

# 糖残基を側鎖に有する高分子電解質と界面活性剤からなる 両親媒性高分子複合体の構築\*

板屋 智之\*\*

## Formation of Amphiphilic Complexes of Cationic Polyelectrolyte Carrying Pendant Saccharide Residue with Anionic Surfactants

Tomoyuki ITAYA

The formation of amphiphilic complexes of poly(allylammonium) chloride carrying pendant maltose residue (PAAHCl-Mal) with sodium alkylsulfonates (sodium octanesulfonate(NaOcS), sodium dodecanesulfonate(NaDoS), sodium hexadecanesulfonate(NaHeDeS)) in aqueous solution was studied by means of turbidimetry, fluorescence spectroscopy using pyrene,  $^1\text{H}$  NMR and viscometry. In contrast to the complex of PAAHCl homopolymer with NaDoS, which precipitated at the ratio of the concentration of DoS to the concentration of ammonium group in the polymer,  $[\text{DoS}]/[\text{NH}_3^+] = 0.01$ , the complexes of PAAHCl-Mal(14) containing 14 mol % maltose residue with NaDoS are water-soluble over the whole range of compositions of the mixture, including the electroneutralized condition,  $[\text{DoS}]/[\text{NH}_3^+] = 1$ . In the mixture of PAAHCl-Mal(14) and NaDoS at  $[\text{DoS}]/[\text{NH}_3^+] = 1$ , the  $I_3/I_1$  ratio of the intensities of third and first vibrational bands for pyrene was 0.83, indicating that the complexation of PAAHCl-Mal(14) with NaDoS gives rise to a hydrophobic domain. In addition to these results, from  $^1\text{H}$  NMR and viscosity measurements of the PAAHCl-Mal(14) and NaDoS system, it seems that these species form a micelle like aggregate with a hydrophobic core from the surfactants bound to the polymer and a hydrophilic outer shell from the maltose residues. Moreover, the effects of content of maltose residue in the polymer and alkyl chain length of surfactant on the complexation of PAAHCl-Mal with alkylsulfonates are discussed.

キーワード: polyelectrolyte, anionic surfactant, amphiphilic polyelectrolyte-surfactant aggregate

### 1. まえがき

分子内に多数のイオン基を持つ高分子電解質は周辺に強い電場をつくり出し、対イオンと強い静電的相互作用を行う。対イオンが界面活性剤イオンの場合には、静電的相互作用に加えて、界面活性剤イオン同士の疎水性相互作用のためにミセルに類似した高分子複合体を形成する<sup>1-3)</sup>。このような高分子電解質-界面活性剤系は、基礎、応用の両面から極めて興味ある対象であり、特にその乳化、分散機能によりトイレットリ-分野において利用されている。最近では、高分子電解質-界面活性剤系が作り出す局所的な疎水場に注目が集まり、分離剤や薬物担体としての利

用も試みられている<sup>4-6)</sup>。しかしながら、高分子電解質-界面活性剤複合体の多くは水に不溶であり、このことが高分子電解質-界面活性剤複合体を水溶液系で利用・応用することを妨げている。

近年、水溶性のポリエチレンオキシド鎖を側鎖に有するカチオン性ポリエチレンイミンと陰イオン界面活性剤であるアルキル硫酸イオンから水溶性の高分子複合体が形成されることが報告された<sup>7)</sup>。ポリエチレンオキシド鎖は高分子複合体に水溶性を付与するだけではなく、非常に優れた生体親和性を有することから、この高分子電解質-界面活性剤複合体はドラッグデリバリーシステムへの応用も期待されている。

一方、糖鎖は細胞膜中での物質認識・情報伝達に重要な役割を果たしていることから、側鎖にオリゴ糖鎖を有するポリペプチド、多糖、およびビニル系的高分子が関心を集めて、活発な研究が展開されてい

\* 本論文の主な部分は学術雑誌“POLYMER”43巻 (No.8) pp. 2255-2260に掲載されている。

\*\* 一般科助教授

原稿受付 2002年5月17日

る<sup>8-13)</sup>。もし、側鎖に糖鎖を有する高分子電解質が界面活性剤イオンと複合体を形成する場合、その複合体は水溶性であることが予想されるだけでなく、糖鎖の細胞認識性から、ある細胞だけを標的としたドラッグデリバリーシステムへの応用が期待できる。

