. A. Stratton. – Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc, 2007. – 615 p.

81. Choon Sae Lee Normal modes in an overmoded circular waveguide coated with lossy material / Choon Sae Lee, Shung-Wu Lee, Shun-Lien Chuang // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 1986. – Vol. 34, No. 7. – P. 773–785.

82. Abe T. Propagation constant below cutoff frequency in a circular waveguide with conducting medium / T. Abe, Y. Yamaguchi // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 1981. – Vol. 29, No. 7. – P. 707–712.

83. Marcatili E. A. J. Hollow metallic and dielectric waveguides for long distance optical transmission and lasers / E. A. J. Marcatili, R. A. Schmeltzer // Bell System Technical Journal. – 1964. – Vol. 43, No. 4. – P. 1783–1809.

84. A. I. Goroshko Study of hollow dielectric beam guide of millimeter and submillimeter wavelength range / A. I. Goroshko and Y. M. Kuleshov // Radiotekhnika. – 1972. – Vol. 21.

85. Rauf M. Skin depth verification of the electromagnetic waves for hydrocarbon detection / M. Rauf, A. M. Khan, A. Ansari, [et al.] // International Journal of Applied Electromagnetics and Mechanics. – 2019. – Vol. 60, No. 3. – P. 313–326.

86. А.С. Раевский Комплексные волны / А.С. Раевский. – Радиотехника, 2010.

87. Sato T. Dielectric relaxation processes in ethanol/water mixtures / T. Sato, R. Buchner // The Journal of Physical Chemistry A. – 2004. – Vol. 108, No. 23. – P. 5007–5015.

88. О. І. Шубний Резонаторні та хвильоводні методи виміру діелектричної проникності слабо та сильно поглинаючих середовищ в мікрохвильовому діапазоні, Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису, Харьков – 2017.

89. Sato T. Biological applications of a technique for broadband complex permittivity measurements / T. Sato, R. Buchner // The Journal of Physical Chemistry A. – 2004. – Vol. 108, No. 23. – P. 5007–5015.

90. Wei Y. Biological applications of a technique for broadband complex permittivity measurements / Y. Wei, S. Sridhar. // 1992 IEEE MTT-S Microwave Symposium Digest: int. conf., 01-05 June, 1992: conf. proc. – Albuquerque, NM, USA, 1992 – PP. 1271-1274.

91. Gadani D. H. Effect of salinity on the dielectric properties of water / D. H. Gadani, V. A. Rana , S. P. Bhatnagar, A. N. Prajapati, A. D. Vyas // Indian Journal of Pure & Applied Physics. – 2012. – Vol. 50, No. 6. – P. 405–410.

92. Eremenko Z. E. Broadband complex permittivity determination for biomedical applications / Z. E. Eremenko, E. S. Kuznetsova, A. I. Shubnyi, [et al.]. // 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO): int. conf., April 18-20, 2017: conf.proc. – Kyiv, Ukraine, 2017, PP. 259-262.

93. Eremenko Z. E. Exact-calculated resonator method for permittivity measurement of high loss liquids at millimetre wavelength / Z. E. Eremenko, E. M. Ganapolskii, V. V. Vasilchenko // Measurement Science and Technology. – 2005. – Vol. 16, No. 8. – P. 1619–1627.

94. Eremenko Z. E. Millimeter wave measurement of high loss liquids permittivity / Z. E. Eremenko, V. S. Skresanov, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin. // 2010 International Kharkov Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submillimeter Waves: int. conf., June 21-26, 2010: conf.proc. – Kharkiv, Ukraine, 2010. – PP. 1-3.

