

Исследование диэлектрической функции водных растворов глюкозы и альбумина методом импульсной терагерцевой спектроскопии

М.М.Назаров, О.П.Черкасова, А.П.Шкуринов

Проведено исследование водных растворов глюкозы и бычьего сывороточного альбумина методом импульсной терагерцевой спектроскопии. Для описания диэлектрической проницаемости растворов этих веществ использована упрощенная модель, которая может быть применена в области частот 0.05–2.7 ТГц. В предположении, что при высоких концентрациях глюкозы и белка в растворе большинство молекул воды становятся связанными, исследовано изменение характеристик такой воды. Для повышения достоверности измерения проведены двумя независимыми методами: нарушенного полного внутреннего отражения и пропускания. Объединение результатов измерений этими двумя методами позволяет расширить используемый спектральный диапазон в сторону низких частот.

Ключевые слова: терагерцевое излучение, импульсная терагерцевая спектроскопия, нарушенное полное внутреннее отражение, вода, глюкоза, бычий сывороточный альбумин, растворы, диэлектрическая функция, модель Дебая.

1. Введение

Определение концентраций сахаров и белков в крови и в тканях важно для медицинских и биологических приложений. Известно, что при исследовании *in vivo* отражения излучения от кожи человека или животных, имеющих высокое содержание глюкозы в крови, терагерцевый (ТГц) сигнал изменяется [1]. Основным компонентом жидкостей и тканей организма является вода. Излучения ТГц и субТГц диапазонов частот могут быть использованы для диагностики относительных изменений концентрации и свойств воды, поскольку именно этим частотам соответствуют времена релаксации молекул воды [2]. Измеряемая с помощью ТГц спектроскопии характеристика – это состояние самой воды, преобладающей в таких образцах [3]. Изменения пропорций свободной и связанной воды, изменение времен релаксации для каждого из этих состояний воды – все это проявляется в ТГц диапазоне частот. К сожалению, импульсная ТГц спектроскопия обычно захватывает не центр низкочастотного «пика» поглощения воды (в области 0.02 ТГц), а только его высокочастотный «хвост», начиная с частоты 0.1 ТГц (рис.1). Тем не менее импульсная ТГц спектроскопия стала признанным методом, дополняющим уже существующие методы диагностики биотканей и растворов. Однако нет единого мнения о том, как интерпретировать контраст ТГц сигнала

при *in vivo* сканировании кожи и как прогнозировать изменение ТГц отклика растворов.

Исходно спектральный отклик вещества задается его комплексной диэлектрической проницаемостью $\epsilon(\omega)$. Для однородного гладкого объекта поглощение, преломление и отражение однозначно определяются $\epsilon(\omega)$. Исторически сложилось так, что наибольшее развитие теория диэлектрической проницаемости воды и ее растворов получила в рамках диэлектрической спектроскопии при описании изменений, наблюдаемых в экспериментальных спектрах диэлектриков [2, 4].

В диэлектриках в области частот от килогерц до гигагерц релаксационные процессы принято разделять на четыре типа: α -, β -, γ - и δ -релаксации [2, 4, 5]. Каждому из этих процессов соответствует свой широкий максимум по частоте, который перекрывается с соседними пиками и описывает специфический процесс релаксации. Например, α -релаксация описывает диэлектрические потери в стеклообразных диэлектриках, и ее времена релаксации равны нескольким наносекундам [2]. Для воды домини-

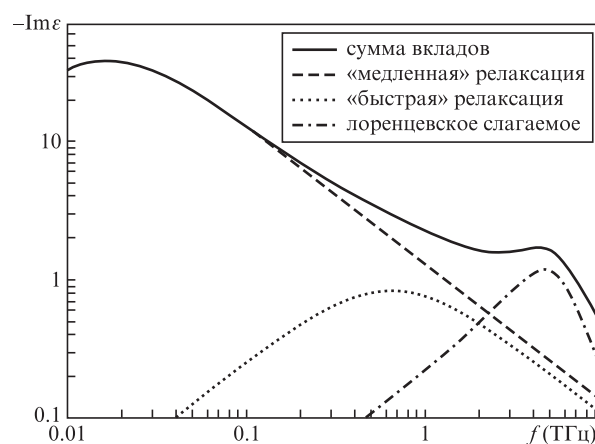


Рис.1. Спектры мнимой части диэлектрической проницаемости воды $\text{Im}\epsilon(f)$ в ТГц диапазоне частот для «двухкомпонентной» модели релаксации.

М.М.Назаров. Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Россия, Московская обл., 140700 Шатура, ул. Святоозерская, 1; e-mail: nazarovmax@mail.ru

О.П.Черкасова. Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 13/3; e-mail: o.p.cherkasova@gmail.com

А.П.Шкуринов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет и Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы, 1; Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Россия, Московская обл., 140700 Шатура, ул. Святоозерская, 1; e-mail: ashkurinov@gmail.com

Поступила в редакцию 21 апреля 2016 г.

рует γ -релаксация, характерное время которой составляет десятки пикосекунд (рис. 1) [5, 6]. Внешнее электромагнитное поле задает ориентацию диполей молекул воды. Под влиянием тепловой энергии и энтропии молекулы испытывают вращательную диффузию, и выделенность этой ориентации постепенно пропадает за характерное время релаксации τ . Молекула воды имеет специфическую структуру, которая позволяет образовывать до четырех водородных связей с соседними молекулами. В результате формируется трехмерная структура из молекул воды, связанных водородными связями [2, 7]. Именно процесс разрыва водородных связей между молекулами воды с их последующей переориентацией составляет молекулярную основу γ -релаксации, а τ представляет собой время, необходимое для высвобождения молекулы воды из сетки водородных связей [2, 8]. П.Дебай предложил описывать реакцию воды на внешнее электрическое поле с помощью комплексной диэлектрической проницаемости вида

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty + [\varepsilon(0) - \varepsilon_\infty]/(1 + i\omega\tau), \quad (1)$$

где $\omega = 2\pi f$ – частота внешнего электрического поля; ε_∞ и $\varepsilon(0)$ – диэлектрические проницаемости воды при максимально высокой и нулевой частотах внешнего поля.

В дальнейшем рядом авторов было показано, что в воде, наряду с молекулами, связанными водородными связями, существует небольшое число молекул, не связанных ни одной водородной связью [8–10]. Такое состояние воды описывается вторым слагаемым в выражении для комплексной диэлектрической проницаемости (1). Времена релаксации «свободных» молекул воды более чем на порядок меньше, чем «связанных», поэтому второе слагаемое получило еще название быстрого дебаевского слагаемого (рис.1) [11, 12]. Двухкомпонентная модель Дебая традиционно используется при описании данных, полученных с помощью импульсной ТГц спектроскопии [13–15].

