

코발트 웨라이트 에피탁시얼 산화철의 생성과 자기특성(I)

변태봉 · 김대영 · 이재영 · 손진군

산업과학기술연구소

(1991년 8월 20일 받음)

γ -Fe₂O₃ 입자의 보자력 특성을 향상시키기 위해 γ -Fe₂O₃ 입자표면상에 코발트 웨라이트를 결정화시켜 코발트 에피탁시얼 γ -Fe₂O₃ 입자를 제조하였다. 피착층인 Co_xFe_{3-x}O₄의 보자력은 x=1인 조성에서 가장 우수한 특성을 나타내었다. 반응 분위기를 초기 비산화성에서 산화성 분위기로 제어하여 제조한 시료의 자기 특성이 가장 우수하였으며 반응 온도 90°C에서 30분간 반응하면 γ -Fe₂O₃ 입자표면상에서의 코발트 웨라이트 피착 반응이 완료되었다.

I. 서 론

정보화 시대로의 발달에 따라 자기매체로 사용되는 물질의 고밀도화 즉 단위면적당 더 많은 정보량을 기억시킬 수 있는 매체가 절실히 요구되면서 기록밀도와 직접적인 관계를 가지고 있는 보자력의 향상에 역점을 두고 많은 연구가 진행되어 왔다[1~3].

침상형 γ -Fe₂O₃ 분말은 현재 자기기록분야에서 가장 많이 사용되고 있는 자성분말 이지만 분말 특성상 보자력의 한계가 약 500 Oe 정도로 한정되어 있기 때문에 그 이용분야도 주로 Audio용 tape에 국한되어 있다. γ -Fe₂O₃의 보자력 특성을 향상시키기 위한 일환으로서 개발된 코발트 첨가형 산화철 자성분은 코발트 첨가량에 따라 보자력을 조절할 수 있는 장점을 가지고 있어 고성능 Audio용 tape나 고밀도 Video용 자성분으로 많이 사용되어지고 있다. 코발트 첨가형 산화철 자성분의 보자력은 VTR과 tape의 상호 호환성을 유지하기 위해 즉, 재생시 웨라이트 헤드의 포화문제 때문에 아나로그 Video에서는 700 Oe로, 디지털기록에서는 900 Oe정도로 한정하고 있다. 코발트 첨가형 산화철 자성분에는 코발트 첨가형태에 따라 도프형과 피착형으로 구분되어지고 있다. 도프형은 침상 γ -Fe₂O₃ 입자내부에 코발트 이온을 확산, 고용시킨 형태로 고보자력을 얻을 수 있다는 이점을 가지고 있는 반면 결정자기이방성의 온도의존성, 코발트이온의 이동에

의해 발생하는 유도자기이방성, 자왜에 의한 가압감자 및 전사특성이 나쁘다는 등 자기특성이 불안정하다는 결점을 가지고 있다[4].

본 연구에서는 코발트 도프형 산화철의 불안정성을 개선할 목적으로 코발트를 산화철 내부로 확산, 고용시키지 않고 산화철 표면에 코발트 웨라이트를 성장, 결정화시켜 코발트 웨라이트의 결정자기 이방성에 따른 보자력 향상을 도모한 코발트 웨라이트 에피탁시얼 산화철을 용액 반응을 통해 제조함에 있어 피착층인 코발트 웨라이트의 단독합성 제조 조건에 따른 생성물의 자기적 특성 변화와 피착층의 성장 반응시 반응분위기가 최종생성물의 자기적 특성에 미치는 영향에 대해 검토하였다.

II. 실험방법

1. 피착층 Co_xFe_{3-x}O₄ 제조

Seed 결정표면에 피착, 성장시키고자 하는 피착층의 조성을 결정하기 위해 코발트와 제일철염 간의 조성을 변화시켜 그림 1과 같은 순서로 Co_xFe_{3-x}O₄를 단독 공침 제조하였다.