95. Godio A. Open ended-coaxial cable measurements of saturated sandy soils / A. Godio // American Journal of Environmental Sciences. – 2007. – Vol. 3, No. 3. – P. 175–182.
96. Mashimo S. The dielectric relaxation of mixtures of water and primary alcohol / S. Mashimo, S. Kuwabara, S. Yagihara, K. Higasi // The Journal of Chemical Physics. – 1989. – Vol. 90, No. 6. – P. 3292–3294.
97. Eremenko Z. E. Wave propagation in a double-layer below-cutoff lossy waveguide in the frequency range 5-30 ghz / Z. E. Eremenko, K. S. Kuznetsova // Telecommunications and Radio Engineering. – 2017. – Vol. 76, No. 1. – P. 73–85.
98. Kuznetsova K. S. The waveguide method for the determination of complex permittivity of high loss liquid at the frequency range 5÷40 GHz / K. S. Kuznetsova, Z. E. Eremenko. // 2016 II International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering (YSF): int. conf., October 10-14, 2016: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2016. – PP. 148-151.
99. Скресанов, В.М., Єременко, З.Є., Кузнецова К.С. Кювета діелектрометра з підвищеною диференціальною чутливістю на основі круглого хвилеводу з діелектричною вставкою для рідин, що сильно поглинають / Скресанов, В.М., Єременко, З.Є., Кузнецова К.С. // Радіофізика та електроніка. – 2013. – Vol. 4(18), No. 3. – P. 86–93.
100. Doumas B. T. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance / B. T. Doumas, T. Peters // Clinica Chimica Acta. – 1997. – Vol. 258, No. 1. – P. 3–20.
101. A. Watanabe, S. Matsuzaki, H. Moriwaki, K. Suzuki, and S. Nishiguchi A. Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhotics / A. A. Watanabe, S. Matsuzaki, H. Moriwaki, K. Suzuki, and S. Nishiguchi // Nutrition. – 2004. – Vol. 20, No. 4. – P. 351–357.

102. Labriola L. The impact of the assay for measuring albumin on corrected ('adjusted') calcium concentrations / L. Labriola, P. Wallemacq, B. Gulbis, M. Jadoul // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2009. – Vol. 24, No. 6. – P. 1834–1838.

103. Uchida Y. Controversies in the determination of serum albumin concentration in chronic liver diseases / Y. Uchida, Y. Okuzumi, M. Fujishiro, [et al.] // *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*. – 2006. – Vol. 54, No. 10. – P. 1008–1012.

104. Kuznetsova K. S. Dielectrometry of pharmaceutical ingredient solutions at microwaves / K. S. Kuznetsova, Z. E. Eremenko, A. I. Shubnyi, [et al.]. // 2017 IEEE First Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering: int. conf., 29 May - 02 June, 2017: conf. proc. – Kyiv, Ukraine, 2017– P. 257–260.

105. Завірюха Г.А. Зміни в крові лабораторних тварин після імунізації препаратом «лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби / Завірюха Г.А., Завірюха А.І., Синицин В.А., Влізло В.В., Віщур О.І. // *Ветеринарна Медицина*. – 2015. – No. 101. – P. 139–143.

106. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», – 1-е вид. – Харків, Україна, 2008. – 594.

107. Eremenko Z.E. The measurement of bioactive water solutions physical properties using microwave dielectrometer / Z.E. Eremenko, N.I. Sklyar, K.S. Kuznetsova. // *Achievements and Prospects in the Fight Against Infections Diseases (Microbiology, veterinary, pharmacy)*, 18 – 19 May 2017: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2017 – PP. 115–116.

108. Kuznetsova K. S. Glucose minimal concentration limit determination using waveguide-differential dielectrometer at microwaves / K. S. Kuznetsova, Z. E. Eremenko, A. I. Shubnyi, [et al.]. // 2018 IEEE 38th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO): int. conf., 24-26 April, 2018: conf. proc. – Kyiv, Ukraine, 2018, PP. 245-248.