С повышением точности измерений оказалось, что даже двухкомпонентная формула Дебая не всегда правильно описывает экспериментальные данные. Для субТГц частот были получены модификации выражения (1), которые учитывали отклонения от дебаевского диэлектрического спектра раствора [2]. В частности, в рамках модели Коула–Коула была предложена формула с членом $i\omega\tau$ в степени меньше единицы, учитывающая симметричное уширение спектра диэлектрической проницаемости, ко-

торое наблюдается при растворении сахаров и белков в воде [6, 16].

Наиболее общая формула, которая используется в настоящее время для анализа диэлектрического отклика полярных растворов (в СВЧ и ТГц диапазонах частот), имеет следующий вид:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_1}{[1 + (i\omega\tau_1)^\alpha]^\gamma} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + i\omega\tau_2} + \frac{A_1}{\omega_{01}^2 - \omega^2 + i\gamma_{01}\omega} + \frac{i\sigma}{\omega\varepsilon_0} + \dots, \quad (2)$$

при этом сумма амплитуд всех слагаемых должна быть равна статистической восприимчивости

$$\varepsilon_s = \varepsilon_\infty + \Delta\varepsilon_1 + \Delta\varepsilon_2 + \frac{A_1}{\omega_{01}^2} + \dots, \quad (3)$$

где τ_1 и τ_2 – времена релаксации для первого («медленного», основного процесса γ -релаксации) и второго («быстрого») дебаевских слагаемых; $\Delta\varepsilon_i$ – вклады в диэлектрическую проницаемость первого ($\Delta\varepsilon_1$) и второго ($\Delta\varepsilon_2$) дебаевских слагаемых; A_1 – амплитуда, ω_{01} – частота и γ_{01} – ширина линии лоренцевского слагаемого; σ – статическая проводимость; ε_0 – диэлектрическая постоянная. Величины ε_s , $\Delta\varepsilon_1$ и τ_1 точно известны из данных диэлектрической спектроскопии [2].

В такой модели (рис.1) выделяют около пяти изменяемых параметров, неверное задание одного из них приводит к ошибочным значениям остальных, что отражается в заметном расхождении литературных данных по дебаевским параметрам ТГц отклика даже для дистиллированной воды [11–14, 16–19] (табл.1).

Более высокочастотные слагаемые несущественны для частот менее 5 ТГц. В СВЧ и гигагерцевом (ГГц) диапазонах чаще используют модель одного дебаевского слагаемого (1), тогда $\Delta\varepsilon_1 = \varepsilon_s - \varepsilon_\infty$, $\Delta\varepsilon_2 = 0$ и $A_1 = 0$. Для дистиллированной воды степени α и γ равны единице, а проводимость $\sigma = 0$. Когда в воде появляются растворенные вещества, то степень α становится меньше единицы (модель Коула–Коула) [16], для растворов солей (в том числе и в буфере) также появляется проводимость σ [12, 20]. Есть еще другой, новый широкополосный метод измерений в этом диапазоне частот на основе оптического эффекта Керра [21, 22], с помощью которого одновременно измеряются параметры обоих процессов релаксации, упомянутых выше, но результирующие значения τ_2 завыше-

Табл.1. Параметры диэлектрической функции воды.

f (ТГц)	ε_s	ε_∞	$\Delta\varepsilon_1$	τ_1 (пс)	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 (фс)	A_1/ω_{01}^2	ω_{01} (ТГц)	γ_{01} (ТГц)	T (°C)	Метод	Литература
0.1–2.7	78.5	2.5±0.1	75±6	9.5±0.8	1.47±0.05	230±30	1.14	5.3	5.35	22	НПВО	Настоящая работа
0.08–1.1	77.5	2.4±0.02	72±2	9.5±0.3	2.0±0.04	300±30	1.12	5.3	5.35	22	ИТС	
0.25–4.0	77.8	2.39	72.02	7.93	2.1	260	1.27	5.22	5.68	27	НПВО	[16]
0.2–2.5	78.3	2.68	72.30	8.34	2.12	360	1.13	5.01	7.06	25	НПВО	[19]
0.2–3.5	79.9	2.50	74.90	9.43	1.67	248	1.12	5.3	5.35	20	НПВО	[17]
0.1–1.0	78.8	5.30	73.98	8.50	1.32	124	0	–	–	20	ИТС	[13, 14]
0.18–2.42	78.4	–	–	8.25	1.4±0.1	310±60	1.57	–	–	25	ИКФ	[12]
4.54–6.06		–	–	8.25	1.4±0.1	310±60	1.57	–	–	25	ИТС	
1.5–6.67		2.20	71.49	8.31	2.80; 1.6	1.0; 0.10	1.12	5.26	4.34	25	ИКФ	[11]
3×10^{-5} –0.1	78.4±0.1	5.2±0.1	73.16	8.27±0.2	0	–	0	–	–	25	ДС	[18]
	80.2±0.1	5.6±0.1	74.60	9.36±0.5	0	–	0	–	–	20		

Примечания: НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение; ИТС – импульсная ТГц спектроскопия пропускания; ДС – диэлектрическая спектроскопия; ИКФ – ИК фурье-спектроскопия.

ны по сравнению с данными, полученными методом импульсной ТГц спектроскопии.

Даже для чистой воды многопараметрическая модель (2), (3) не является точной и применимой в широком диапазоне частот. В частности, есть сомнения, что второе, быстрое дебаевское слагаемое, пропорциональное $\Delta\epsilon_2$, имеет физический смысл и описывается именно таким отдельным слагаемым. Возможно, это слагаемое не описывает независимый процесс, а связано с уширением крыла γ -релаксации, которое не менее точно можно описать дополнительным слагаемым в дробной степени в знаменателе единственного медленного дебаевского слагаемого [2]. Кроме того, нам не известно ни одного процесса/раствора, где бы доминировал вклад этого быстрого дебаевского слагаемого.

Не имея единой общепризнанной модели происхождения с самой водой в ТГц диапазоне частот, не рационально анализировать спектры водных растворов в терминах изменения многих параметров модели. При описании реального раствора, в котором изменяется одна характеристика, например концентрация растворенного вещества, нет особого физического смысла менять три-четыре параметра в выражении для диэлектрической функции раствора, как это сейчас принято. Необходимость изменять все параметры свидетельствует скорее о несовершенстве, нефизичности используемой модели.