출발원료로 사용한 코발트염, 제일철염, 침전제로 사용한 알카리는 각각 CoCl₂ · 6H₂O(SHINYO화학, 시약특급, 99%), FeCl₂ · 4H₂O(WACKO, 시약특급, 98%), NaOH(JUNSEI, 시약특급, 98%)를 사용하였다. 제일철

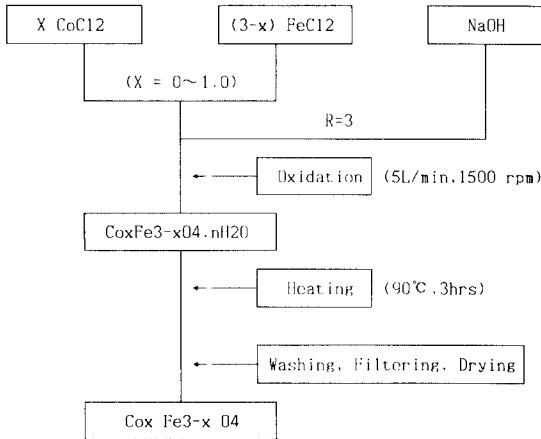


Fig.1. Procedure of $Co_xFe_{3-x}O_4$ preparation

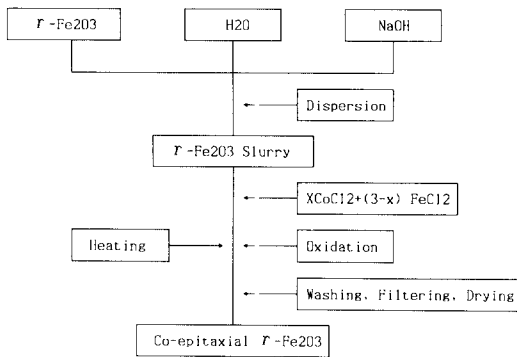


Fig.2. Procedure of Co-epitaxial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ preparation

염과 코발트염간의 조성비(x)를 0~1.0으로 변화하였고 여기에 침전제로 첨가하는 알카리는 2가 금속 혼합용액에 대한 노르말 농도비 즉 당량비 3으로 일정하게 하였다. 수산화물 형태로 침전된 반응직후 5°C/min의 승온속도로 90°C까지 승온하여 3시간 반응시킨 후 반응액의 온도가 약 50°C 될 때까지 자연냉각 시켰으며 반응 중 반응용액의 균일한 혼합반응을 위해 1500 rpm으로 교반하였으며 반응 용액의 산화반응을 위해 공기를 5 l/min 속도로 유입하여 주었다. 반응완료 후 얻어진 생성물 내에 잔존하는 과량의 미반응 알카리 및 NaCl 등은 정사법에 의해 수세로 제거하였으며 수세기 사용되는 물과 동일한 pH가 될 때까지 반복 실시하였다. 여과는 최종적으로 아세톤을 사용하여 수분함량을 최소화 하였으며 60°C 온도로 유지된 건조기에서 10시간 정도 건조하였다.

2. Cobalt epitaxial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 제조

Seed는 평균 장축 약 0.2 μm , 침상비 약 10, 비표면적 35 m^2/g , 보자력 353 Oe, 각형비 0.47 등의 물리적, 자기적 특성을 나타내는 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 입자를 사용하였다.

Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 피착층 조성으로 결정된 피착층을 그림 2와 같은 순서로 epitaxial growth시켜 Cobalt ferrite epitaxial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 를 제조하였다.

전체 반응 용액의 부피를 600 ml로 고정시키고 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 68 g 를 무게비로 3배되는 수계매질에 잘 분산시켜 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 슬러리를 제조한 후 피착층 조성으로 결정된 적정조성비의 코발트와 제일철염 혼합 용액을 첨가하였다. 여기에 당량비 3에 해당하는 알카리를 첨가하여 2가 금속혼합용액을 침전시킨 후 5°C/min의 승온속도로 90°C까지 승온하여 3시간 반응시켰으며 이후 반응 공정은 피착층인 $Co_xFe_{3-x}O_4$ 를 제조할 때와 동일한 방법으로 실시하였다. 첨가되는 코발트 함량은 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 에 대해 5 wt%로 하였으며 반응분위기를 산화성 분위기, 비산화성 분위기, 초기 비산화성 분위기로부터 산화성 분위기로 전환해 주는 혼합분위기로 각각 변화시켜 반응을 진행하였다.

