

УДК 541.64

## ТЕРМО- И pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛКАПРОЛАКТАМА И N-ВИНИЛИМИДАЗОЛА

© 2023 г. О. В. Вышиванная<sup>а,\*</sup>, Е. Р. Пархоменко<sup>б</sup>, А. И. Барабанова<sup>а</sup>, А. В. Ворожейкина<sup>а</sup>, Н. В. Гринберг<sup>а</sup>, Т. В. Бурова<sup>а</sup>, В. Я. Гринберг<sup>а</sup>, И. В. Благодатских<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук  
119334 Москва, Вавилова 28, стр. 1, Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Физический факультет  
119991 Москва, Ленинские горы 1, стр. 2, Россия

\*e-mail: vyshivannaya@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 11.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Свободнорадикальной сополимеризацией в массе синтезированы сополимеры N-винилкапролактама и N-винилимидазола (40–60 мол. %). Методами динамического и статического рассеяния света и высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии исследовано термочувствительное поведение водных растворов сополимеров в широкой области pH. При изменении pH среды от щелочного до кислого обнаружены три области термоиндуцированного конформационного поведения: I – область фазового расслоения, II – область конформационного перехода в состояние мезоглобул, III – область стабильного молекулярного раствора полиэлектролита. Для растворов сополимеров в отсутствие добавленной соли выявлены значительные полиэлектролитные эффекты, проявляющиеся в наличии быстрой и медленной диффузионных мод на распределениях по временам релаксации. Умеренное повышение ионной силы при добавлении низкомолекулярной соли приводит к экранированию полиэлектролитных эффектов, но не меняет принципиально набор областей конформационного поведения при разных pH. Существование различных типов термоиндуцированного конформационного поведения в разных областях pH объясняется изменением баланса между гидрофобными взаимодействиями звеньев N-винилкапролактама и электростатическими взаимодействиями слабоосновных звеньев N-винилимидазола.

DOI: 10.31857/S2308112023700505, EDN: MJWZBP

### ВВЕДЕНИЕ

Восприимчивые или “умные” полимеры, способные менять свою морфологию в ответ на различные внешние воздействия, такие как температура, pH среды, состав растворителя и другие, уже давно привлекают внимание ученых [1–3]. Среди них термочувствительные полимеры занимают особое место в связи с потенциальным практическим применением в качестве систем контролируемой доставки лекарственных препаратов или наноконтейнеров для химических или биохимических реакций [1–4]. Наиболее известными термочувствительными полимерами, обладающими нижней критической температурой растворения (НКТР), являются поли-N-изопропилакриламид (ПНИПА) и поли-N-винилкапролактама (ПВКЛ) [5–9]. Данные полимеры привлекательны тем, что их НКТР лежит в области физиологических температур. Преимуществом ПВКЛ по сравнению с ПНИПА является его низкая токсичность, что делает данный полимер биосовместимым

[10]. Введение ионизируемых звеньев в термочувствительный полимер позволяет придать получаемому сополимеру также pH-чувствительность, что может увеличивать спектр возможных практических применений [11, 12].

Термочувствительные сополимеры, содержащие звенья N-винилимидазола (ВИ), демонстрируют каталитическую активность в различных реакциях [13–19], что делает их весьма привлекательными объектами для исследования. В работах [13–15] показано, что при температурах выше НКТР термочувствительного компонента такие сополимеры могут либо подвергаться фазовому расслоению, либо образовывать глобулярные агрегаты. В последнем случае они проявляют повышенную каталитическую активность в эстеролизе амфифильного субстрата.

Существует немало публикаций, посвященных исследованию сополимеров N-винилкапролактама и N-винилимидазола (П(ВКЛ-co-ВИ)) [11–14, 16–22]. Среди них следует отметить рабо-

ты В.И. Лозинского и его коллег [19–22], в которых из сополимеров П(ВКЛ–*co*–ВИ), полученных радикальной полимеризацией в водных системах выше температур фазового перехода, были выделены “белковоподобные” фракции. Эти фракции не выпадали в осадок из водных растворов при нагревании, но претерпевали кооперативный переход клубок–глобула с образованием глобулярных агрегатов. Растворимая фракция П(ВКЛ–*co*–ВИ) в белковоподобной конформации показала повышенную каталитическую активность в эстеролизе *n*-нитрофенил пропионата [19]. Ранее нами двустадийной RAFT/MADIX-полимеризацией были синтезированы диблок-сополимеры (N-винилкапролактама) ВКЛ и ВИ и исследованы их термочувствительные и каталитические свойства [16, 17]. Было показано, что данные диблок-сополимеры образуют мицеллоподобные мезоглобулы в температурном интервале, предшествующем температуре фазового разделения. Кроме того, в указанном температурном диапазоне наблюдается существенное увеличение каталитической активности сополимеров в отношении гидролиза *n*-нитрофенил пропионата, обусловленное образованием высокоразвитых гидрофильно-гидрофобных границ раздела внутри мезоглобул.

ВИ является слабым основанием, поэтому конформации макромолекул его сополимеров могут изменяться под влиянием pH среды. Однако исследование двойной чувствительности (термо- и pH-) сополимеров ВИ мало описано до настоящего времени. В работе [11] показано влияние pH среды на температуры помутнения синтезированных радикальной сополимеризацией в метаноле статистических сополимеров ВИ (5–10 мол. %) с термочувствительным сомономером (НИПА, ВКЛ и N,N-диэтилакриламид). В. Wang и соавторы [12] синтезировали радикальной полимеризацией сополимеры ВИ и 2-(изобутирамид)-3-метилбутил метакрилата (<4 мол. %), исследовали зависимость температуры фазового разделения от pH и содержания звеньев 2-(изобутирамид)-3-метилбутил метакрилата, а также каталитическую активность сополимеров. Как видно, отмеченные работы посвящены сополимерам с низким содержанием либо термочувствительного компонента, либо звеньев ВИ.

Отметим, что исследования сополимеров ВКЛ и ВИ, синтезированных радикальной сополимеризацией в массе, до настоящего времени в литературе не описаны. Синтез в массе без применения растворителя активно используется в промышленности, поскольку не требует времени для удаления непрореагировавших мономеров. Кроме того, он относится к “зеленой” химии, так как не требует удаления и регенерации растворителя. Известно, что среда синтеза влияет на свойства полимеров [23], поэтому можно ожидать, что

синтез сополимеров П(ВКЛ–*co*–ВИ) в массе приведет к появлению особенностей как в молекулярной структуре, так и в стимулочувствительном поведении.

Таким образом, цель настоящей работы состояла в исследовании термо- и pH-индуцированного структурообразования сополимеров ВКЛ и ВИ, синтезированных радикальной сополимеризацией в массе, а также в изучении влияния молекулярных характеристик (состава, длины цепи) сополимеров и ионной силы раствора на их термо- и pH-чувствительное поведение. Содержание ВИ в составе сополимера изменяли от 40 до 60 мол. %, т.е. количество термо- и pH-чувствительных звеньев было приблизительно равным. Насколько нам известно, исследования двойной чувствительности сополимеров П(ВКЛ–*co*–ВИ), синтезированных радикальной полимеризацией и содержащих примерно равное количество термочувствительных звеньев и звеньев ВИ, ранее не проводились. Такие исследования представляют интерес с точки зрения биомедицинских приложений, например создание наноконтейнеров для доставки лекарств или наноконтейнеров для химических или биохимических реакций.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Материалы*

ВКЛ (98%) фирмы “Sigma-Aldrich” предварительно дважды очищали возгонкой при пониженном давлении. ВИ (≥99%) той же фирмы дважды перегоняли в вакууме. ДАК, любезно предоставленный химическим заводом акриловых полимеров “АКРИПОЛ” (Саратов, Россия), дважды перекристаллизовывали из метанола и сушили в вакууме до постоянного веса.