本研究では、高分子電解質として、第一級アミノ基を有するポリアリルアミン塩酸塩(PAAHCl)を用い、まず、そのアミノ基の反応性を利用して側鎖にマルトース基を有するカチオン性高分子電解質(PAAHCl-Mal)の合成を行った。さらに、疎水場を有し、なおかつ親水部として糖残基を有する水溶性高分子電解質-界面活性剤複合体を構築することを目的として、PAAHCl-Mal とアルキルスルホン酸イオンとの高分子複合体形成を濁度、蛍光、NMR、粘度測定から検討した。

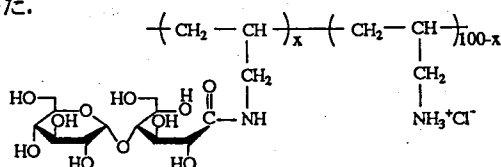


Figure 1. Chemical structure of PAAHCl-Mal.

## 2. 実験

### 2-1 試料

ポリアリルアミン塩酸塩(PAAHCl)は日紡績(株)から購入したものを、水/0.5 M の HCl を含むメタノール系で再沈澱を行い精製した。この PAAHCl の重量平均分子量  $M_w$  は 0.2 M の NaCl 水溶液中での光散乱測定より、 $1.0 \times 10^5$  と決定した<sup>14)</sup>。PAAHCl へのマルトースの導入は Zhag らの方法<sup>15)</sup>を参考にし、以下のように行った。PAAHCl (1.0 g) のホルムアミド (40 mL) 溶液にまず、ポリマー中のアミノ基に対して等モル量の NaOH を加え、その後、マルトースラク톤を滴下し、さらに 40 °C で 24 時間反応させた。このとき、マルトース導入量の異なるポリマーを得るために、ポリマー中のアミノ基に対するマルトースラク톤のモル比(1/5, 1/2)を変化させた。その後、水を用いて透析を行い、濃縮後、再度 0.5 M HCl 酸性メタノールを用いて再沈澱を行い、さらに、真空乾燥することにより、ポリマー(PAAHCl-Mal)を得た。ポリマーの <sup>1</sup>H NMR スペクトルには、8.40 ppm にアミド基の存在を示すピークが観測され、PAAHCl へのマルトース基の導入が確認された。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 80°C) スペクトルから、PAAHCl へのマルトース基導入量を求めたところ、6 mol % と 14 mol % であった。ここでは、これらポリマーをそれ

ぞれ PAAHCl-Mal(6), PAAHCl-Mal(14) として表す (Figure 1)。PAAHCl (in 0.050 M) に提出された粘度式<sup>16)</sup>  $[\eta] = 2.40 \times 10^{-3} \cdot M^{0.975}$  より見積もった PAAHCl-Mal(6), PAAHCl-Mal(14) の分子量はそれぞれ、 $9.2 \times 10^4$  と  $8.5 \times 10^4$  であった。

### 2-2 測定

濁度として、450 nm の光の透過率を Shimadzu UV-260 可視・紫外分光光度計を用いて測定した。蛍光スペクトルは、Shimadzu RF-5000 蛍光分光光度計を用いて測定を行った。蛍光スペクトル測定用の試料は蛍光プローブであるピレンの濃度が  $1 \times 10^{-6}$  M になるように調整し、325 nm の光で励起して測定を行った。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子 JEOL EX-400 (400 MHz) システムを用いて測定し、テトラメチルシランを外部基準として用いた。粘度測定は、改良ウベローデ型粘度計を用いて 30°C で行った。