3. 분석 및 측정방법

제조된 분말의 종류는 XRD(Rigaku사, Geigerfiex D/max-III C)를 이용하여 정성 분석하였으며 분말의 형상은 TEM(Jeol사, Jem-2000 CX)을 이용하여 관찰하였다. $Co_xFe_{3-x}O_4$, Cobalt ferrite epitaxial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 의 자기적 특성은 VSM(Vibrating Sample Magnetometer, TOEA사, VSM-5)을 이용하여 측정하였으며 측정시 분말의 충전밀도는 약 1 g/cm^3 , 인가자장은 10 kOe로 하였다. 자기이력곡선으로부터 포화자화(I_s), 잔류자속밀도(I_r), 보자력(iH_c), 각형비(SR)를 각각 구하였다. 분말의 비표면적은 Micromeritics사의 ASAP 2000 기기를 사용하여 BET법으로 측정하였으며 시료를 진공중 150°C에서 24시간 탈가스시킨 후 78 K에서 N_2 가스를 흡착시켜 비표면적을 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 피착층 $Co_xFe_{3-x}O_4$ 제조

제일철염과 코발트염간의 조성비(x)를 0~1.0으로 변화시켜 제조한 $Co_xFe_{3-x}O_4$ 시료분말에 대한 XRD 분석 결과 모든 시료가 전형적인 Spinel pattern을 나타내었으며 이것은 Fe_3O_4 혹은 $CoFe_2O_4$ 의 회절 pattern과 잘 일치하는 것으로 확인되었다.

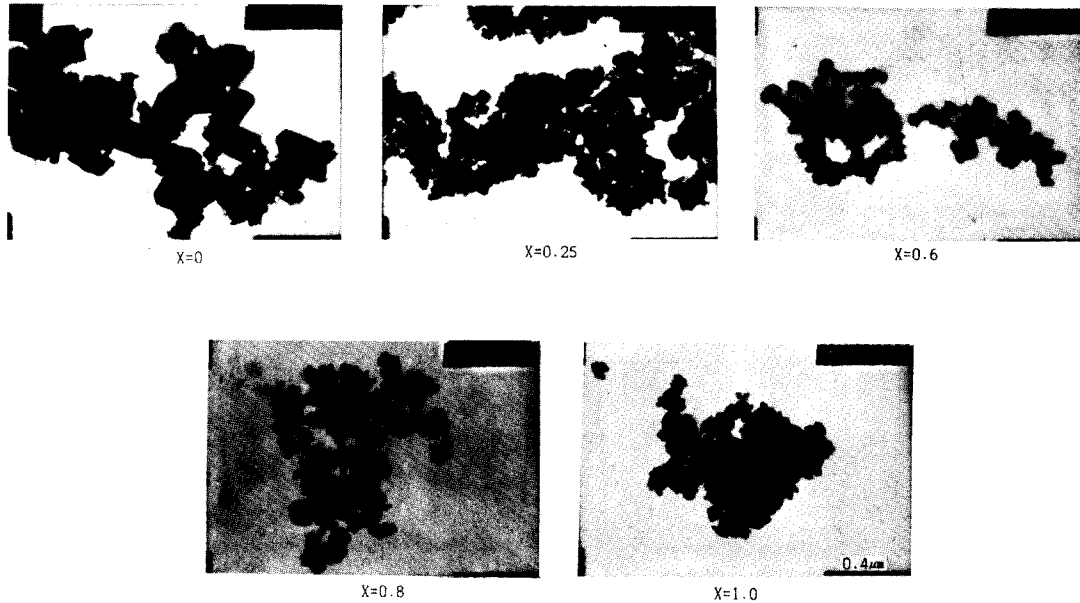


Fig. 3. TEM photographs of particle shape and particle size of $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ powder formed depending on x value of $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ at 90°C for 3hrs.

조성비(x) 변화에 따른 시료분말의 전자현미경 관찰 결과를 그림 3에 나타내었다.

코발트 함량이 증가함에 따라 생성되는 시료 분말의 결정은 점차 미세화되고 입도분포 또한 균일해지는 현상을 관찰할 수 있는데 이와같은 결정들의 미세화 현상은 그림 3의 비표면적 변화와 그림 4의 평균입경 변화의 결과와도 잘 일치하고 있다.