### *Синтез сополимеров П(ВКЛ–*co*–ВИ) и их характеристика*

Сополимеры ВКЛ и ВИ разного состава синтезировали свободнорадикальной сополимеризацией в массе. Реакцию проводили при 60°C в токе аргона при общей концентрации сомономеров [ВКЛ + ВИ] = 7.4 моль/л, в присутствии инициатора ДАК при [ДАК] =  $1.1 \times 10^{-2}$  моль/л. Полученные сополимеры очищали от непрореагировавших ВКЛ и ВИ диализом против воды в диализных мешках Spectra/Por®1 с пределом проницаемости по молекулярной массе  $(6-8) \times 10^3$  не менее 7 суток, а затем сушили лиофильно. Конверсию определяли гравиметрически.

Состав сополимера оценивали при помощи спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H записывали на спектрометре “Bruker Avance 600”, работающем на частоте 600.22 МГц (<sup>1</sup>H). В качестве растворителя использовали D<sub>2</sub>O. Точность опре-

**Таблица 1.** Состав и молекулярно-массовые характеристики сополимеров

Образец*	Состав исходной смеси		Выход, %	Состав сополимера		$M_n \times 10^{-5}$	$M_w \times 10^{-5}$	$D$
	[ВКЛ], мол. %	[ВИ], мол. %		[ВКЛ], мол. %	[ВИ], мол. %			
П(ВКЛ–co–ВИ) 55/45	85	15	7	55	45	1.6	4.51	2.81
П(ВКЛ–co–ВИ) 48/52	85	15	4	48	52	1.23	3.17	2.57
П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59	70	30	43	41	59	1.8	7.69	4.28
П(ВКЛ–co–ВИ) 40/60	70	30	17	40	60	2.14	5.03	2.35

\*Здесь и далее числа в названии образца отражают мольные доли звеньев ВКЛ и ВИ в сополимере (первое и второе число соответственно).

деления химических сдвигов не хуже 0.001 м.д. Состав сополимеров (мол. %) оценивали по интегральным интенсивностям трех протонов имидазольного цикла звеньев ВИ и одного протона группы –СН звеньев ВКЛ:

$$[ВИ] = \frac{H_{ВИ}}{3H_{ВКЛ} + H_{ВИ}} \times 100$$

$$[ВКЛ] = \frac{H_{ВКЛ}}{\frac{H_{ВИ}}{3} + H_{ВКЛ}} \times 100,$$

где  $H_{ВИ}$  и  $H_{ВКЛ}$  – интегральные интенсивности сигналов, характеризующих три протона имидазольной группы и один протон –СН– звеньев ВКЛ. Условия синтеза и состав сополимеров показаны в табл. 1. Спектры ЯМР  $^1H$  исследуемых сополимеров в  $D_2O$  и их описание приведены на рис. S1 в Дополнительных материалах.

Средние молекулярные массы и молекулярно-массовые распределения сополимеров определяли методом ГПХ относительно полистирола на хроматографе “Agilent 1200” с рефрактометрическим детектором и колонкой PLmixC. Элюентом служил 0.03 М раствор LiCl в N-метилпирролидоне, фильтрованный через мембрану Fluorogore 0.45 мкм и дегазированный; скорость потока 0.5 мл/мин, температура 50°C. Молекулярные массы  $M_w$  и  $M_n$  и коэффициент полидисперсности  $D = M_w/M_n$  сополимеров, определенные методом ГПХ, приведены в табл. 1.

*Статическое и динамическое рассеяние света*

Эксперименты по статическому и динамическому рассеянию света (СРС-ДРС) проводили с помощью прибора “PhotoCor Complex” (“PhotoCor Instruments”, Россия), снабженного He-Не-лазером ( $\lambda = 633$  нм, 10 мВт) и псевдо-кросс-корреляционной системой счета фотонов. Сополимеры П(ВКЛ–co–ВИ) исследовали в водной среде, нужное значение pH получали добавлением небольшого количества 0.1 М раствора NaOH или

0.1 М раствора уксусной кислоты. Образцы обезпывляли фильтрованием через мембранные фильтры Millex Durapore с размером пор 0.45 или 0.65 мкм. Температурные измерения выполняли при угле рассеяния 90° и скорости нагревания 0.33 град/мин. Перед измерением корреляционной функции образец выдерживали 5–10 мин для достижения равновесной температуры в измерительной ячейке. Температуру перехода  $T_{tr}$  определяли из зависимости интенсивности рассеянного света  $I$  от температуры как точку пересечения касательных в области начала резкого роста интенсивности. При выбранных температурах ниже и выше  $T_{tr}$  проводили измерения при углах рассеяния  $\theta$  от 30° до 140°. Распределения по времени релаксации  $\tau$  и гидродинамическому радиусу  $R_h$  получали, используя метод обратного преобразования Лапласа (метод CONTIN) [24]. Коэффициенты диффузии  $D$  находили из угловых зависимостей времени релаксации  $\tau$  в соответствии с соотношением  $D = 1/\tau q^2$ , где  $q = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2)$  – волновой вектор рассеяния,  $n$  – показатель преломления растворителя. Гидродинамические радиусы  $R_h$  рассчитывали из соотношения Стокса–Эйнштейна  $R_h = kT/6D\eta$ , в котором  $k$  – постоянная Больцмана,  $\eta$  – вязкость растворителя. Радиусы инерции  $R_g$  и кажущуюся молекулярную массу  $M^{app}$  определяли из угловых зависимостей интенсивности рассеянного света по соотношениям Зимма или Берри [25].

Инкременты показателя преломления  $dn/dc$  ПВКЛ и сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 измеряли при 25°C на рефрактометре “Wyatt/Optilab 903” (“Wyatt Technology Corporation”, США). Для сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 в водном растворе (pH 7.2), содержащем 30 мМ NaCl,  $dn/dc$  оказалось равным  $0.194 \pm 0.004$  мл/г, а для гомополимера ПВКЛ в воде –  $0.20 \pm 0.08$  мл/г. Видно, что значения  $dn/dc$  для сополимера и гомополимера совпадают в пределах погрешности. Известно, что инкремент показателя преломления для термочувствительных полимеров значительно изменяется с температурой. В работе [26] приве-

**Таблица 2.** Характеристики макромолекул и агрегатов сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 при разных температурах и рН, определенные методом СРС-ДРС