## 3. 結果・考察

### 3-1 PAAHCl-Mal と NaDoS との高分子複合体形成

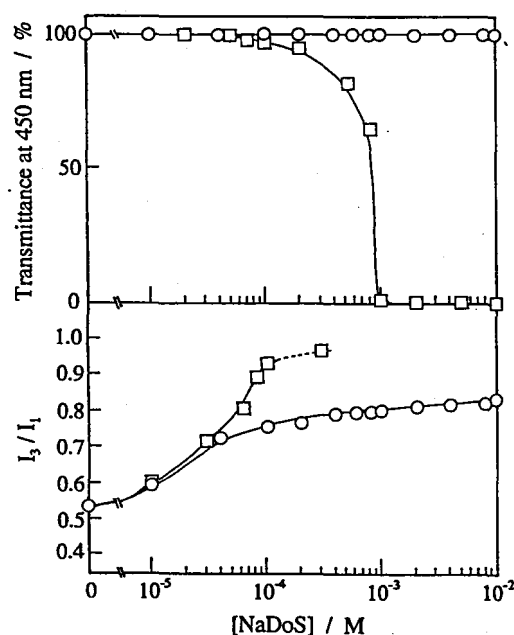
高分子と界面活性剤との複合体形成を検出するには、蛍光プローブ法が非常に有効である<sup>17-19)</sup>。その中でも、ピレンは蛍光プローブとしてよく用いられ、その蛍光スペクトルに観測される主な 5 つの振動バンドの中で、低波長側から 3 番目と 1 番目のピーク強度比 ( $I_3/I_1$ ) はピレン分子が存在する環境を反映することが知られている。一般に、ピレン分子が極性の低い疎水的な環境に存在すると、 $I_3/I_1$  値が大きくなる<sup>20)</sup>。また、ピレン分子の近傍に他のピレン分子が存在する場合には、エキシマー (励起状態での二量体) 蛍光も観測される<sup>21,22)</sup>。

純水中と PAAHCl-Mal(14) 水溶液中のピレンの蛍光スペクトルはほぼ等しく、いずれも場合も  $I_3/I_1$  値は 0.54 であった。このことは、ピレン分子が水に取り囲まれた極性の高い環境にあることを意味している。一方、ピレンを含む PAAHCl-Mal(14) 水溶液に NaDoS を添加すると、ピレンの蛍光強度は増大し、 $I_3/I_1$  値も増加した。PAAHCl-Mal(14) ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) 水溶液に NaDoS を  $1.00 \times 10^{-4}$  M,  $1.00 \times 10^{-2}$  M 加えたときの  $I_3/I_1$  値はそれぞれ 0.76 と 0.83 であった。この結果は、PAAHCl-Mal(14)-NaDoS 系では、ピレン分子が水に取り囲まれた環境ではなく、非極性 (疎水的) な環境に存在していることを示している。したがって、PAAHCl-Mal(14) と NaDoS が相互

作用して形成された高分子複合体は、ピレン分子を取り込むことが可能な疎水場を有していると考えられる。さらに、PAAHCl-Mal(14) - NaDoS ( $1.00 \times 10^4$  M) 系ではピレンのエキシマー蛍光も観測され、高分子複合体中の疎水場にピレン分子が近接して存在することもわかった。

Figure 2 に、PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 系の濁度と  $I_3/I_1$  値の NaDoS 濃度依存性を示す。高分子イオンと反対電荷をもつ界面活性剤イオンが相互作用し、高分子複合体をつくり始める濃度は臨界会合濃度 ( $C_{ac}$ ) と呼ばれており、 $C_{ac}$  以上の濃度で界面活性剤のアルキル鎖がつくりだすマイクロ疎水場にピレン分子が取り込まれ、 $I_3/I_1$  値が増加すると考えられる。PAAHCl-NaDoS, PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 系の  $C_{ac}$  はほぼ等しい。しかしながら、PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 系の  $I_3/I_1$  値は PAAHCl-NaDoS 系の値よりも小さくなっている。このことは、PAAHCl-Mal(14) - NaDoS がつくりだす疎水場が PAAHCl-NaDoS の疎水場に比べてルーズであることを意味しており、これは、マルトース基の導入によって、高分子イオン鎖上の電荷間距離が離れたためであると考えられる。

Figure 2 からわかるように、PAAHCl-NaDoS 系と PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 系の溶解挙動には著しい



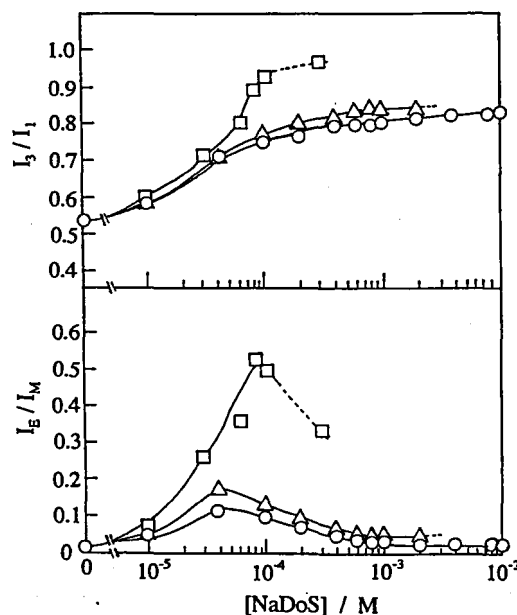
**Figure 2.** Plots of the transmittance and the  $I_3/I_1$  ratio of the intensities of the third and first vibrational bands for pyrene ( $1.00 \times 10^{-6}$  M) of the PAAHCl-Mal(14) ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) - NaDoS (○) and PAAHCl homopolymer ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) - NaDoS (□) systems as a function of NaDoS concentration.  $I_1$  and  $I_3$  are the fluorescence intensity at 374 and 386 nm, respectively.