В настоящей работе мы сначала систематизируем известные параметры модели воды и уточняем диапазон разумных значений каждого из них при комнатной температуре. По нашему мнению, эталонные параметры каждого процесса релаксации необходимо брать из соответствующего ему диапазона частот. Так, для наиболее существенного медленного дебаевского γ -процесса (диапазон частот 1–100 ГГц с центром при частоте 20 ГГц) значения берем из данных диэлектрической спектроскопии [18]. Параметры быстрого дебаевского процесса согласуем с данными импульсной ТГц спектроскопии, для высокочастотного лоренцевского слагаемого данные берем из результатов ИК фурье-спектроскопии [16] и не варьируем. Получаем максимально простую модель и значения параметров, достаточно точно описывающие наши и опубликованные другими авторами экспериментальные данные для воды в диапазоне частот 0.05–3.0 ТГц.

Далее используем параметры хорошо изученного раствора D-глюкозы в воде, известные как в ГГц [23], так и в ТГц [16] диапазоне. Новизна нашей работы состоит в измерении спектров растворов БСА и глюкозы в более широком, чем в других работах, диапазоне ТГц частот (за счет добавления низких частот), а также в наблюдении изменений во времени в растворе смеси БСА и глюкозы.

2. Подходы к описанию диэлектрической функции полярных растворов в ТГц диапазоне

Параметры модели вида (2) исследованы многими научными группами [11–14, 16–19]. Их значения для наиболее характерных случаев приведены в табл.1. Видно, что разброс значений каждого параметра намного больше, чем та точность, которую дает аппроксимация. Также видно, что в разных диапазонах частот и для разных методов измерения значения одного и того же параметра различны.

Таким образом, для аппроксимации спектра диэлектрической функции необходимо для каждого параметра установить ограничения, пользуясь данными из подходящего для каждого из процессов диапазона частот. В нашем случае для анализа данных в области 0.07–2.7 ТГц при комнатной температуре (20–25 °С) выберем следующие диапазоны параметров, не противоречащие литературным данным:

$$\epsilon_{\infty} = 2.1-2.7, \quad \Delta\epsilon_1 = 72-75, \quad \tau_1 = 8.3-9.5 \text{ пс},$$

$$\Delta\epsilon = 1.4-2.1, \quad \tau_2 = 130-360 \text{ фс}, \quad \epsilon_s = 77-80.2.$$

Отметим, что важно фиксировать температуру [11, 17, 18, 21], поскольку при ее изменении от 20 °С до 25 °С время τ_1 изменяется от 9.36 до 8.27 пс, что оказывает заметное влияние в низкочастотной части ТГц спектра. Как изменяются основные параметры при повышении (относительно комнатной) температуры на 1 °С можно оценить, например, из данных, опубликованных в работе [18] и приведенных в табл.1: τ_1 изменяется на 2.4%, $\Delta\epsilon_1$ – на 0.4%, ϵ_{∞} – на 1.5%.

Для низких (ГГц и СВЧ диапазоны) частот методами диэлектрической спектроскопии подробно изучены спектры диэлектрической функции для водных растворов сахаров, белков и солей. Известно, что в этом диапазоне хорошо работает модель Коула–Коула [2, 20, 23]. При увеличении концентрации растворимого вещества пик мнимой части диэлектрической функции уширяется (в логарифмическом масштабе), одновременно уменьшается его амплитуда и увеличивается время релаксации τ этого процесса. Одно из существующих упрощенных объяснений процессов, происходящих в растворе сахаров при повышении концентрации, таково [2]: доля исходной, свободной воды уменьшается ($\Delta\epsilon_1$ снижается, τ_1 не изменяется), увеличивается доля связанной воды (имеющей другое, большее τ_{1w} , такое, что разность соответствующих частот $1/\tau_1 - 1/\tau_{1w}$ меньше спектральной ширины пиков зависимости $\text{Im}\epsilon(\omega)$), и сумма вкладов свободной и связанной воды представляет собой движущийся влево и вниз пик $\text{Im}\epsilon(\omega)$. Это объясняют увеличением эффективной величины τ_1 , а уширение пика описывают с помощью уменьшения степени α в (2). При высоких концентрациях ($C > 10$ мг/мл) зависимость параметров ($\Delta\epsilon_1$, τ_1) от концентрации становится более медленной, поскольку гидратные области вокруг каждой молекулы растворенного вещества начинают пересекаться между собой [16].

3. Установка и образцы

В наших предыдущих работах подробно описаны импульсный ТГц спектрометр [24, 25] и методы расчета [26, 27]. Измерения параметров растворов проводили последовательно на двух импульсных ТГц спектрометрах: на «низкочастотном» – в конфигурации на пропускание в кювете толщиной 500 мкм и на «высокочастотном» – в конфигурации нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на призме из высокоомного кремния с прямым углом при вершине. В низкочастотном спектрометре в качестве источника и приемника ТГц импульсов использовалась пара фотопроводящих антенн [25] при средней мощности (в ТГц диапазоне) излучающей многодипольной антенны 10 мкВт. Такая эффективная антенна позволила просветить водный образец толщиной 0.5 мм

излучением с частотами вплоть до 1 ТГц (т.е. измерить уменьшение амплитуды ТГц поля в 1000 раз, при этом мощность/энергия уменьшается на шесть порядков!). Для стабильного измерения крайних, низких частот (~ 0.07 ТГц) применялась длинная временная выборка – от -20 до 40 пс относительно центра ТГц импульса.

В высокочастотном спектрометре [24] в качестве источника и приемника использовались поверхность LT-GaAs и кристалл ZnTe толщиной 1 мм соответственно [25]. Средней мощности ТГц излучения 100 нВт было достаточно для измерения спектра отражения в диапазоне 0.15–2.7 ТГц. При выборе другого источника/приемника [25] можно измерять спектр отражения вплоть до 3.5 ТГц, но в ущерб частотам менее 0.4 ТГц. В случае исследования водных растворов это не оправданно, т.к. наибольшие изменения происходят в области низких частот. Для таких частот (0.07–0.2 ТГц) необходимы большая (2×2 см) площадь образца, расположенного на призме, толстый (1 мм) слой раствора и длинная (60 пс) временная выборка.