조성비 변화에 따른 $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ 의 자기적 특성 변화를 그림 6에 나타내었다.

코발트 함량이 증가함에 따라 포화자화 값은 일정하다가 조성비 $x=0.7$ 이상에서 점차적으로 감소하는 경향을

나타내었으며 잔류자속밀도는 조성비 $x=0.5$ 에서 최대값을 나타내고 그 이상에서는 감소하여 거의 일정한 값을 유지하고 있다. 보자력은 조성비 $x=0.5$ 에 이르기까지는 증가하는 경향을 나타내다가 그 이상($0.5 < x < 1.0$)에서는 감소하여 일정한 값을 보이며 $x=1.0$ 에서 현저한 증가로 약 2100 Oe 정도의 최대 보자력 특성을 나타내었다. 코발트 함량이 증가함에 따라 포화자화값이 점차 감소하는 현상은 Fe^{+2} 에 비해 작은 단위 원자당 자기모멘트를 가지는 Co^{+2} ($3.7 \mu\text{B}$)의 치환량이 많아지기 때문이라고 생각되며 보자력이 증가하는 것은 Co^{+2} 의 치환에 따른 결정자기이방성의 증가와 더불어 내부응력의 변화에 따

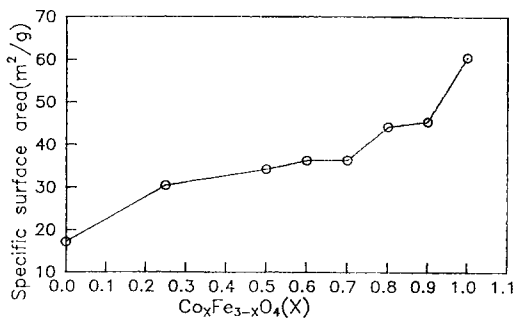


Fig. 4. Specific surface area vs x value of $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$.

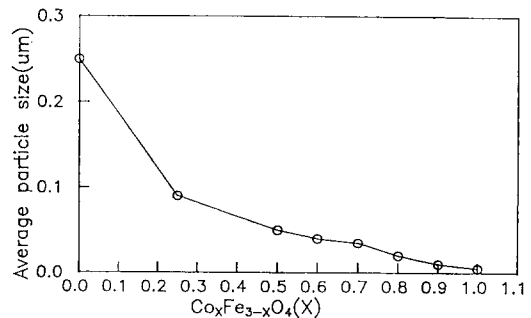


Fig. 5. Average particle size vs x value of $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$.

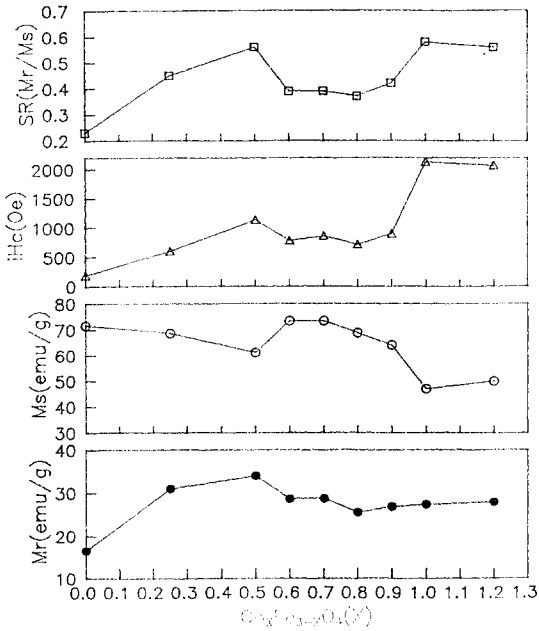


Fig.6. Variation of the magnetic properties of $Co_xFe_{3-x}O_4$ as a function of x value.

라서 발생한 자왜이방성의 기여에 의한 것이라고 생각된다[5]. 조성비 $x=0.5$ 부근에서 잔류자속밀도의 최대값, 보자력 및 각형비의 증가 현상은 Bickford[6] 등이 조사 연구한 $x=0.75$ 부근에서 결정자기이방성이 최대값을 나타낸다는 결과와 상호관계가 있을 것으로 추측되나 정확한 이유에 대해서는 확실하지 않다.