Условия	$T < T_{tr}$				$T > T_{tr}$			
	$R_h$ , нм	$R_g$ , нм	$R_g/R_h$	$M_w^{app}$	$R_h$ , нм	$R_g$ , нм	$R_g/R_h$	$M_w^{app}$
рН 9.8	43 ± 3	80 ± 8	1.86 ± 0.22	$7.1 \times 10^5$	—	—	—	—
рН 7.8	—	—	—	$4.4 \times 10^5$	87 ± 3	65 ± 3	0.75 ± 0.04	$4.3 \times 10^7$
рН 7.8 + 20 мМ NaCl	50 ± 3	87 ± 4	1.74 ± 0.13	$9.6 \times 10^5$	—	—	—	—
рН 6.7	—	—	—	$2.4 \times 10^5$	122 ± 7	88 ± 7	0.72 ± 0.07	$8.0 \times 10^5$
рН 6.7 + 20 мМ NaCl	47 ± 3	99 ± 4	2.11 ± 0.16	$8.6 \times 10^5$	129 ± 1	91 ± 5	0.71 ± 0.04	$4.7 \times 10^7$
рН 6.1	—	—	—	—	138 ± 4	183 ± 4	1.33 ± 0.05	$7.3 \times 10^5$
рН 5.5	—	—	—	$2.4 \times 10^5$	—	—	—	—
рН 5.5 + 30 мМ NaCl	45 ± 3	81 ± 4	1.80 ± 0.15	$7.3 \times 10^5$	91 ± 3	72 ± 4	0.79 ± 0.05	$2.3 \times 10^6$
рН 4.5	—	—	—	$1.6 \times 10^5$	—	—	—	$3.5 \times 10^5$
рН 4.5 + 30 мМ NaCl	48 ± 3	94 ± 4	1.96 ± 0.15	$7.7 \times 10^5$	49 ± 3	101 ± 5	2.06 ± 0.16	$7.8 \times 10^5$

дены следующие значения  $dn/dc$  для ПВКЛ: 0.181–0.186 при 20°C и 0.232 при 40°C. Сопоставление с литературными данными по  $dn/dc$  ПВКЛ при разных температурах показывает, что результаты нашего измерения хорошо укладываются на линейную температурную зависимость. Для качественной оценки кажущейся молекулярной массы  $M_w^{app}$  при температурах выше  $T_{tr}$  мы использовали литературное значение  $dn/dc$  0.232, а при температурах ниже  $T_{tr}$  – измеренную для сополимера величину 0.194. Диаграммы Зимма или Берри приведены на рис. S2 в Дополнительных материалах, а результаты измерений в табл. 2.

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия

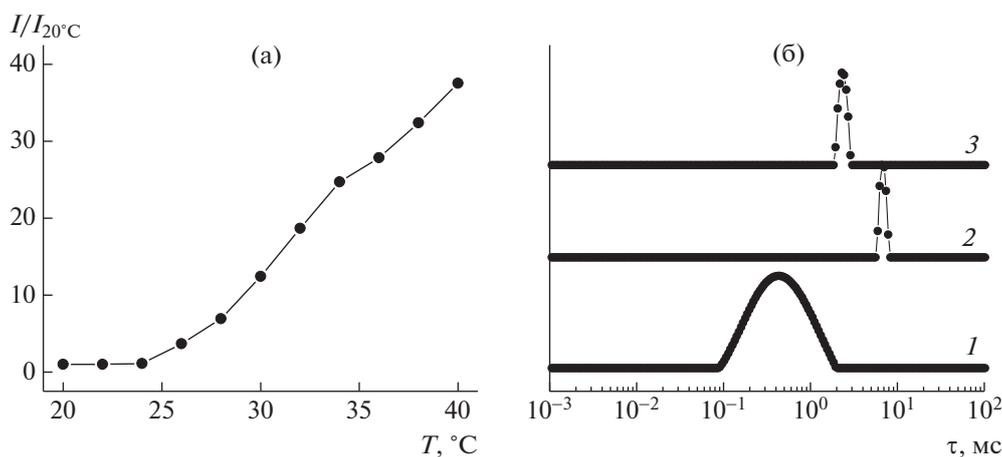
Калориметрические эксперименты проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре “ДАСМ-4” (Научно-производственное объединение “Биофизприбор”, Пушкино) в диапазоне температур от 10 до 110°C при скорости нагревания 2 град/мин. Концентрация сополимеров равна 5 мг/мл. Термограммы обрабатывали с помощью компьютерной программы Nairta (ИНЭОС РАН). Базовую линию термограмм определяли методом сплайн-интерполяции.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Термочувствительность синтезированных сополимеров ВКЛ и ВИ изучали методами статического и динамического рассеяния света в зависимости от рН. Наиболее подробно влияние рН среды на термоиндуцированное поведение в водном растворе исследовано на примере сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59, содержащего 41 и 59 мол. % ВКЛ и ВИ соответственно. Изменения интен-

сивности рассеянного света и распределения интенсивности рассеяния по временам релаксации исследованы при рН от 4.5 до 9.8 как в бессолевых растворах, так и в присутствии NaCl ( $c = 20$ – $30$  ммоль/л).

На рис. 1 представлены результаты измерений светорассеяния для водного бессолевого раствора данного сополимера в зависимости от температуры при рН 9.8. При температуре около 25°C начинается резкий рост интенсивности рассеянного света (рис. 1а), который сопровождается визуальным помутнением системы и быстрым расслоением на осадок и супернатант. Такое поведение характерно для термочувствительных полимеров с НКТР. Отождествим точку перегиба кривой интенсивности рассеяния с температурой перехода  $T_{tr}$ . На рис. 1б показаны распределения интенсивности рассеяния по временам релаксации при комнатной температуре и при  $T > T_{tr}$ . Гидродинамический радиус  $R_h$  частиц полимера при комнатной температуре составляет 43 нм (табл. 2). Кажущаяся молекулярная масса  $M_w^{app}$  близка к значению  $M_w$  исследуемого сополимера, определенному методом ГПХ относительно полистирола (табл. 2). Полученный из данных динамического рассеяния света гидродинамический радиус близок к значению  $R_h = 40$  нм для полистирола той же молекулярной массы в хорошем растворителе (ТГФ) [27]. Таким образом, наблюдаемый при комнатной температуре пик распределения по временам релаксации можно отнести к движению макромолекул. Из табл. 2 следует, что фактор асимметрии или фактор формы  $R_g/R_h$ , позволяющий судить об архитектуре частиц или макромолекул, примерно равен 1.9, что характерно для полидисперсного клубка [28]. Повышение темпе-



**Рис. 1.** Температурные зависимости относительной интенсивности рассеянного света (а) и распределения по времени релаксации при температуре 20 (1), 30 (2) и 40°C (3) (б) для водного бессолевой раствора сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 с концентрацией 0.5 мг/мл при рН 9.8. При  $T > 30^\circ\text{C}$  начинается выпадение осадка. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

ратуры выше  $T_{lr}$  приводит сначала к росту гидродинамического радиуса частиц примерно до 600 нм, а затем к уменьшению (рис. 1б, S3), одновременно на дне кюветы появляется видимый осадок, т.е. происходит фазовое расслоение. Итак, при щелочном рН, когда все слабоосновные звенья ВИ не заряжены, сополимер П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 ведет себя как обычный термочувствительный полимер с НКТР.