109. K.S. Kuznetsova, V.A. Pashynska, Z.E. Eremenko, O.I. Shubniy, A.V. Martunov Permittivity characterization of aqueous solutions of biological active substances / K.S. Kuznetsova, V.A. Pashynska, Z.E. Eremenko, O.I. Shubniy, A.V. Martunov // II International Advanced Study Conference Condensed Matter and Low Temperature Physics: int. conf., June 6 - 12, 2021: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2021, P. 148.
110. Kim N.-Y. Rapid, sensitive and reusable detection of glucose by a robust radiofrequency integrated passive device biosensor chip / N.-Y. Kim, K. K. Adhikari, R. Dhakal, [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5, No. 1. – P. 7807.
111. Cano-Garcia H. Detection of glucose variability in saline solutions from transmission and reflection measurements using v-band waveguides / H. Cano-Garcia, P. Kosmas, I. Sotiriou, [et al.] // Measurement Science and Technology. – 2015. – Vol. 26, No. 12. – P. 125701.
112. Odabashyan L. Real-time noninvasive measurement of glucose concentration using a modified hilbert shaped microwave sensor / L. Odabashyan, A. Babajanyan, Z. Baghdasaryan, [et al.] // Sensors. – 2019. – Vol. 19, No. 24. – P. 5525.
113. Бельтюкова С.В. Методи визначення антибіотиків у харчових продуктах (огляд)/С.В. Бельтюкова, Є.О. Лівенцова // Методи та об'єкти хімічного аналізу. – 2013. – Vol. 7, No. 4. – P. 4–13.
114. Penner M. H. Basic principles of spectroscopy / M. H. Penner // Food Analysis / S. S. Nielsen. – Boston, MA : Springer US, 2010. – P. 375–385.
115. The state pharmacopoeia of Ukraine, vol. 2, suppl. 4, Kharkiv: state enterprise «Ukrainian scientific pharmacopoeial centre for quality of medicines», 2020.
116. Li P. Utilization of uv-vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (dom) studies: a review / P. Li, J. Hur // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 2017. – Vol. 47, No. 3. – P. 131–154.
117. Plata S. A note on fisher's correlation coefficient / S. Plata // Applied Mathematics Letters. – 2006. – Vol. 19, No. 6. – P. 499–502.

118. Wang Y. Introduction to molecular dynamics: theory and applications in biomolecular modeling / Y. Wang, J. A. McCammon // Computational Modeling of Biological Systems / N. V. Dokholyan. – Boston, MA : Springer US, 2012. – P. 3–30.
119. Humphrey W. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // Journal of Molecular Graphics. – 1996. – Vol. 14, No. 1. – P. 33–38.
120. Heugen U. Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy / U. Heugen, G. Schwaab, E. Bründermann, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103, No. 33. – P. 12301–12306.
121. Pal S. K. Biological water: femtosecond dynamics of macromolecular hydration / S. K. Pal, J. Peon, B. Bagchi, A. H. Zewail // The Journal of Physical Chemistry B. – 2002. – Vol. 106, No. 48. – P. 12376–12395.
122. Siddiqui K. S. Evaluating enzymatic productivity– the missing link to enzyme utility / K. S. Siddiqui, H. Ertan, A. Poljak, W. J. Bridge // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, No. 13. – P. 6908.
123. Najafpour G. D. Biochemical Engineering and Biotechnology / G. D. Najafpour. – First edition. – Elsevier, 2007. –439 P.
124. Al-Mardeai S. Membrane bioreactors: a promising approach to enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose / S. Al-Mardeai, E. Elnajjar, R. Hashaikeh, [et al.] // Catalysts. – 2022. – Vol. 12, No. 10. – P. 1121.
125. Church F. C. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins / F. C. Church, H. E. Swaisgood, D. H. Porter, G. L. Catignani // Journal of Dairy Science. – 1983. – Vol. 66, No. 6. – P. 1219–1227.
126. . Kuznetsova K.S. Dynamic control of enzymatic reaction using microwave dielectrometry method for biomedical applications / K.S. Kuznetsova, V.A. Pashynska, Z.E. Eremenko, A.V. Martynov // Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects (NBP): int. conf., October 4-8, 2021: conf. proc.– Kharkiv, Ukraine, 2021. – P. 66.

127. Simpson R. J. Fragmentation of protein using trypsin / R. J. Simpson // Cold Spring Harbor Protocols. – 2006. – Vol. 2006, No. 5.

128. Meriakri V. V. Dielectric properties of water solutions with small content of glucose in the millimeter - wave band and the determination of glucose in blood / V. V. Meriakri, E. E. Chigrai, I. P. Nikitin, M. P. Parkhomenko. // 2007 International Kharkov Symposium Physics and Engrg. of Millimeter and Sub-Millimeter Waves (MSMW): int. conf., June 25-30, 2007: conf. proc. – Kharkiv, Ukraine, 2007. – PP. 873-875.