상기의 실험결과에 따르면, $x=1$ 인 조성, 즉 코발트 웨라이트의 화학 양론 조성에 해당되는 조성비에서 가장 우수한 보자력 특성을 나타내었다. 피착층의 조성이 화학적으로 안정한 조성일 때 최종생성물의 온도 및 경시변화 특성 또한 안정하게 될 것으로 판단하여 본 연구에서는 화학적으로도 안정한 조성이며 가장 우수한 보자력 특성을 나타내는 $x=1$ 조성을 피착층의 조성비로 선택하였다.

2. Cobalt epitaxial $\gamma-Fe_2O_3$ 제조

1) 반응분위기에 따른 자기적 특성변화

본 연구에서는 Seed인 $\gamma-Fe_2O_3$ 결정표면에 $CoFe_2O_4$ 를 피착, 성장 및 결정화를 진행시키는데 있어 산화반응에 직접적인 영향을 미치는 가스의 유입방법 즉 반응용액의 반응분위기가 최종산물인 Cobalt epitaxial $\gamma-Fe_2O_3$ 의 자기적 특성에 미치는 영향을 검토하였다.

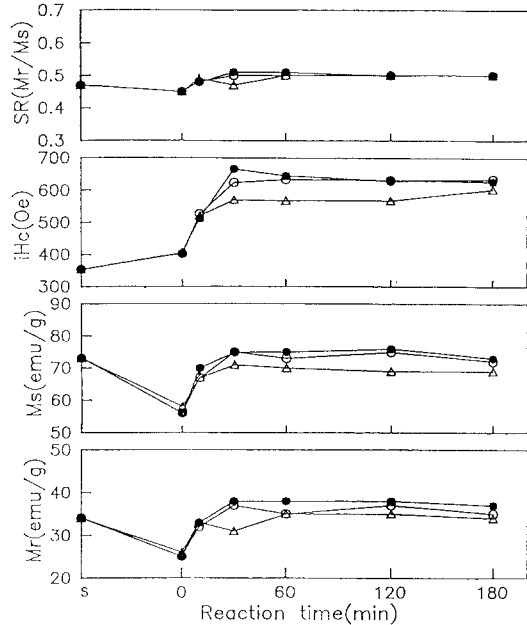


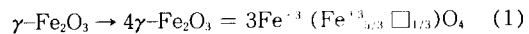
Fig.7. Relation between the magnetic properties of $\gamma-Fe_2O_3$ particles coated by iron-cobalt ferrite and reaction atmosphere, reaction time.

● : $N_2 \rightarrow Air$, ○ : N_2 △ : Air

반응 분위기에 따라 제조된 Cobalt epitaxial $\gamma-Fe_2O_3$ 의 자기적 특성 변화를 그림 7에 나타내었다.

생성된 시료의 모든 자기적 특성은 초기 비산화성 분위기에서 산화성 분위기로 조절하여 제조한 시료가 가장 우수한 자기적 특성값을 나타내었으며 비산화성 분위기하에서 제조된 시료, 산화성 분위기하에서 제조된 시료 순으로 그 특성은 점차 낮아지는 경향을 나타내었다. 반응분위기에 따라 이와같은 결과를 나타내는 것으로 미루어 보아 용액중의 반응분위기가 피착층을 구성하는 $CoFe_2O_4$ 의 핵생성, 성장 및 결정화에 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 짐작할 수 있다.

Seed로 사용한 $\gamma-Fe_2O_3$ 결정구조는



(1)식과 같이 결정구조내에 상당히 활성인 양이온 공위의 결함을 가지고 있다. 결정에 대한 이온의 흡착은 결정격자중의 이온과 불용성 염을 만들고자 하는 이온은 결정에 강하게 흡착된다는 Paneth-Fajans의 법칙[7]이 있는데 이러한 관점에서 보면 코발트나 철이온의 흡착은

불충분 하나 OH⁻ 이온은 흡착되어 금속이온과 반응하여 불용성 염을 형성하게 될 것으로 생각된다. 즉 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면상에 OH기가 먼저 흡착되고 이어서 코발트, 철 이온이 수산화물 착이온 형태로 흡착하여 용액중의 용존 산소에 의해 서서히 산화됨으로서 피착이 형성되게 될 것으로 사료된다. 이상과 같은 내용을 고려해 보면 피착층인 코발트 페라이트의 생성속도는 용액중에 용존하는 산소량, 즉 산화속도와 밀접한 관계를 가지며 이에의해 지배될 것으로 사료된다.