Для измерения действительной части $\epsilon(\omega)$ (по сути преломления) на низких частотах более стабильные и точные результаты получаются при работе с кюветой. Однако для частот свыше 1 ТГц лучше использовать призму из-за большей величины сигнала на высоких частотах. Кроме того, при работе с призмой исключена ошибка, связанная с толщиной слоя воды, малое изменение которого вносит заметную ошибку в данные по преломлению при работе с кюветой.

Характерные спектры амплитуды и фазы коэффициента отражения представлены на рис.2. Нормировка проводится на спектр отражения от призмы без раствора.

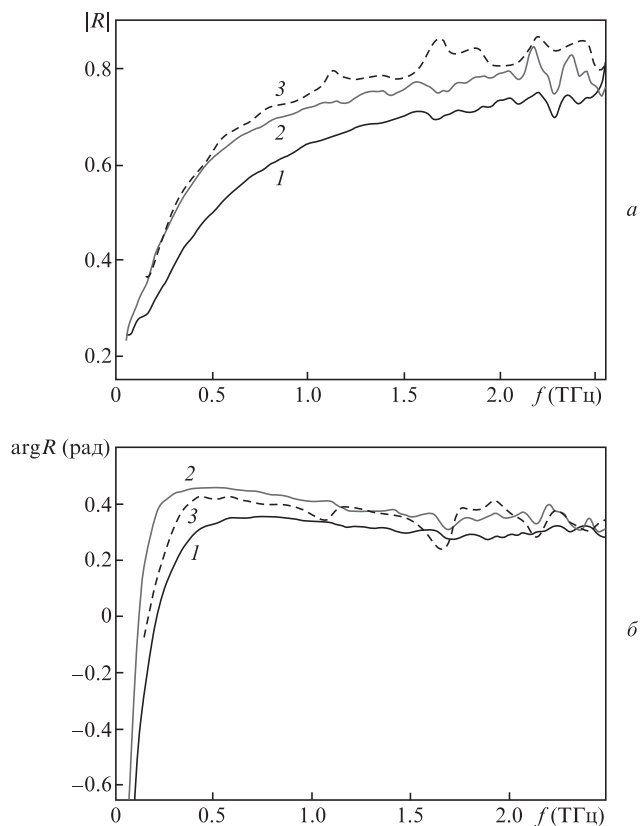


Рис.2. Спектры амплитуды $|R|$ (а) и фазы $\arg R$ (б) коэффициентов отражения воды (1), водных растворов БСА (2) и глюкозы (3). Концентрация БСА равна 500 мг/мл, глюкозы – 400 мг/мл.

Далее спектры отражения и пропускания в комплексном виде по известным формулам Френеля [26, 27] пересчитывались в спектр комплексной же диэлектрической проницаемости и объединялись для дальнейшего анализа (рис.3).

В работе использовались растворы препаратов БСА и D-глюкозы (Sigma, США) в дважды дистиллированной воде. Сухие препараты взвешивали на аналитических весах и растворяли в воде до необходимой концентрации. Исследовались растворы глюкозы с концентрацией 270–840 мг/мл (1.5–4.7 М) и БСА с концентрацией 30–500 мг/мл. Для проведения реакции гликирования БСА растворяли в фосфатном буфере (50 мМ, pH 7.4) в концентрации 50 мг/мл и инкубировали с глюкозой (0.5 М) в течение 96 ч при температуре $T = 47^\circ\text{C}$. Объем раствора для одного измерения в конфигурации НПВО составлял 800 мкл, а в конфигурации на пропускание – 400 мкл.

В представляемых ниже данных каждый анализируемый спектр – результат усреднения по пяти независимым измерениям. При частотах 0.5–1.0 ТГц повторяемость результатов при пересчете в $\epsilon(\omega)$ составила $\sim 3\%$ для дей-

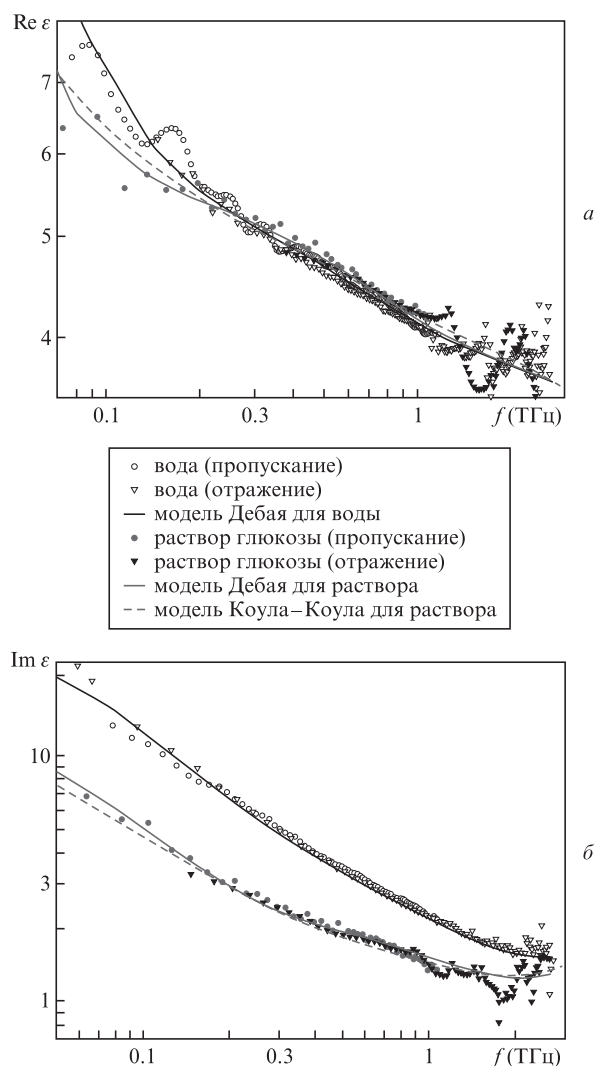


Рис.3. Спектры действительной (а) и мнимой (б) частей диэлектрической функции $\epsilon(f)$ насыщенного водного раствора D-глюкозы и воды при $T = 22^\circ\text{C}$. Точки – объединенные экспериментальные данные по спектроскопии пропускания и отражения, сплошные кривые – модели Дебая, штриховая кривая – модель Коула–Коула.

ствительной части и $\sim 1\%$ для мнимой. Инструментальные ошибки, связанные с точностью определения толщины слоя раствора в кювете и углов падения в призме, а также с конечным шагом по времени, в итоге приводят к общей ошибке $\sim 5\%$. Именно на такую величину расходятся значения $\varepsilon(\omega)$, пересчитанные из данных, полученных методами пропускания и отражения (на частотах 0.5–1.5 ТГц). На краях частотного спектра (0.05–0.1 ТГц и 2–2.7 ТГц) из-за малой величины сигнала ошибка/повторяемость составляет вплоть до 20% (рис.3).