Перейдем к другому крайнему случаю – кислой среде (рН 4.5), в которой практически все звенья ВИ в составе сополимера являются заряженными. В этом случае при нагревании до 59°C бессолевой раствор сополимера П(ВКЛ–co–ВИ) 41/59 оставался прозрачным. Раствор характеризовался низкой интенсивностью рассеяния света ( $I_{90^\circ}$  приблизительно в 8 раз ниже, чем для раствора с рН 9.8), которая слабо менялась с температурой. Понижение интенсивности рассеяния является следствием полиэлектролитной природы макромолекул и обусловлено межчастичной интерференцией [29]:

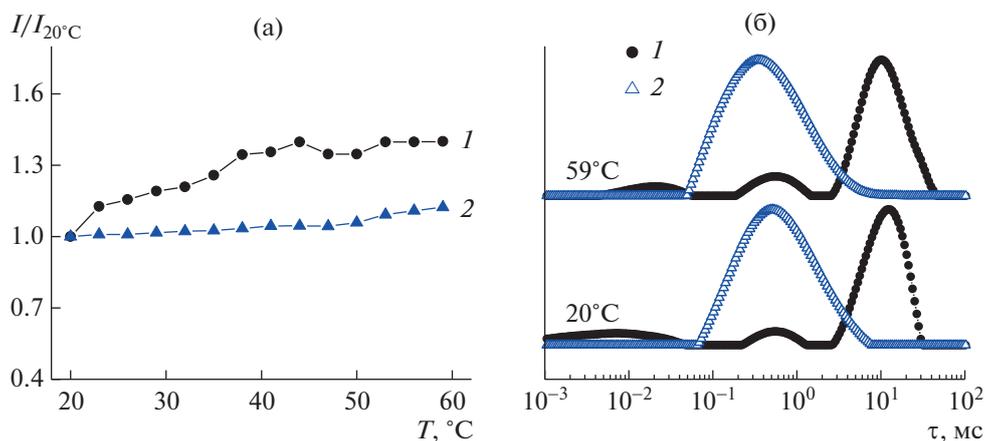
$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2Q(\theta)c + \dots,$$

где  $R_\theta$  – отношение Рэлея,  $c$  – концентрация раствора,  $P(\theta)$  – фактор рассеяния частиц,  $A_2$  – второй вириальный коэффициент,  $K = \frac{4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{N_A \lambda^4}$ ,  $n$  – показатель преломления,  $dn/dc$  – инкремент показателя преломления,  $\lambda$  – длина волны падающего света. Фактор интерференции  $Q(\theta)$  может несколько меняться с повышением температуры, как и инкремент показателя преломления. Вследствие этого рассчитанные кажущиеся молекуляр-

ные массы  $M^{app}$  при температурах как ниже, так и выше  $T_{lr}$  оказались заниженными (табл. 2), что согласуется с закономерностями, установленными ранее [30, 31].

На рис. 2б (нижняя кривая 1) показано, что распределение интенсивности рассеяния по времени релаксации при комнатной температуре является бимодальным. Распределение такого типа характерно для полиэлектролитов в бессолевых растворах. Оно неоднократно описывалось в работах других исследователей [32–37] и характеризуется как “полиэлектролитный эффект”. Быстрая мода относится к связанной диффузии, возникающей из-за взаимодействия полиион-противоион [32–34, 36, 37]. За короткое время каждая полимерная цепочка перемещается на небольшое расстояние, и диффузия противоионов заставляет заряженные фрагменты цепи диффундировать быстрее. Медленная мода с большими временами релаксации связана с самодиффузией центра масс отдельных полимерных цепей с учетом дальнедействующих электростатических взаимодействий с окружающими цепями. Другими словами, дальнедействующее электростатическое взаимодействие замедляет самодиффузию центра масс отдельной цепи [36, 37]. После нагревания образца до 59°C вид распределения по временам релаксации практически не изменился (рис. 2б, кривые 1).

Таким образом, в области кислых рН по данным СРС-ДРС не происходит никаких конформационных изменений, во всем исследованном диапазоне температур сополимер ведет себя как типичный полиэлектролит. Это связано с тем, что электростатическое поле от большого количества заряженных звеньев ВИ в составе сополимера не позволяет сформироваться специфиче-



**Рис. 2.** Температурные зависимости относительной интенсивности рассеянного света (а) и распределения по времени релаксации при температуре 20 и 59°C (б) для водного раствора сополимера П(ВКЛ–*co*–ВИ) 41/59 с концентрацией 0.5 мг/мл при рН 4.5 в отсутствие соли (1) и при добавлении 30 мМ NaCl (2).

ским гидратным оболочкам вокруг сегментов ВКЛ.

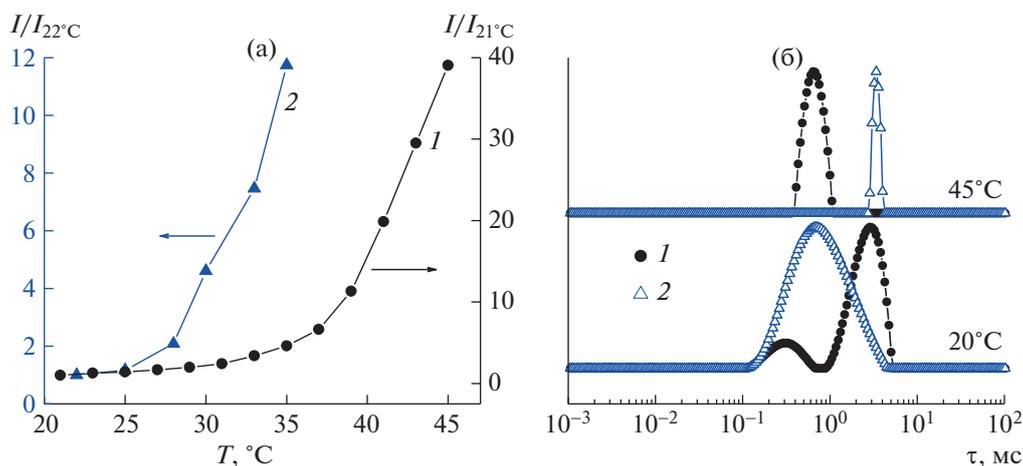
Для сравнения было проведено исследование температурных зависимостей интенсивности рассеяния света при том же рН в присутствии низкомолекулярной соли (30 и 50 мМ NaCl) для подавления полиэлектролитных эффектов. Из литературы известно, что добавление достаточного количества низкомолекулярной соли к разбавленному раствору полиэлектролита приводит к подавлению электростатического взаимодействия между зарядами на полимерной цепи, в результате чего полимер начинает вести себя так же, как незаряженная макромолекула, исчезает характерная бимодальность распределения интенсивности рассеяния по времени релаксации, и распределение может быть пересчитано в распределение по размеру стандартными методами [37]. Полученные результаты представлены на рис. 2 и рис. S4 в Дополнительных материалах. Унимодальность распределений в растворах, содержащих 30 и 50 мМ NaCl, при 20°C, а также рассчитанное из распределений среднее значение  $R_h = 48$  нм (табл. 2), близкое к размеру, измеренному при рН 9.8, свидетельствуют о подавлении полиэлектролитного эффекта уже при содержании NaCl 30 мМ. При повышении температуры интенсивность рассеяния и гидродинамический радиус оставались практически постоянными как при 30, так и при 50 мМ NaCl (рис. S1), и характеристики макромолекул  $R_h$ ,  $R_g$ ,  $R_g/R_h$  и  $M_w^{app}$  практически не изменялись при нагревании (рис. 2б, S4, табл. 2). Факторы асимметрии  $R_g/R_h$ , определенные как при комнатной, так и при повышенной температуре (табл. 2), свидетельствуют о том, что макромолекулы имеют форму клубка. Следовательно, как и в бессолевом растворе сополимера П(ВКЛ–*co*–ВИ) 41/59, при рН 4.5 при нагре-

вании не наблюдается конформационных изменений.

Итак, примерно равное содержание звеньев термочувствительного полимера (ПВКЛ) и ионогенных звеньев ВИ в сополимере приводит к тому, что в щелочной среде сополимер ведет себя как типичный термочувствительный полимер, а в кислой среде – как типичный полиэлектролит.