반응분위기를 산화성 분위기만으로 조절한 경우에는 피착층인 CoFe_2O_4 의 핵이 생성되는 반응초기단계에서 산화속도가 빠르기 때문에 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에서 CoFe_2O_4 의 핵이 생성되기 보다는 용액층에서 핵이 먼저 생성하게 되어 빠른 속도의 산화반응으로 균일한 피착 반응에 의한 정상결정성장 반응이 일어나지 못할 뿐 아니라 Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 등과 같은 물질이 분리생성하기 때문에 낮은 자기적 특성값을 나타내는 것으로 사료된다. Fe_3O_4 또는 CoFe_2O_4 로 추측되는 물질의 분리생성은 반응시간 3시간 경과한 시료에 대해 전자현미경 관찰을 실시해 본 결과 침상형태 입자외에 입방정 형태의 입자가 혼재하고 있는 것으로서 확인할 수 있었다.

반응분위기를 비산화성 분위기만으로 조절한 경우에는 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 피착, 성장하는 CoFe_2O_4 층이 산소가 결핍된 불완전한 결정구조로서 피착되기 때문에 피착층에 의한 결정자기이방성의 기여도가 감소할 것으로 사료된다.

반응 분위기를 초기 비산화성 분위기로부터 산화성 분위기로 조절한 경우에는 CoFe_2O_4 의 핵이 생성되는 반응 초기단계의 산화속도를 제어해 줌으로써 빠른속도의 성장 및 결정화 반응에 의한 피착층의 불규칙한 이상결정성장 반응과 물질의 분리 생성을 방지해 줄 뿐만 아니라 피착층의 완전한 결정구조 생성을 가능하게 해 줄 것으로 사료된다. 따라서 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 Cobalt ferrite 피착층이 정상 결정성장반응으로 치밀하고도 균일하게 성장, 결정화하여 완전한 피착에 의해 epitaxial growth가 일어났기 때문에 우수한 자기적 특성값을 나타내게 된 것으로 생각된다.

2) 반응시간에 따른 입자형성 및 자기특성변화

본 연구에서는 반응에 따라 Cobalt ferrite epitaxial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 로 생성해 가는 과정에 있어서 입자형상, 결정구조 및 자기적 특성 변화에 대해 조사하였다.

반응분위기를 초기 비산화성 분위기로부터 산화성 분위기로 조절하였을 때 반응시간에 따라 생성된 시료의 전

자현미경 관찰 결과를 그림 9에 X선 회절분석결과를 그림 8에 각각 나타내었다.

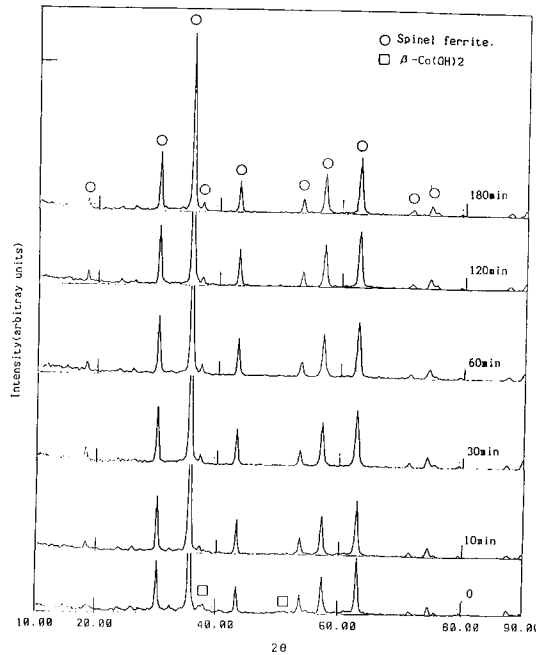


Fig.8. XRD pattern of samples formed with reaction time at the atmosphere of N₂-Air.