違いがみられた。PAAHCl ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) 水溶液に NaDoS を添加していった場合、一般的な高分子電解質-界面活性剤水溶液系でみられるように<sup>23,24)</sup>,  $[\text{NaDoS}] = 1.00 \times 10^4$  M で水溶液が濁り始め、それ以上の濃度で沈殿が生じた。一方、PAAHCl-Mal(14) ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) に NaDoS を加えた場合には、PAAHCl-Mal(14) 中のアンモニウム基に対して等モルにあたる  $[\text{NaDoS}] = 1.00 \times 10^2$  M の条件でさえも水溶液の濁りは認められず、PAAHCl-Mal(14) と NaDoS から形成された高分子複合体は水溶性であった。この水溶性は、高分子中に存在するマルトース基によってもたらされたものと考えられる。

### 3-2 高分子複合体形成に与えるマルトース基含量の効果

PAAHCl-Mal と NaDoS の高分子複合体形成におよぼす PAAHCl-Mal 中のマルトース基含量の効果について調べた (Figure 3)。Figure 3 中には  $I_3/I_1$  値だけではなく、 $I_E/I_M$  (ピレンのモノマー蛍光強度に対するエキシマー蛍光強度比) 値も一緒にプロットした。

$I_E/I_M$  値は、はじめ NaDoS の添加とともに増加するが、やがて極大値をとり、それ以上の NaDoS の添加により減少している。 $I_E/I_M$  値の増加は高分子複合



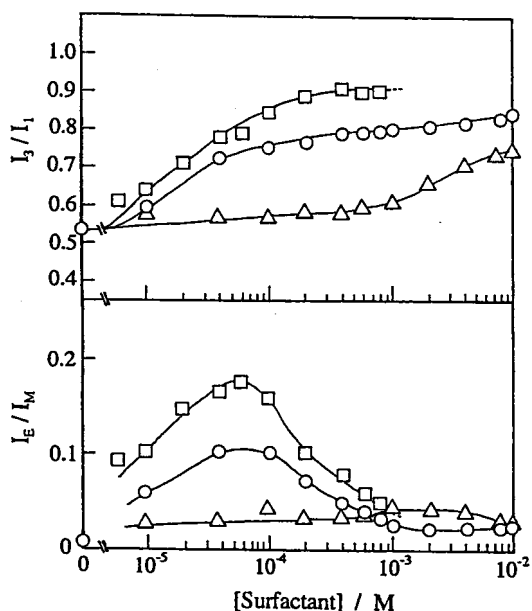
**Figure 3.** Effect of substitution of maltose residue in PAAHCl-Mal on the  $I_3/I_1$  and  $I_E/I_M$  ratios for pyrene ( $1.00 \times 10^{-6}$  M) in aqueous PAAHCl-Mal ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2}$  M) solution as a function of NaDoS concentration.  $I_M$  and  $I_E$  are the fluorescence intensity at 374 and 480 nm, respectively. (□), the PAAHCl - NaDoS system, (△), the PAAHCl-Mal(6) - NaDoS system, (○), the PAAHCl-Mal(14) - NaDoS system.