Рассмотрим теперь термоиндуцированное поведение сополимера при значениях рН, лежащих между этими двумя крайними случаями. На рис. 3 приведены температурные зависимости интенсивности рассеянного света и распределения по времени релаксации при температурах 20 и 45°C для рН 7.8. При данном рН как в отсутствие, так и в присутствии соли при нагревании наблюдается визуальное помутнение системы и резкий рост интенсивности рассеянного света выше  $T_{tr}$  (рис. 3а). Бессолевым опалесцирующий коллоидный раствор остается агрегативно устойчивым в течение как минимум 5 ч. Добавление соли приводит к значительному понижению температуры перехода (с 37 до 28°C) (рис. 3а) и существенному понижению агрегативной устойчивости, так что нагревание выше 35°C сопровождается выпадением осадка.

При комнатной температуре в бессолевом растворе, как и при рН 4.5, наблюдается бимодальное распределение, обусловленное полиэлектролитным эффектом (рис. 3б). Меньшее значение времени релаксации медленной моды отражает меньший вклад электростатического исключенного объема по сравнению с кислой средой из-за меньшей доли ионизированных звеньев ВИ. При этом значения  $M_w^{app}$  существенно занижены по сравнению с истинными (табл. 2), что также является характерным проявлением полиэлектролитного



**Рис. 3.** Температурные зависимости относительной интенсивности рассеянного света (а) и распределения по времени релаксации при температуре 20 и 45°C (б) для водного раствора сополимера П(ВКЛ–*co*–ВИ) 41/59 с концентрацией 0.5 мг/мл при pH 7.8 в отсутствие соли (1) и при добавлении 20 мМ NaCl (2). Для раствора, содержащего соль, при  $T = 35^\circ\text{C}$  начинается выпадение осадка.

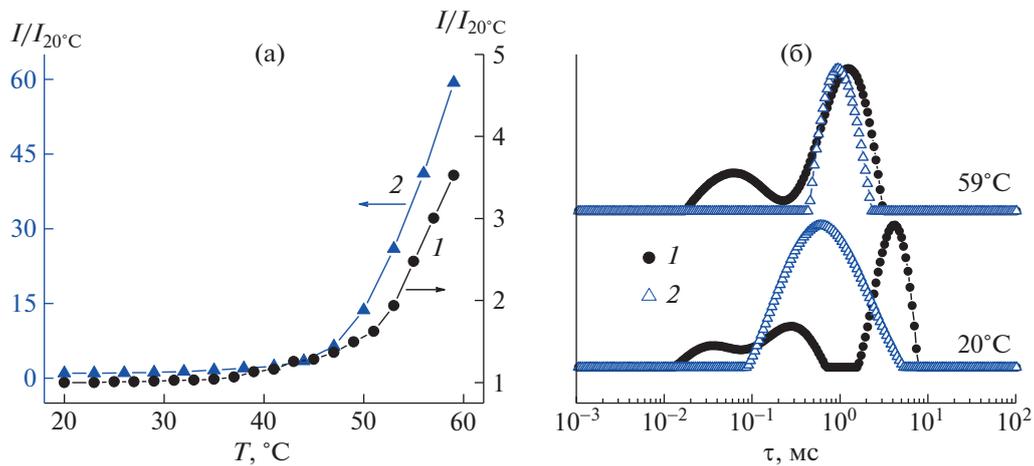
эффекта. Добавление 20 мМ NaCl позволило подавить данный эффект и получить унимодальное распределение и молекулярные характеристики  $M_w^{app}$ ,  $R_h$  и  $R_g$ , близкие к истинным, определенным в сильнощелочной среде (табл. 2).

При нагревании бессолевого раствора выше  $T_g$  распределение по временам релаксации становится унимодальным (рис. 3б), вычисленная кажущаяся молекулярная масса  $M_w^{app}$  на два порядка превышает истинную, а соотношение радиусов частиц  $R_g/R_h$  (табл. 2), близкое к теоретическому значению для твердой сферы (0.78), свидетельствует об агрегации с одновременной компактизацией за счет коллапса сегментов цепи, содержащих звенья ВКЛ. Таким образом, при pH 7.8 термоиндуцированные перестройки в бессолевых системах можно идентифицировать как переход типа клубок–глобула. В литературе подобные плотные сферические коллоидно устойчивые агрегаты термочувствительных полимеров принято называть мезоглобулами [16, 25, 29].

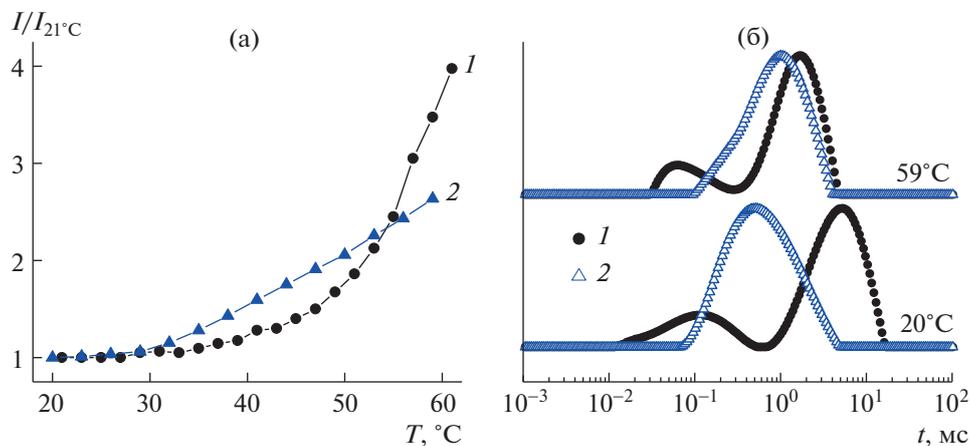
Температурное поведение растворов П(ВКЛ–*co*–ВИ) 41/59 при более низком pH (6.7) представлено на рис. 4 как для бессолевого раствора, так и для раствора, содержащего 20 мМ NaCl. Раствор, содержащий соль, при нагревании выше 48°C мутнеет, происходит резкий рост интенсивности рассеянного света и агрегация, которая проявляется в увеличении размера частиц в 2.7 раза и кажущейся молекулярной массы  $M_w^{app}$  на два порядка (рис. 4, кривые 2; табл. 2). По структуре агрегаты при высокой температуре близки к твердым сферам, как видно из значения фактора асимметрии (табл. 2), и они агрегативно устойчивы в течение как минимум 2 часов.

Бессолевой раствор остается прозрачным при нагревании, однако наблюдается заметное увеличение интенсивности рассеянного света (в 3.5 раза от 20 до 59°C), имеющее точку перегиба около 50°C (рис. 4а, кривая 1). Распределение по времени релаксации остается бимодальным при всех температурах, причем время релаксации медленной моды заметно уменьшается с ростом температуры (рис. 4б, кривые 1). При температуре 59°C мы оценили кажущиеся значения  $M_w^{app}$  для медленной моды (табл. 2), которые оказались того же порядка, что и истинные, но несколько ниже, а также отношение  $R_g/R_h$  (0.72). Учитывая наличие быстрой моды с меньшим временем релаксации, чем у молекулярного раствора, содержащего соль, можно ожидать, что значение  $M_w^{app}$ , скорее всего, занижено вследствие полиэлектролитного эффекта, а полученные размеры и фактор асимметрии соответствуют мицеллярным агрегатам с заряженной короной, которые можно отнести к мезоглобулам. Таким образом, можно сделать вывод, что при pH 6.7 как в бессолевом растворе, так и в присутствии соли наблюдается переход типа клубок–глобула с образованием мезоглобул.