그림 9에 있어서 (a)는 Seed로 사용한 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, (b)는 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 와 Co^{+2} , Fe^{+2} 을 함유하는 현탁액에 NaOH 수용액을 첨가한 직후에 채취한 시료, (c)는 (b)의 시료를 90°C에서 30분간 반응시킨 후 채취한 시료, (d)는 (b)의 시료를 90°C에서 3시간 반응시켜 얻은 시료이다. (b)의 시료에는 Seed로 사용된 침상형의 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 입자 외에 크고, 작은 육각판상 형태 및 입방정 형태의 공침수 산화물이 혼재하고 있는 것을 관찰할 수 있으며 X선 분석결과 Spinel ferrite와 $\beta\text{-Co(OH)}_2$ 로 생각되는 수산화물임을 확인하였다. 반응온도 90°C에서 30분 반응시킨 시료에서는 육각판상 및 입방정 형태의 입자는 소멸하고 침상입자의 형태만이 존재하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 X선 회절분석결과 Spinel ferrite 결정상만이 존재하는 것으로 보아 코발트 페라이트 피착층이 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 피착 완료 되었음을 판단할 수 있다.

반응시간에 따른 자기적 특성변화를 그림 10에 나타내었다.

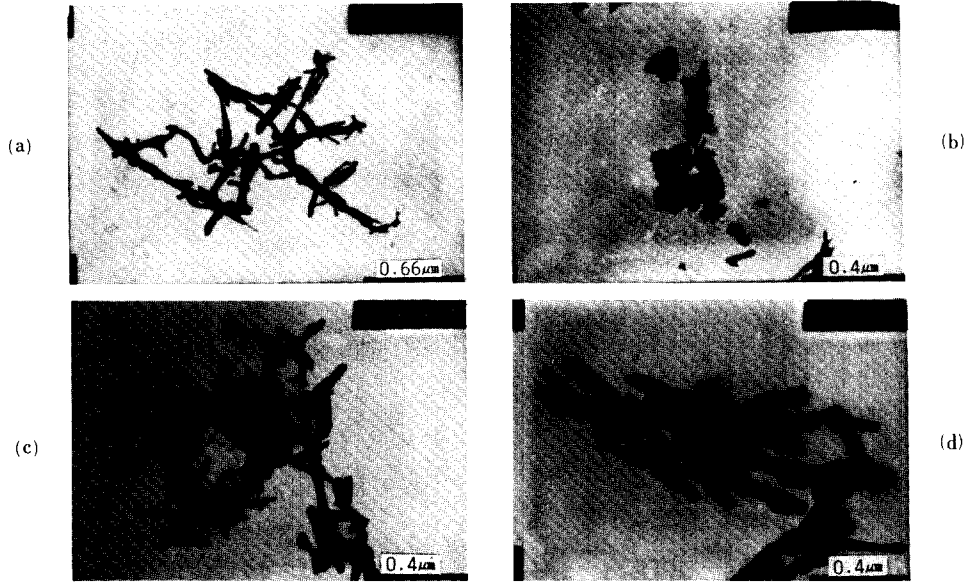


Fig. 9. TEM photographs of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles coated by iron-cobalt ferrite formed depending on reaction time at the atmosphere of $\text{N}_2\text{-Air}$. (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles used as seed; (b) sample immediately after NaOH solution was added to the suspension containing $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles, Co^{+2} and Fe^{+2} ; (c) sample after treated at 90°C for 30min; (d) sample after treated at 90°C for 3hrs.

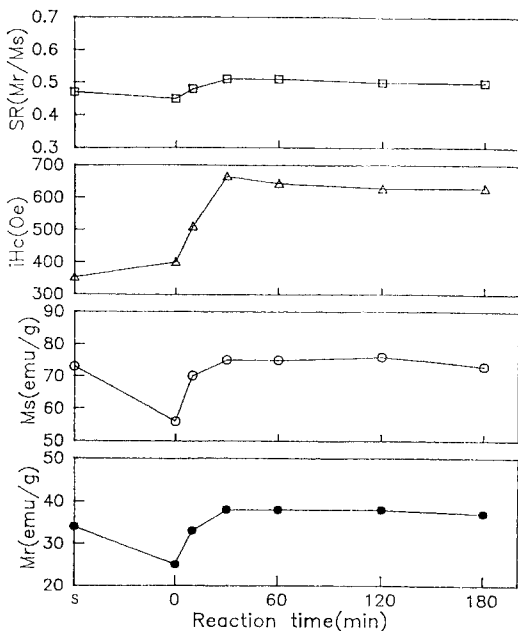


Fig.10 Relation between the magnetic properties of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles coated by iron-cobalt ferrite and reaction time.