体形成によって作りだされた疎水場にピレンが取り込まれると同時に、ピレン分子同士が近接して存在していることを示している。また、ある NaDoS 濃度から  $I_E/I_M$  値が減少していくことは、NaDoS 濃度の増加にともない、高分子複合体がつくる疎水場が大きくなり、ピレン分子同士の距離が離れていくためであると推測される。

前述したように、PAAHCl-Mal(14)-NaDoS 系では、水溶性の高分子複合体が形成される。一方、PAAHCl-Mal(6)-NaDoS 系では、 $[\text{NaDoS}] = 3.00 \times 10^{-3} \text{ M}$  以上で高分子複合体は沈殿した。PAAHCl に 14 mol % 以上のマルトース基を導入したポリマーに対するデータがないが、水溶性の両親媒性高分子複合体を構築するには、PAAHCl に導入したマルトース基による親水性と界面活性剤の疎水性のバランスが大切であると思われる。

### 3-3 高分子複合体形成に与える界面活性剤のアルキル鎖長の効果

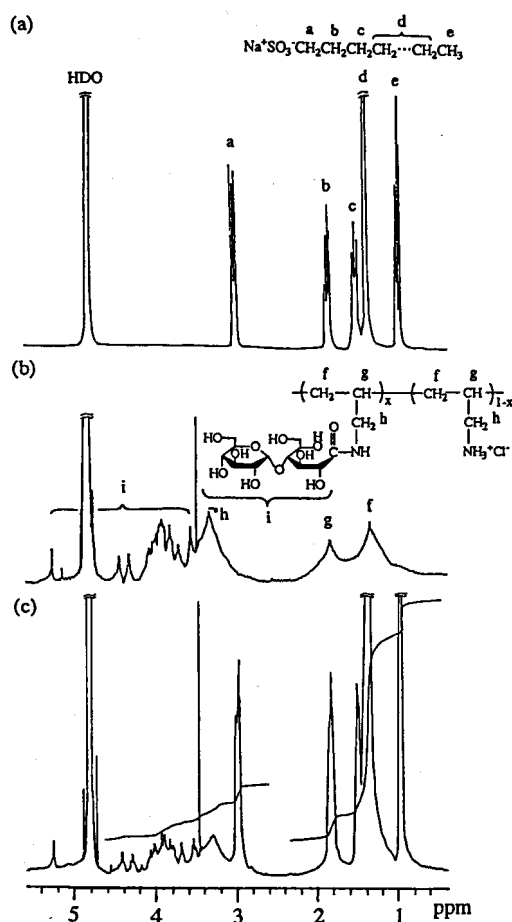
Figure 4 に、PAAHCl-Mal(14) とアルキルスルホン酸ナトリウムとの高分子複合体形成におよぼすアルキルスルホン酸のアルキル鎖長の効果を示す。用いるアルキルスルホン酸イオンのアルキル鎖長が短くなるほど、高分子複合体が形成され始める濃度  $C_{ac}$  は低下している。



**Figure 4.** Effect of alkyl chain length of the surfactant on the  $I_3/I_1$  and  $I_E/I_M$  ratios of the intensities of the excimer and monomer bands for pyrene ( $1.00 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) in aqueous PAAHCl-Mal(14) ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) solution as a function of surfactant concentration. ( $\square$ ); the PAAHCl-Mal(14)-NaHeDeS system, ( $\circ$ ); the PAAHCl-Mal(14)-NaDoS system, ( $\triangle$ ); the PAAHCl-Mal(14)-NaOcS system.

PAAHCl-Mal(14) 水溶液に NaHeDeS を加えた場合、 $[\text{NaHeDeS}] = 1.00 \times 10^{-3} \text{ M}$  以上で高分子複合体は沈殿してしまい、水溶性の複合体をつくるには、HeDeS イオンの疎水性が大きすぎることがわかる。

一方、PAAHCl-Mal(14)-NaOcS 系では、PAAHCl-Mal(14) と NaOcS から形成される高分子複合体は水溶性であったが、 $I_E/I_M$  値の顕著な変化は観測されなかった。さらに、PAAHCl-Mal(14)-NaOcS 系の  $I_3/I_1$  値は PAAHCl-Mal(14)-NaDoS 系の  $I_3/I_1$  値よりも小さい。これらの結果は、PAAHCl-Mal(14) と NaOcS からできる高分子複合体は、十分な疎水場を有していないことを示している。マルトース基の親水性と界面活性剤のアルキル鎖の疎水性のバランスを考えた場合、有効な疎水場をもち、かつ、水溶性の両親媒性高分子複合体を構築するには PAAHCl-Mal(14) と NaDoS の組み合わせが最も適していると考えられる。



**Figure 5.**  $^1\text{H}$  NMR spectra (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) of NaDoS ( $1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) (a), PAAHCl-Mal(14) ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) (b) and the PAAHCl-Mal(14) and NaDoS mixture (c).