4. Результаты

Из диэлектрической спектроскопии известно [20, 23], что при повышении концентрации глюкозы в воде снижается степень α , растет время τ_1 , уменьшается амплитуда $\Delta\varepsilon_1$ (пик γ -релаксации уширяется, движется в сторону низких частот и становится ниже). Авторы [16], исследовавшие растворы глюкозы методами импульсной ТГц спектроскопии (для диапазона частот, на порядок большего, чем в [20, 23]) в конфигурации НПВО, приводят другой набор параметров (табл.2). У нас же получился третий набор параметров, отличающийся от приведенных в этих литературных источниках. При этом значения самой диэлектрической функции на частотах, для которых оба подхода еще применимы, согласуются друг с другом. Полученные нами экспериментальный и модельный спектры диэлектрической функции водного раствора глюкозы с концентрацией 4.7 М приведены на рис.3.

Конечно, по отдельности действительную и мнимую части $\varepsilon(\omega)$ можно точно аппроксимировать при нескольких изменяемых параметрах. Однако мы делаем подгонку одновременно для обеих частей $\varepsilon(\omega)$, и при этом сложно получить точное соответствие результатов модельного расчета и эксперимента в широком диапазоне частот. Взяв значения параметров для предельной концентрации глюкозы, найденные методом диэлектрической спектроскопии [23] (в модели Коула–Коула, $\alpha < 1$), мы получили разумное согласие с результатами ТГц эксперимента. С другой стороны, используя модель Дебая ($\alpha = 1$), получаем не менее хорошее согласие результатов расчета и эксперимента (рис.3). Для этого в первом приближении домножили на 0.35 амплитуду первого дебаевского слагаемого. При более точной аппроксимации подобрали остальные параметры, которые изменились менее чем на 20% по сравнению с водой (табл.2).

Примечательно, что для концентрации 4.7 М амплитуда быстрого дебаевского слагаемого практически не

изменилась, притом что объемная доля глюкозы для этой концентрации составляет 0.55, т.е. половину объема воды заменили глюкозой, а амплитуда характерного спектрального отклика воды в области 1 ТГц практически осталась прежней. Это противоречие требует дальнейшего исследования. Насыщенный раствор важен еще тем, что в нем не должно было остаться свободной воды, следовательно ТГц спектр такого раствора должен определяться именно откликом воды, связанной с глюкозой.

При более строгом описании нужно учесть, что часть объема воды заменяется аморфной глюкозой, не имеющей спектральных особенностей в ТГц диапазоне. Ряд авторов предлагают таким образом разделить вклады оставшейся свободной воды, растворенного вещества и связанной воды [16, 28]. В нашей грубой модели уменьшение объемной доли воды учитывается уменьшением $\Delta\varepsilon_1$, что достаточно, поскольку вклад этого слагаемого превышает остальные вклады, пропорциональные $\Delta\varepsilon_2$ и A_1 , в используемом диапазоне частот. Для случая нерастворимой в воде добавки (суспензии масла) в работе [13] экспериментально показано, что ТГц спектр можно описать этими же параметрами Дебая, учтя их зависимость от концентрации. В частности, в [13] параметр $\Delta\varepsilon_1$ изменяется на 73%, τ_1 – на 2.3%, $\Delta\varepsilon_2$ – на 2.1%, τ_2 – на 0.1% и ε_∞ – на 1.3%. Зависимость параметров модели Коула–Коула от концентрации глюкозы в плазме крови в ГГц диапазоне приведена в работе [20].

Таким образом, для раствора глюкозы результаты расчетов по обеим моделям (модель Коула–Коула и двухкомпонентная модель Дебая) в одинаковой степени согласуются с результатами измерений. Мы считаем, что необходимо повышать точность и повторяемость экспериментов, расширять спектральный диапазон единого измерения, а не усложнять модели, используемые для анализа экспериментальных данных. Убедившись в работоспособности наших методов для общеизвестного раствора (глюкозы), перейдем к более сложным объектам – белкам.

Из диэлектрической спектроскопии известно, что связанная вода в мокрых порошках БСА и других белков имеет основной отклик на частотах 10^7 – 10^{10} Гц, более высокочастотный отклик (в том числе γ -релаксация) является слабым [2, 29]. Для слабых растворов белков в ТГц диапазон попадает высокочастотный край спектра γ -релаксации (медленный дебаевский процесс), который описывается моделью Коула–Коула. При повышении концентрации белков пик зависимости $\text{Im}\varepsilon(\omega)$ уширяется ($\alpha < 1$) и время τ_1 немного увеличивается [30]. Более быстрое, чем линейная зависимость от объемной доли бел-

Табл.2. Параметры диэлектрической функции на частотах 0.04 и 0.15 ТГц для раствора D-глюкозы в воде и в плазме крови (нижняя строка).

C (моль/л)	ε_s	ε_∞	$\Delta\varepsilon_1$	τ_1 (пс)	α	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 (фс)	T (°C)	ε (0.04 ТГц)	ε (0.15 ТГц)	Метод	Литература
0	78.5	2.5±0.1	75±6	9.5±0.8	1	1.5±0.05	230±30		17–i28	5.7–i8.9	НПВО	
1.5	60.0	2.49	53±2	9.5	1	1.6	230±20	22	13–i20	5.5–i6.3		Настоящая работа
4.7	34.3	2.5±0.02	29±0.3	9.5±0.3	1	1.7±0.03	230±20		9–i9	5.1–i3.3	ИТС	
4.7	57.8	2.4±0.02	54±0.3	30±0.3	0.8	0.9±0.03	230±20		9–i9	5.7–i3.5		
0	77.8	2.39	72.02	7.93	1	2.1	260	27	20–i29	6.9–i9.9	НПВО	[16]
1.5	55.8	2.39	50	7.93	1	2.1	220		16–i20	6.8–i7.3		
0	78.4	5.2	73.16	8.27	1	0	–		19–i29	6.4–i9.2		
1.5	74.8	2.85	72	13	0.87	0	–	25	14–i19	5.2–i7.2	ДС	[23]
4.7	55.8	4.7	51.1	123	0.7	0	–		7–i3.8	5.6–i1.6		
0.9	70.6	5.6	65	12.6	0.9	0	–	Комнатная			ДС	[20]

ка, уменьшение амплитуды γ -релаксации $\Delta\epsilon_1$ связывают с изменением структуры свободной воды вблизи белка, что должно изменять форму спектра $\epsilon(\omega)$ на низкочастотном крае ТГц диапазона [31].