Если перейти к еще более кислой среде (pH 5.5), то можно увидеть (рис. 5), что поведение бессолевого раствора сополимера похоже на наблюдаемое при pH 6.7. Однако поведение системы в присутствии соли отличается от такового при pH 6.7. Для раствора с солью выше 31°C происходит постепенный медленный рост интенсивности и гидродинамического радиуса частиц (рис. 5), причем раствор сополимера остается прозрачным. При температуре 59°C кажущаяся молекулярная масса  $M_w^{app}$  становится выше в несколько раз, а значение  $R_g/R_h$  составляет 0.79, что харак-



**Рис. 4.** Температурные зависимости относительной интенсивности рассеянного света (а) и распределения по времени релаксации при температуре 20 и 59  $^\circ\text{C}$  (б) для водного раствора сополимера П(ВКЛ-*co*-ВИ) 41/59 с концентрацией 0.5 мг/мл при рН 6.7 в отсутствие соли (1) и при добавлении 20 мМ NaCl (2).

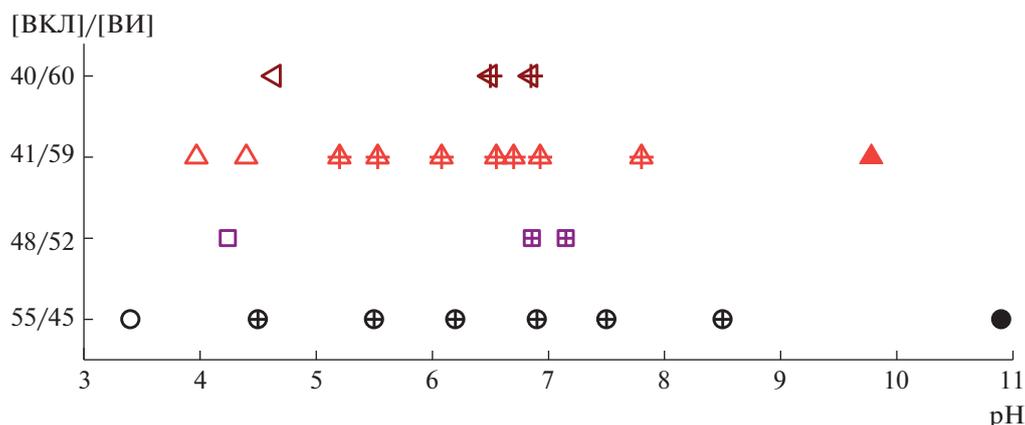


**Рис. 5.** Температурные зависимости относительной интенсивности рассеянного света (а) и распределения по времени релаксации при температуре 20 и 59  $^\circ\text{C}$  (б) для водного раствора сополимера П(ВКЛ-*co*-ВИ) 41/59 с концентрацией 0.5 мг/мл при рН 5.5 в отсутствие соли (1) и при добавлении 30 мМ NaCl (2).

терно для твердой сферы (табл. 2), т.е. в результате коллапса звеньев ВКЛ образуются относительно плотные сферические агрегаты. Последние не изменяют своих размеров в течение как минимум нескольких часов. Таким образом, в солевом растворе при рН 5.5 сополимер образует мезоглобулы, подобные полученным в бессолевой системе при рН 6.7, где добавление соли приводило к более сильной степени агрегации (табл. 2). Аналогичный процесс образования мезоглобул с ростом температуры происходит, по-видимому, и в бессолевой системе, однако на него накладываются полиэлектролитные эффекты, подобно тем, что рассмотрены выше при рН 6.7.

Подводя итог изложенному выше, можно сказать, что для сополимера П(ВКЛ-*co*-ВИ) 41/59 при изменении рН среды от щелочного до кисло-

го обнаружены три области термоиндуцированного конформационного поведения: I – область фазового расслоения, II – область конформационного перехода в состояние мезоглобул, III – область стабильного молекулярного раствора полиэлектролита. В области I наблюдается резкий рост интенсивности рассеянного света при температуре перехода  $T_p$  и агрегации макромолекул с последующим фазовым расслоением, типичная для полимеров с НКТР. В области II нагревание растворов сополимера приводит к заметному росту интенсивности и образованию агрегативно устойчивого раствора мезоглобул, причем растворы могут либо оставаться прозрачными, либо становиться опалесцирующими. В области III нет никаких существенных изменений ни в интенсивности рассеяния, ни в распределениях по вре-



**Рис. 6.** Схема различных типов термоиндуцированного поведения бессолевого раствора сополимеров П(ВКЛ-co-ВИ) разного состава ( $c = 0.5$  мг/мл) в зависимости от pH: темные точки – фазовое разделение (I), заштрихованные точки – конформационный переход в состояние мезоглобул (II), светлые точки – стабильный молекулярный раствор полиэлектролита (III).

мени релаксации, сополимер ведет себя как типичный слабый полиэлектролит.

На рис. 6 схематически просуммированы проведенные при разных pH опыты для бессолевого раствора сополимера П(ВКЛ-co-ВИ) 41/59. Видно, что условная граница между областями I и II находится где-то около pH 7.8, а граница между областями II и III – в районе pH 5.0. Интересно, что значение pH, отвечающее переходу между областями I и II, близко к  $pK_a$  винилимидазола (7.52 [38]), а также к  $pK_a$  его гомополимера (6.0 [39, 40]) и сополимеров ВКЛ и ВИ (например, для сополимера П(ВКЛ-co-ВИ) 90/5, синтезированного радикальной сополимеризацией в метаноле, в работе [11] определено  $pK_a$  6.7).

Характер влияния pH на тип конформационного поведения сополимера при нагревании сохраняется и при повышении концентрации сополимера П(ВКЛ-co-ВИ) 41/59 вплоть до 5 мг/мл. На рис. S5 в Дополнительных материалах в качестве примера показаны изменения интенсивности рассеянного света при нагревании для разных pH, отражающие формирование стабильного опалесцирующего раствора мезоглобул (pH 7.6), прозрачного раствора мезоглобул (pH 6.5) и молекулярного раствора полиэлектролита (pH 4.4).

Выявленная в нашей работе область II является переходной, в ней баланс электростатических взаимодействий полимерных цепей и гидрофобного взаимодействия звеньев ВКЛ, усиливающегося при нагревании, приводит к компактизации цепи за счет коллапса звеньев ВКЛ и ограниченной агрегации с образованием устойчивого раствора мезоглобул.

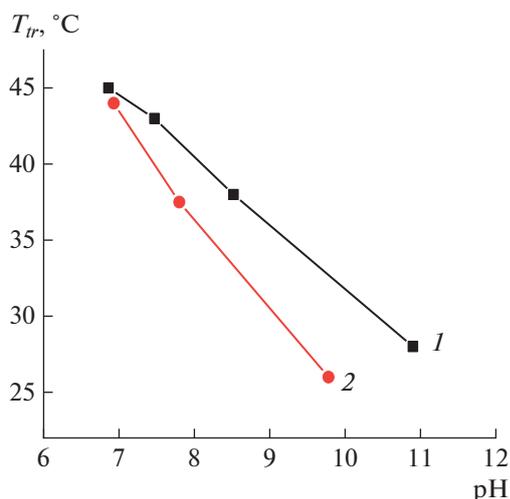
Дополнительно были исследованы три сополимера, содержащие от 40 до 60 мол. % ВИ (табл. 1). Изменения интенсивности рассеянного света с

температурой при концентрации сополимера 0.5 мг/мл показаны на рис. S6 в Дополнительных материалах. Для бессолевого раствора всех изученных сополимеров были обнаружены те же самые три типа конформационного поведения. Значения pH, при которых наблюдался конкретный тип конформационного поведения, приведены схематически на рис. 6.