### 3-4 PAAHCl-Mal と NaDoS からなる高分子複合体の構造

PAAHCl-Mal(14)と NaDoS からなる高分子複合体の構造を明らかにするために、 $^1\text{H}$  NMR と粘度測定を行った。 $^1\text{H}$  NMR と粘度測定はそれぞれ、高分子錯体中の各部位の局所的な分子運動と高分子複合体のコンフォメーションに関する情報を与える<sup>25,26</sup>。

Figure 5 に NaDoS, PAAHCl-Mal(14), そして PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 系の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを示す。Figure 5 (a) においてシャープに観測されていた NaDoS のシグナルは PAAHCl-Mal(14) と NaDoS が複合体を形成するとブロードとなった (Figure 5(c))。よって、高分子複合体中の NaDoS のアルキル鎖の局所運動は複合体形成に伴い著しく制限されていると考えられる。PAAHCl-Mal(14) のシ

グナルも複合体形成に伴い、ブロード化しているが、マルトース基のシグナルへの影響が最も少なかった。このことは、マルトース基(13H), PAAHCl-Mal の側鎖メチレン基(2H), そして NaDoS のメチレン基(2H) の積分強度比が 1:0.64:0.65 (理論値 1: 1.10:0.94) であることから確認された。これらの結果から、PAAHCl-Mal と NaDoS からなる複合体中では、NaDoS のアルキル鎖が集合してできた疎水内部のまわりをマルトース基が覆っていると推測される。

PAAHCl-Mal(14) 水溶液の粘度は、NaDoS を添加すると、著しく減少した (Figure 6)。PAAHCl-Mal(14) 中のアンモニウム基に対して、等モル量の NaDoS を加えた場合の粘度は純水中の PAAHCl-Mal(14) の粘度の約 1/5 まで減少した。このことは、PAAHCl-Mal(14) - NaDoS 複合体が非常にコンパクトなコンフォメーションをとっていることを示唆している。このような溶液粘度の減少は、PAAHCl-Mal(14) では高分子鎖上のアンモニウム基間の静電反発によって広がっていた高分子鎖に DoS アニオンが結合し、結合したアルキル鎖同士の集合化によって高分子鎖が収縮したためであると考えられる<sup>26</sup>。

以上の実験結果から、PAAHCl-Mal にイオン結合した DoS のアルキル鎖が集まって疎水場を形成し、その疎水場の外側にマルトース基が存在するようなミセルに似た両親媒性高分子複合体を PAAHCl-Mal(14) と NaDoS が形成していると考えられる (Scheme 1)。このような両親媒性構造が高分子複合体に水溶性を付与すると同時に、疎水性物質の取り込みを可能にしていると考えられる。

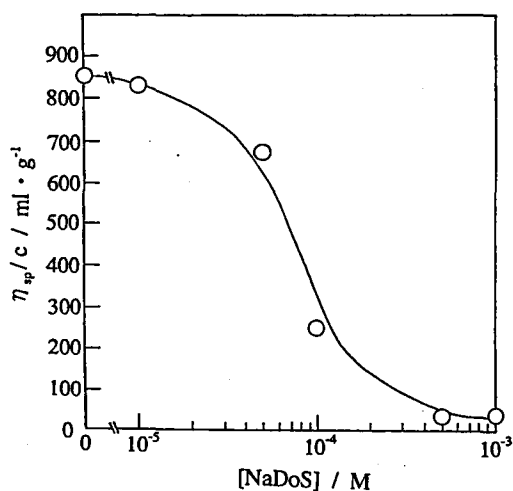
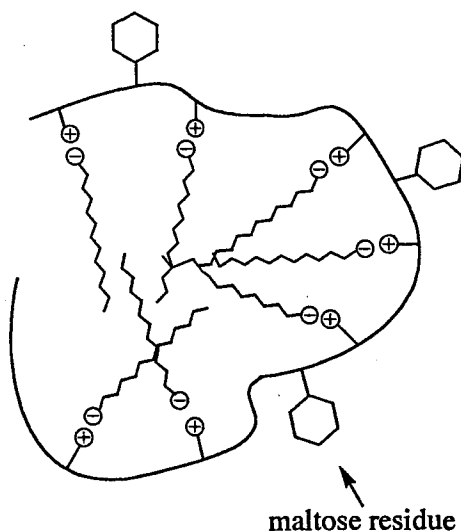


Figure 6. Variation of reduced viscosity of PAAHCl-Mal(14) ( $1.58 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $[\text{NH}_3^+] = 1.00 \times 10^{-3} \text{ M}$ )) as a function of NaDoS concentration.