Авторы [32] утверждают, что для частот 220–325 ГГц при концентрациях БСА менее 17 мг/мл поглощение раствора становится больше, чем у воды, хотя при более высоких концентрациях оно меньше, как и в большинстве публикаций.

Из данных импульсной ТГц спектроскопии известно, что при повышении концентрации белков поглощение и преломление их водных растворов уменьшаются, причем сильнее, чем в случае вытеснения объема растворителя добавляемым в воду белком [33,34]. На высокочастотном (2–4 ТГц) крае ТГц диапазона наличие белка (в частности, БСА) в растворе приводит к уменьшению величины поглощения, но все равно зависимость от концентрации остается нелинейной [28, 31].

Полученные нами спектры действительной и мнимой частей диэлектрической проницаемости водного раствора БСА представлены на рис.4. В данном случае использовалась нетипично большая концентрация БСА (500 мг/мл), чтобы сильнее проявилось изменение отклика связанной воды. Из рис.4 видно, что такое простое действие как уменьшение амплитуды первого дебаевского слагаемого

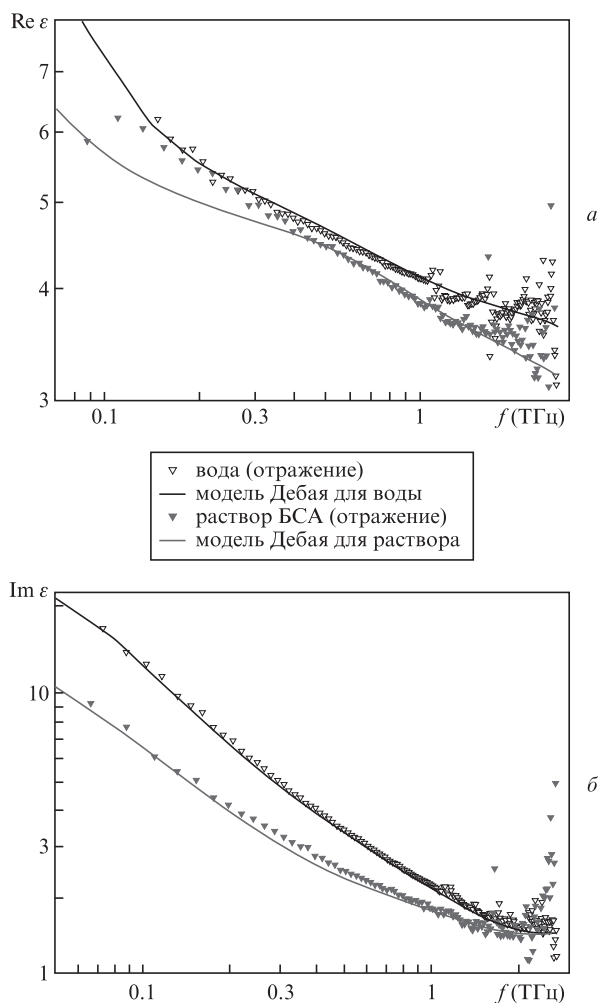


Рис.4. Спектры действительной (а) и мнимой (б) частей диэлектрической функции $\epsilon(f)$ водного раствора БСА и воды при $T = 22^\circ\text{C}$. Точки – экспериментальные данные по спектроскопии отражения, сплошные кривые – модели Дебая.

хорошо описывает изменение мнимой части результирующей диэлектрической проницаемости $\epsilon(\omega)$ раствора, а для действительной части $\epsilon(\omega)$ имеется некоторое расхождение на частотах от 0.1 до 0.3 ТГц. Подобное расхождение при низких частотах наблюдали и другие авторы для раствора белков [32].

Наиболее четкие и стабильные изменения спектра раствора имеют место при анализе фазы коэффициента отражения на частотах 0.15–0.4 ТГц (рис.5,а). На рис.5,а хорошо видна тенденция изменения формы спектра при увеличении концентрации БСА. Видно также, что результаты для концентрации 30 мг/мл еще сильно отличаются от результатов при нулевой концентрации (т.е. для воды). Аналогичные данные для раствора одного из сахаров (лактозы) приведены в работе [27].

На первый взгляд кажется, что наибольшие изменения при росте концентрации БСА наблюдаются для спектра фазы коэффициента отражения на частоте 0.3 ТГц.

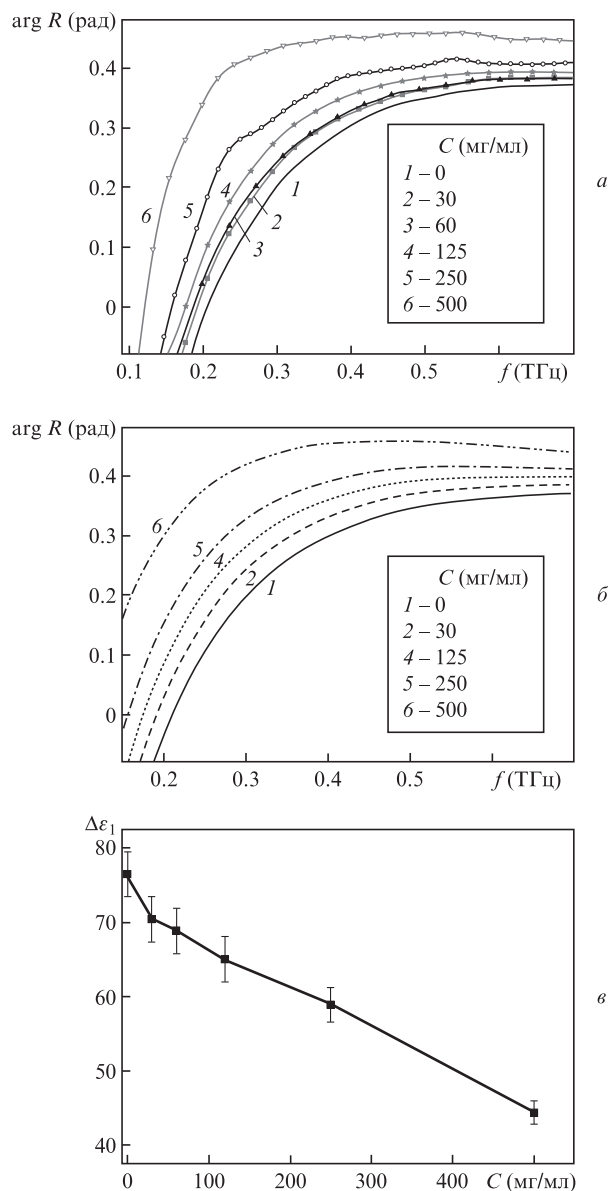


Рис.5. Экспериментальные (а) и модельные (аппроксимация данных эксперимента путем уменьшения величины $\Delta\epsilon_1$) (б) спектры фазы $\arg R$ коэффициента отражения водного раствора БСА при его различных концентрациях C , а также зависимость найденного при аппроксимации параметра $\Delta\epsilon_1$ от концентрации БСА (в).