Сравнивая сополимеры П(ВКЛ-co-ВИ) 41/59 и П(ВКЛ-co-ВИ) 55/45, видно, что граница между областями II и III при переходе к сополимеру П(ВКЛ-co-ВИ) 55/45 сдвигается в диапазон более кислых pH, что, по-видимому, можно объяснить уменьшением содержания ионогенных групп ВИ в составе сополимера.

Влияние длины цепи и содержания звеньев ВИ можно также проследить на зависимости температуры перехода от pH. Из рис. 7 следует, что сополимер, содержащий 59% звеньев ВИ, несмотря на более низкое содержание звеньев ВКЛ, при всех  $pH > 7$  имеет более низкие  $T_{tr}$ . При этом он демонстрирует более сильную зависимость от pH. Такое поведение объясняется влиянием двух факторов: наклон зависимости определяется содержанием pH-чувствительных звеньев ВИ, а снижение  $T_{tr}$  по сравнению с  $T_{tr}$  сополимера П(ВКЛ-co-ВИ) 55/45 – преобладающим влиянием более высокой молекулярной массы данного сополимера по сравнению с влиянием состава.

Резюмируя результаты, полученные методом СРС-ДРС, можно заключить, что все исследованные сополимеры с содержанием звеньев ВКЛ  $50 \pm 10\%$  демонстрируют двойную термо- и pH чувствительность. Термоиндуцированное поведение зависит от pH и изменяется при переходе от щелочной к кислой среде от фазового расслоения, характерного для полимеров с НКТР, до типичного поведения молекулярных растворов

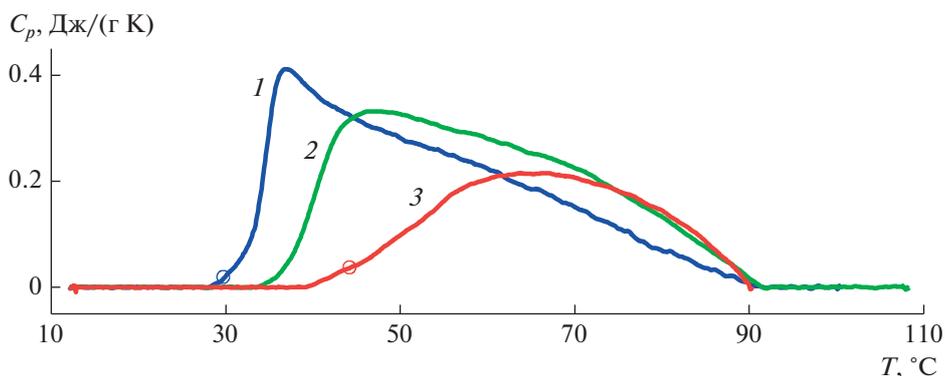


**Рис. 7.** Зависимость температуры перехода от рН для бессолевых водных растворов сополимеров П(ВКЛ–со–ВИ) 55/45 (1) и П(ВКЛ–со–ВИ) 41/59 (2).  $c = 0.5$  мг/мл.

полиэлектролитных цепей. Особый тип термоиндуцированного поведения, а именно, конформационный переход с образованием мезоглобул проявляется для всех исследованных сополимеров вблизи нейтральных рН, т.е. вблизи  $pK_a$  слабоосновных звеньев ВИ. Границы между этими областями чувствительны как к составу сополимера, так и к его молекулярной массе, а также к ионной силе раствора. Тем не менее, сам факт проявления данного типа термочувствительности, приводящего к образованию устойчивого раствора мезоглобул, обнаружен как в бессолевых разбавленных растворах, так и в присутствии минимального количества соли во всем изученном диапазоне концентраций сополимера. На основании предварительных данных [41] о зависимости состава сополимера от степени конверсии

можно предположить, что использованный в работе метод синтеза радикальной полимеризацией в массе приводит к формированию микроблочной структуры полимерной цепи, в результате чего происходит тонкое изменение баланса явлений гидрофобной гидратации и полиэлектролитных эффектов при изменении рН. Закономерности сополимеризации и молекулярная структура сополимеров являются темой отдельного исследования.

Дополнительную информацию о температурных превращениях позволяет получить высокочувствительная ДСК. Известно, что фазовое расщепление термочувствительных полимеров сопровождается поглощением тепла в результате плавления упорядоченной структуры воды кристаллогидратного типа. При переходе типа клубок–глобула для “белковоподобной” фракции сополимера П(ВКЛ–ВИ) также наблюдали эндотермические пики на кривых избыточной теплоемкости, но более размытые и характеризующиеся меньшей энтальпией перехода [21, 22]. В связи с этим мы провели исследования водного бессолевого раствора сополимера П(ВКЛ–со–ВИ) 41/59 при разных значениях рН методом высокочувствительной ДСК. Результаты данных исследований представлены на рис. 8 в виде функций избыточной теплоемкости. Видно, что все приведенные функции избыточной теплоемкости проходят через максимум, который сдвигается в область более высоких температур и уменьшается по амплитуде при понижении рН раствора. Кроме того, все калориметрические пики весьма размыты, что свидетельствует о невысокой кооперативности переходов, обусловленной, по видимому, достаточно малой длиной термочувствительных микроблоков ВКЛ. Температуры конформационного перехода при рН 7.7 и 6.5, определенные по точке перегиба зависимости интенсивности рассеянного света от температуры



**Рис. 8.** Функции избыточной теплоемкости бессолевого водного раствора сополимера П(ВКЛ–со–ВИ) 41/59 ( $c = 5$  мг/мл) при рН 7.7 (1), 7.1 (2) и 6.5 (3). Точками отмечены температуры помутнения или конформационного перехода согласно данным СРС–ДРС.

(рис. S5), соответствуют началу пиков теплоемкости. Результаты ДСК подтверждают наличие конформационного перехода в области II. Калориметрическое исследование сополимера П(ВКЛ-co-ВИ) 41/59 при pH 4.5 показало, что сополимер действительно не претерпевает никаких кооперативных конформационных изменений при нагревании до 70°C (данные не приведены). Таким образом, данные, полученные методами СРС-ДРС и ДСК, хорошо согласуются между собой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Серия сополимеров ВКЛ и ВИ, содержащих от 40 до 60 мол. % ВИ, синтезирована радикальной сополимеризацией в массе. Методами динамического и статического рассеяния света исследовано термо- и pH-индуцированное поведение сополимеров П(ВКЛ-co-ВИ). Для всех исследованных сополимеров при изменении pH среды от щелочного до кислого обнаружены три области термоиндуцированного конформационного поведения: I – область фазового расслоения, II – область конформационного перехода в состояние мезоглобул, III – область стабильного молекулярного раствора полиэлектролита. Существование разных типов термоиндуцированного конформационного поведения в различных областях pH объясняется изменением баланса между гидрофобными взаимодействиями звеньев ВКЛ и электростатическими взаимодействиями между заряженными звеньями ВИ.

Обнаружено, что значительное содержание ионогенных звеньев ВИ (порядка  $50 \pm 10$  мол. %) в условиях низкой ионной силы в отсутствие добавленной соли в широкой области pH приводит к существенно выраженным полиэлектролитным эффектам, проявляющимся, в частности, в бимодальности распределений по временам релаксации, которые отражают взаимодействия полиион-противоион и дальнедействующие электростатические взаимодействия между цепями.