Scheme 1. Schematic illustration of the aggregate of PAAHCl-Mal(14) with NaDoS.

## 4. 結論

マルトース基を側鎖に有するカチオン性高分子電解質 (PAAHCl-Mal) を、ポリアリルアミンとマルトースラク톤の反応によって合成した。水溶液中で、PAAHCl-Mal はアルキルスルホン酸イオンと高分子複合体を形成するが、その複合体の溶解性や疎水場構築には、高分子中のマルトース基含量やアルキルスルホン酸イオンのアルキル鎖長が影響した。マルトース基を 14 mol% 含む PAAHCl-Mal(14) と NaDoS の組み合わせからは、水溶性の高分子複合体が得られた。この高分子複合体は、DoS のアルキル鎖が集合した疎水内部の外側を親水性のマルトース基が覆うような構造をとっていると考えられ、その構造が高分子複合体に水溶性を付与したものである。本研究で合成した両親媒性高分子電解質-界面活性剤

複合体は、疎水性物質を取り込むことが可能であることから、水溶液系において分離、可溶化、運搬などの機能を発揮すると考えられ、今後、様々な応用展開が期待される。

### 参考文献

- 1) E. D. Goddard, *Colloid Surf.*, **19**, 255 (1986).
- 2) L. Chen, S. Yu, Y. Kagami, J. Going and Y. Osada, *Macromolecules*, **31**, 787 (1998).
- 3) S. Zhou, B. Chu, *Adv. Mater.*, **12**, 545 (2000).
- 4) K. Hayakawa, T. Oyama, T. Maeda, I. Satake, M. Sato, J. C. T. Kwak, *Langmuir*, **4**, 481 (1988).
- 5) K. Hayakawa, S. Shinohara, S. Sawasaki, I. Satake, J. T. C. Kwak, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2179 (1995).
- 6) K. Hayakawa, I. Nakano, I. Satake, *Langmuir*, **12**, 269 (1996).
- 7) T. K. Bronich, T. Cherry, S. V. Vinogradov, A. Eisenberg, V. A. Kabanov, A. V. Kabanov, *Langmuir*, **14**, 6101 (1998).
- 8) K. Kobayashi, H. Sumitomo, Y. Ina, *Polym. J.*, **17**, 567 (1985).
- 9) K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules*, **28**, 5391 (1995).
- 10) D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10575 (1998).
- 11) Y. Qiu, T. Zhang, M. Ruegsegger, R. E. Marchant, *Macromolecules*, **31**, 165 (1998).
- 12) N. B. Holland, Y. Qiu, M. Ruegsegger, R. E. Marchant, *Nature*, **392**, 799 (1998).
- 13) M. Miyazaki, K. Torigoe, K. Esumi, *Langmuir*, **16**, 1522 (2000).
- 14) T. Itaya, H. Ochiai, K. Ueda, A. Imamura, *Macromolecules*, **26**, 6021 (1993).
- 15) T. Zhang, R. E. Marchant, *Macromolecules*, **27**, 7302 (1994).
- 16) H. Ochiai, M. Handa, H. Matsumoto, T. Moriga, I. Murakami, *Makromol. Chem.*, **186**, 2547 (1985).
- 17) E. B. Abuin, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6274 (1984).
- 18) D. Chu, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6270 (1986).
- 19) T. Itaya, H. Ochiai, K. Ueda, A. Imamura, *Polymer*, **35**, 2004 (1994).
- 20) K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2039 (1976).
- 21) P. Chandar, P. Somansundarn, N. J. Turro, *Macromolecules*, **21**, 950 (1988).
- 22) J. Feigon, W. Leupin, W. A. Denny, D. R. Kearns, *Biochemistry*, **22**, 598 (1983).
- 23) S. V. Saito, *Kolloid*, **143**, 66 (1955).
- 24) E. D. Goddard, R. B. Hannan, *J. Colloid Interface Sci.*, **55**, 73 (1976).
- 25) M. Seki, Y. Morishima, M. Kamachi, *Macromolecules*, **25**, 6540 (1992).
- 26) A. Herslof, L. Sundelof, K. Edsman, *J. Phys. Chem.*, **96**, 2345 (1992).