Однако это связано с особенностями применения призмы в конфигурации НПВО – при угле падения 57° на этой частоте находится наиболее резкий перегиб спектра. В действительности наибольшие изменения диэлектрической функции происходят на самых низких из доступных частот. Это видно на рис.3 и 4.

На основе приведенной выше модели (2), (3) (при фиксированных значениях всех слагаемых, кроме первого) была построена зависимость параметра $\Delta\varepsilon_1$ от концентрации белка в растворе (рис.5,в). На самом деле по данным для частот свыше 0.1 ТГц мы не можем разделить влияния уменьшения $\Delta\varepsilon_1$ и увеличения τ_1 . Оба явления приводят к одинаковому изменению ТГц спектра, поскольку в знаменателе медленного дебаевского слагаемого $\omega\tau_1 \gg 1$. Наверняка мы можем только сказать, во сколько раз изменится отношение $\Delta\varepsilon_1/\tau_1$. В данном случае мы постулировали, что $\tau_1 = \text{const}$.

Для грубой оценки изменения ТГц спектра $\varepsilon(\omega)$ раствора при увеличении концентрации БСА можно предложить умножать $\Delta\varepsilon_1$ (или делить τ_1 (в пс) на величину $1 - 8 \times 10^{-4}C$ (где C взято в мг/мл), хотя при малых концентрациях эта оценка занижает влияние присутствия белка.

Практический интерес представляет не исследование водных растворов белков или сахаров по отдельности, а исследование их смесей. Известно, что высокий уровень глюкозы в крови человека приводит к гликированию белков [35]. М.Мерниа с соавторами недавно опубликовали результаты по использованию импульсной ТГц спектроскопии для изучения динамики гликирования человеческого сывороточного альбумина при его инкубации с глюкозой и фруктозой в течение 5–11 недель [36]. Однако изменение структуры белка происходит уже на ранней стадии гликирования и приводит к образованию амadorи-продуктов [37]. Эти продукты накапливаются в крови в течение нескольких часов при высокой концентрации глюкозы [38]. В настоящей работе мы использовали импульсную ТГц спектроскопию пропускания для изучения ранней стадии гликирования альбумина (0–96 ч). БСА (50 мг/мл) инкубировали в фосфатном буфере (50 мМ, рН 7.4) в присутствии глюкозы (0.5 М) в течение 96 ч при $T = 47^\circ\text{C}$ [39]. Образование продуктов гликирования при-

водит к изменению конформации БСА и изменению ТГц отклика раствора модифицированного белка.

На рис.6 приведена зависимость от времени после начала инкубации амплитуды ТГц импульса (в исходном временном представлении) при прохождении его через слой раствора толщиной 500 мкм. Нормировка проводится на амплитуду ТГц импульса, прошедшего через воду. Для спектрального представления зависимость на рис.6 есть отношение средних по диапазону частот 0.1–1.0 ТГц коэффициентов пропускания раствора и воды. Поскольку раствор более прозрачен, чем растворитель, относительное пропускание превышает единицу. В начальный период инкубации наблюдается значительное различие в пропускании растворов чистого БСА и его смеси с глюкозой. При инкубации БСА с глюкозой происходит присоединение молекул глюкозы к аминокислотным остаткам белка [38]. Это приводит к уменьшению концентрации свободных молекул глюкозы в растворе в смеси с БСА. Как следствие, меньшая доля воды может быть связана с молекулами глюкозы, что вызывает рост мнимой части диэлектрической проницаемости, а это, в свою очередь, обуславливает уменьшение пропускания исходной смеси (рис.6).

5. Заключение

Подробно измерены спектры диэлектрической функции водных растворов глюкозы и БСА в диапазоне частот 0.05–2.7 ТГц. Для грубой оценки причин изменения ТГц отклика водных растворов нужно было выяснить, что же в основном изменяется в диэлектрической функции. Оказалось, что наиболее существенным является уменьшение $\Delta\varepsilon_1$ (или увеличение τ_1) с ростом концентрации растворенного вещества. Одним этим изменением можно с достаточной точностью описать наблюдаемые изменения ТГц отклика (как при отражении, так и при пропускании) в диапазоне 0.05–2.7 ТГц. Исходя из модели диэлектрической функции раствора с учетом концентрации растворенного вещества можно установить, как изменения состава раствора проявятся в отражении излучения от реальных биологических объектов (кожа, кровь, структуры глаза). Мы показали, что наилучшая чувствительность к изменениям состава водного раствора наблюдается в низкочастотном диапазоне. Следовательно, необходимо расширять используемый спектральный диапазон в сторону низких частот, желательно до 20 ТГц. Широкополосные измерения при частотах свыше 1 ТГц неоправданны, поскольку в этом частотном диапазоне чувствительность к изменению состава растворов и тканей заметно ниже и изменений спектральной формы не замечено. Мы определили, какие изменения в зависимостях, полученных методами импульсной ТГц спектроскопии, информативны (изменение низкочастотной дисперсии), а какие ненадежны (общее изменение амплитуды или сдвиг по времени).

При использовании традиционной модели со вторым, быстрым дебаевским слагаемым даже при анализе спектров насыщенных растворов не обнаружено заметного изменения параметров предполагаемого процесса, хотя он должен в наибольшей степени проявляться именно в исследованном диапазоне частот 0.1–3.0 ТГц.