129. S. S. Huffman UV-Vis based determination of protein concentration: validating and implementing slope measurements using variable pathlength technology / S. Huffman, K. Soni, J. Ferraiolo // BioProcess International. – 2014. – Vol. 12, No. 8.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ Статті у виданнях, індексованих Scopus та/або Web of Science

1. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, A. Shaposhnikova, B. Minofar, “Combined microwave dielectrometry and molecular dynamic study of aqueous solutions of human serum albumin with additives,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 364, Issue 1, 119981, 2022 (Q1).
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119981>
2. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, A. V. Martunov, “Development of experimental techniques for antibiotics detection in aqueous solutions: Real-time microwave dielectrometry and UV-Vis spectrophotometry study”, *Low Temperature Physics*, vol. 47, № 12, pp. 1139–1147, 2021 (Q3).
doi.org/10.1063/10.0007079
3. **K. S. Kuznetsova**, Z. E. Eremenko, “Influence of high loss liquid on the bandwidth of a circular two-layer waveguide at microwaves”, *Journal of Electromagnetic Waves and Applications*, vol. 32, Issue 14, pp. 1834 – 1846, 2018 (Q2).
<https://doi.org/10.1080/09205071.2018.1476185>
4. V. N. Skresanov, Z. E. Eremenko, **K. S. Kuznetsova**, Y. Wu, and Y. He, “Circular layered waveguide use for wideband complex permittivity measurement of lossy liquids”, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 63, Issue 3, pp. 694 – 701, 2014 (Q1). DOI:10.1109/TIM.2013.2282003

Статті у фахових виданнях України

5. Z. E. Eremenko, V. A. Pashynska, **K. S. Kuznetsova**, O. I. Shubnyi, N. I. Sklyar, A. V. Martynov, “Microwave dielectrometer application to antibiotics concentration

control in water solution”, Radiofizika i Electronika, vol. 26, № 3, pp. 30 – 37, 2021.
DOI: 10.15407/rej2021.03.030

Глава в книзі

6. Z. E. Eremenko, **K. S. Kuznetsova**, N. I. Sklyar and A. V. Martynov, “Measuring complex permittivity of high-loss liquids”, In book: Dielectric Materials and Applications. Edited by Pankaj Kr. Choudhury, Chapter 2, [pp. 41 – 74], Nova Science, ISBN 978-1-53615-316-3, 2019.

Патент на винахід України

7. Диференційна кювета для виміру комплексної діелектричної проникності рідини, В. М. Скресанов, З. Є. Єременко, **К. С. Кузнецова**, Патент на винахід України № 109485 від 25.08.2015.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **K. S. Kuznetsova**, V. A. Pashynska, Z. E. Eremenko, “Monitoring of the proteins hydrolysis reaction using the microwave dielectrometry method”, IEEE Ukrainian Microwave Week, Kharkiv, Ukraine, 14 – 18 Nov. 2022, pp. 142 – 146, doi: 10.1109/UkrMW58013.2022.10037092.

2. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, A. V. Martunov, “High Loss Liquid in Layered Waveguide at Microwaves and Applications”, IEEE 17th International Conference on Mathematical Methods in Electromagnetic Theory (MMET), Kyiv, Ukraine, 02 – 05 July 2018, pp. 246 – 249, doi: 10.1109/MMET.2018.8460267.

3. Z. E. Eremenko, V. M. Skresanov, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin and M. P. Natarov, Differential waveguide cuvette for complex permittivity measurement of high loss liquids at microwaves, 47th European Microwave Conference

(EuMC), Nuremberg, Germany, 10-12 October 2017, pp. 707-710, doi: 10.23919/EuMC.2017.8230945.

4. Z. E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, A. I. Shubnyi, V. V. Glamazdin, and M. P. Natarov, “Determination Method of Water-Glucose Solution Concentration at Microwaves”, 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO), Kyiv, Ukraine, 18-20 April 2017, pp. 259 – 262, doi: 10.1109/ELNANO.2017.7939759.

5. Z.E. Eremenko, **E. S. Kuznetsova**, “The absence of fixed cut-off frequencies in a circular layered waveguide with lossy liquid”, 9th International Kharkiv Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submilli-meter Waves (MSMW), Kharkiv, Ukraine, 20 – 24 June 2016, pp. 1 – 3, doi: 10.1109/MSMW.2016.7538180.