Умеренное повышение ионной силы при добавлении соли не меняет принципиально набор областей конформационного поведения при разных pH, однако приводит к сдвигу границы между областями I и II в сторону более кислых pH. Показано, что в области II переход типа клубок-глобула способствует образованию мезоглобул, имеющих структуру жесткой сферы.

Результаты ДСК подтверждают наличие конформационного перехода в области II и отсутствие конформационных изменений в области III. Тот факт, что наблюдаемые калориметрические пики весьма размыты, свидетельствует о низкой кооперативности переходов, что, по-видимому,

обусловлено достаточно малой длиной термочувствительных микроблоков ВКЛ.

Выявленный в работе конформационный переход в состояние мезоглобул в области pH, близких к физиологическим значениям, позволяет считать исследованные нетоксичные и биосовместимые сополимеры, синтезированные достаточно простым способом, перспективными для создания на их основе каталитических систем для биомедицинского применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание № 075-00697-22-00).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gore S.A., Gholve S.B., Savalsure S.M., Ghodake K.B., Bhushure O.G., Thakare V.M. // Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res. 2017. V. 8. № 3. P. 298.
2. Smart Polymers and their Applications / Ed. by M.R. Aguilar, J.S. Román Woodhead Publ., 2014.
3. Chatterjee S., Hui P.C. // Molecules. 2019. V. 24. № 14. P. 2547.
4. Kyritsis A., Laschewsky A., Papadakis C.M. // Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems / Ed. by C. Demetzos, N. Pippa Singapore: Springer, 2019. P. 397.
5. Schild H.G. // Prog. Polym. Sci. 1992. V. 17. P. 163.
6. Lanzalaco S., Armelin E. // Gels. 2017. V. 3. № 4. P. 36.
7. Lau A.C.W., Wu Ch. // Macromolecules. 1999. V. 32. № 3. P. 581.
8. Makhaeva E.E., Tenhu H., Khokhlov A.R. // Macromolecules. 1998. V. 31. № 9. P. 6112.
9. Kozlovskaya V., Kharlampieva E. // ACS Appl. Polym. Mater. 2020. V. 2. P. 26.
10. Vihola H., Laukkanen A., Valtola L., Tenhu H., Hirvonen J. // Biomaterials. 2005. V. 26. P. 3055.
11. Maeda Y., Yamamoto H., Ikeda I. // Langmuir. 2001. V. 17. P. 6855.
12. Wang B., Liu H.J., Jiang T.T., Li Q.H., Chen Y. // Polymer. 2014. V. 55. P. 6036.
13. Okhapkin I.M., Bronstein L.M., Makhaeva E.E., Matveeva V.G., Sulman E.M., Sulman M.G., Khokhlov A.R. // Macromolecules. 2004. V. 37. P. 7879.
14. Okhapkin I.M., Makhaeva E.E., Khokhlov A.R. // Adv. Polym. Sci. 2006. V. 195. P. 177.
15. Ge Z.S., Xie D., Chen D.Y., Jiang X.Z., Zhang Y.F., Liu H.W., Liu S.Y. // Macromolecules. V. 40. P. 3538.
16. Barabanova A.I., Blagodatskikh I.V., Vyshivannaya O.V., Muranov A.V., Peregodov A.S., Khokhlov A.R. // Polymer Science A. 2021. V. 63. № 4. P. 382.
17. Barabanova A.I., Blagodatskikh I.V., Vyshivannaya O.V., Klimova T.P., Grinberg N.V., Burova T.V., Muranov A.V., Lozinskii V.I., Grinberg V.Ya., Peregodov A.S., Khokhlov A.R. // Dokl. Chem. 2015. V. 465. № 1. P. 253.
18. Mitrofanov A.Yu., Murashkina A.V., Barabanova A.I., Vorozheikina A.V., Zubavichus Ya.V., Khokhlov A.R., Beletskaya I.P. // Molec. Catal. 2023. V. 541. P. 112915.

19. *Lozinskii V.I., Simenel I.A., Khokhlov A.R.* // Dokl. Chem. 2006. V. 410. P. 170.
20. *Lozinskii V.I., Simenel I.A., Kurskaya E.A., Kulakova V.K., Grinberg V.Y., Dubovik A.S., Galaev I.Y., Mattiasson B., Khokhlov A.R.* // Dokl. Chem. 2000. V. 375. P. 273.
21. *Lozinsky V.I., Simenel I.A., Kulakova V.K., Kurskaya E.A., Babushkina T.A., Klimova T.P.* // Macromolecules. 2003. V. 36. P. 7308.
22. *Lozinsky V.I., Simenel A., Semenova M.G., Belyakova L.E., Il'in M.M., Grinberg V.Y., Dubovik A.S., Khokhlov A.R.* // Polymer Science A. 2006. V. 48. № 4. P. 435.
23. *Odian G.* Principles of Polymerization. New York: Wiley-Interscience, 2004.
24. *Provencher S.W.* // Comput. Phys. Commun. 1982. V. 27. P. 229.
25. Light Scattering from Polymer Solutions / Ed. by *M.B. Huglin*. London; New York: Acad. Press, 1972.
26. *Aseyev V., Hietala S., Laukkanen A., Nuopponen M., Confortini O., Du Prez F.E., Tenhu H.* // Polymer. 2005. V. 46. P. 7118.
27. *Yau W.W., Kirkland J.J., Bly D.D.* Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography. New York: Wiley, 1979. P. 46.
28. *Burchard W.* // Adv. Polym. Sci. 1999. V. 143. P. 113.
29. *Bodcomb J., Hara M.* // Macromolecules. 1994. V. 27. № 25. P. 7369.
30. *Sedlac M.* // Physical Chemistry of Polyelectrolytes / Ed. by *T. Radeva*. Boca Raton: CRC Press, 2001.
31. *Dawson K.A., Gorelov A.V., Timoshenko E.G., Kuznetsov Y.A., Du Chesne A.* // Physica A. 1997. V. 244. P. 68.
32. *Lin S.C., Lee W.I., Schurr J.M.* // Biopolymers. 1978. V. 17. P. 1041.
33. *Bodycomb J., Hara M.* // Macromolecules. 1995. V. 28. P. 8190.
34. *Ermi B.D., Amis E.J.* // Macromolecules. 1996. V. 29. P. 2701.
35. *Cong R., Temyanko E., Russo P.S., Edwin N., Uppu R.M.* // Macromolecules. 2006. V. 39. P. 731.
36. *Zhou K.J., Li J.F., Lu Y.J., Zhang G.Z., Wu C.* // Macromolecules. 2009. V. 42. P. 7146.
37. *Li J., Ngai T., Wu Ch.* // Polym. J. 2010. V. 42. P. 609.
38. <https://xumuk.ru/encyklopedia/732.html>
39. *Gorjian H., Fahim H., Ghaffary Khaligh N.* // Turk. J. Chem. 2021. V. 45. P. 2007.
40. *Feng W., Gu W., Zhang L., Tantai, Jiang B., Yang H., Zhang H.* // Transactions of Tianjin University. 2019. V. 25. P. 226.
41. *Vorozheikina A.V., Barabanova A.I., Khokhlov A.R.* // Abstrs 7 Congress of Federation of Asian Polymer Societies FAPS2021. Vladivostok–Moscow, Russia, 2021. P. 60.