В смеси растворов наблюдался нестационарный, в течение нескольких дней, ТГц отклик, что, вероятно, связа-

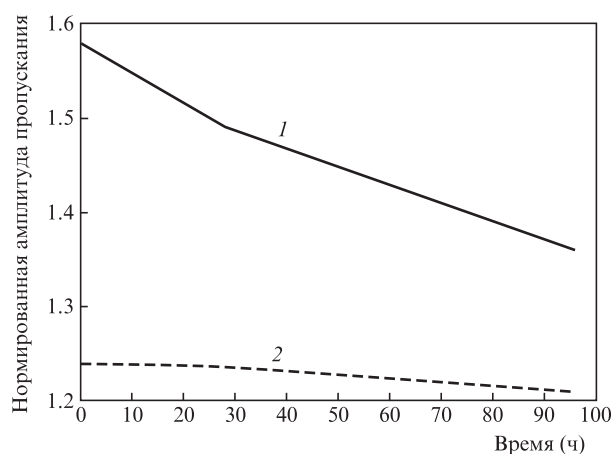


Рис.6. Зависимости нормированной средней амплитуды пропускания от времени после начала инкубации БСА с глюкозой. Кривая 1 – раствор смеси глюкозы и БСА, кривая 2 – контрольный раствор БСА.

но с уменьшением гидратной оболочки глюкозы при ее присоединении к БСА.

Авторы выражают благодарность Ю.Фельдману за плодотворное обсуждение результатов работы.

1. Cherkasova O.P., Nazarov M.M., Shkurinov A.P. *Proc. IEEE 40th Int. Conf. on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz)* (Hong Kong, 2015, F1E4). DOI:10.1109/IRMMW-THz.2015.7327417).
2. *Dielectric Relaxation in Biological Systems: Physical Principles, Methods, and Applications*. Ed. by V.Raicu, Y.Feldman (Oxford: Oxford University Press, 2015).
3. Nazarov M., Shkurinov A., Tuchin V.V., Zhang X.-C., in *Handbook of Photonics for Biomedical Science*. Ed. by V.V.Tuchin (Bosa Roca: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, Ch. 23, p. 519).
4. Гусев Ю.А. *Основы диэлектрической спектроскопии* (Казань, 2008).
5. Sibik J., Zeitler J.A. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **100**, 147 (2016).
6. Wolf M., Gulich R., Lunkenheimer P., Loidl A. *Biochim. Biophys. Acta: Proteins Proteomics*, **1824** (5), 723 (2012).
7. Ben Ishai P., Tripathi S.R., Kawase K., et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 15428 (2015).
8. Пеньков Н.В., Швирст Н.Э., Яшин В.А., Фесенко Е.Е. *Биофизика*, **58** (6), 933 (2013).
9. Walrafen G.E., Hokmabadi M.S., Yang W.-H. *J. Chem. Phys.*, **85**, 6964 (1986).
10. Robinson G.W., Cho C.H., Urquidi J. *J. Chem. Phys.*, **111**, 698 (1999).
11. Vij J.K., Simpson D.R.J., Panarina O.E. *J. Mol. Liq.*, **112**, 125 (2004).
12. Penkov N., Shvirst N., Yashin V., et al. *J. Phys. Chem. B*, **119** (39), 12664 (2015).
13. Reid C.B., Pickwell-MacPherson E., Laufer J.G., et al. *Phys. Med. Biol.*, **55**, 1 (2010).
14. Fitzgerald A.J., Pickwell-MacPherson E., Wallace V.P. *PLoS One*, **9** (7), e99291 (2014).
15. Zaytsev K.I., Gavdush A.A., Chernomyrdin N.V., Yurchenko S.O. *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, **5** (5), 817 (2015).
16. Shiraga K., Suzuki T., Kondo N., et al. *Carbohydr. Res.*, **406**, 46 (2015).
17. Yada H., Nagai M., Tanaka K. *Chem. Phys. Lett.*, **464**, 166 (2008).
18. Kaatze U. *J. Chem. Eng. Data*, **34**, 371 (1989).
19. Møller U., Cooke D.G., Tanaka K., Jepsen P.U. *J. Opt. Soc. Am. B*, **26** (9), A113 (2009).
20. Karacolak T., Moreland E.C., Topsakal E. *Microwave Opt. Technol. Lett.*, **55** (5), 1160 (2013).
21. Winkler K., Lindner J., Bürsing H., Vöhringer P. *J. Chem. Phys.*, **113**, 4674 (2000).
22. Turton D., Harwood T., Laphorn A., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8623**, 862303 (2013).
23. Fuchs K., Kaatze U. *J. Phys. Chem. B*, **105** (10), 2036 (2001).
24. Назаров М.М., Шкуринов А.П., Кулешов Е.А., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **38**, 647 (2008).
25. Назаров М.М., Шкуринов А.П., Ангелуц А.А., Сапожников Д.А. *Изв. вузов. Сер. Радиофизика*, **52**, 595 (2009).
26. Черкасова О.П., Назаров М.М., Ангелуц А.А., Шкуринов А.П. *Оптика и спектроскопия*, **120** (1), 59 (2016).
27. Ангелуц А.А., Балакин А.В., Евдокимов М.Г. и др. *Квантовая электроника*, **44** (7), 614 (2014).
28. Leitner D.M., Gruebele M., Havenith M. *HFSP J.*, **2** (6), 314 (2008).
29. Panagopoulou A., Kyritsis A., Shinyashiki N., Pissis P. *J. Phys. Chem. B*, **116**, 4593 (2012).
30. Basey-Fisher T.H., Hanham S.M., Andresen H., et al. *Appl. Phys. Lett.*, **99**, 233703 (2011).
31. Bye J.W., Meliga S., Ferachou D., et al. *J. Phys. Chem. A*, **118**, 83 (2014).
32. Sushko O., Dubrovka R., Donnan R.S. *J. Chem. Phys.*, **142**, 055101 (2015).
33. Vinh N.Q., Allen S.J., Plaxco K.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8942 (2011).
34. Heyden M., Tobias D.J., Matyushov D.V. *J. Chem. Phys.*, **137**, 235103 (2012).
35. Friedlander M.A., Wu Y.C., Elgawish A., Monnier V.M. *J. Clin. Invest.*, **97** (3), 728 (1996).
36. Mernea M., Ionescu A., Vasile I., et al. *Opt. Quantum Electron.*, **47** (4), 1 (2015).
37. Ansari N.A., Mir M.A.R., Habib S., et al. *Cell Biochem. Biophys.*, **70** (2), 857 (2014).
38. Chellan P., Nagaraj R.H. *J. Biol. Chem.*, **276** (6), 3895 (2001).
39. Lou H.X., Yuan H.Q., Yamazaki Y., et al. *Planta Med.*, **67**, 345 (2001).