반응시간 0에 해당되는 시료, 즉 (b)에 해당되는 시료의 보자력 특성은 약간의 증가를 보인 반면 포화자화, 잔류자화, 각형비 등은 감소하는 경향을 나타내었다. 보자력이 약간의 증가를 보이는 것은 수산화물 형태로 공침된 제일철염 및 코발트 염의 일부가 수세, 건조과정에서 코발트 웨라이트로 분리 생성되거나 또는 극히 일부의 코발트 웨라이트가 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 결정화 됨으로써 코발트 웨라이트에 의한 결정자기이방성의 효과가 기여 되었기 때문이라고 생각되며 포화자화, 잔류자화의 감소는 비자성 물질인 코발트 및 제일철염의 수산화물이 공존하고 있기 때문인 것으로 사료된다. 반응시간 30분에 이르기까지 모든 자기적특성은 증가하고 있는데 이것은 반응시간 경과에 따라 Seed인 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 결정표면에 피착층인 코발트 웨라이트의 결정화진행에 따른 결정자기이방성의 기여도가 증가하기 때문인 것으로 사료된다. 반응시간 30분에 해당되는 시료, 즉 (c)에 해당되는 시료의 모든 자기적 특성은 높은 값을 나타내었으며 그이상 반응시간의 경과에 따라서는 거의 일정한 값을 유지하고 있다. 이러한 자기적 특성의 경향과 그림 9의 전자현미경 관찰 결과에 따른 침상입자형태만의 존재, 그림 8의 X선 회절분석 결과에 따른 Spinel ferrite 결정상 만이

존재하는 것 등으로부터 반응온도 90°C로 30분 반응시키면 코발트 웨라이트의 피착반응이 완료된다는 것을 판단할 수 있다.

IV. 결 론

Cobalt epitaxial γ -Fe₂O₃ 입자를 제조함에 있어 피착층의 조성을 결정하기 위한 코발트 웨라이트 단독 합성시의 제조조건에 따른 물성변화와 피착성장 반응시의 반응분위기 영향 등을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 피착층인 Co_xFe_{3-x}O₄의 보자력은 x=1인 조성, 즉 코발트 웨라이트의 화학 양론 조성비에서 가장 우수한 보자력 특성을 나타내었다.
2. 반응분위기를 초기 비산화성 분위기로부터 산화성 분위기로 제어하여 제조한 시료의 자기적 특성이 가장 우수하였다.
3. 반응온도 90°C로 30분간 반응시키면 γ -Fe₂O₃ 결정 표면에 코발트 웨라이트의 피착반응이 완료되었다.

참고문헌

[1] F. Hayama, S. Kitaoka, M. Kishimoto, H. Andoh, and M. Amemiya, Ferrites Proceedings of ICF3, Center for Academic Pub., Tokyo (1980) pp 521~525.

[2] M. Amemiya, M. Kishimoto and F. Hayama, IEEE Trans. Magn., **MAG-16**(1), 17(1980).

[3] M. Kishimoto, S. Kitaoka, H. Andoh, M. Amemiya and F. Hayama, IEEE Trans. Magn., **MAG-17**(6), 3029(1981).

[4] A. Eiling, IEEE Trans. Magn., **MAG-23**(1), 16(1987).

[5] M. Sato, S. Yokoyama and Y. Hosino, Kogyo Kagaku Zasshi, **65**(9), 16(1962).

[6] L. R. Bickford, J. M. Brownlow and R. F. Penoyer, Proc. Inst. Elec. Eng. **104B**, Supl. No5, 238(1957).

[7] 朴基采, 定量分析化學, 探求堂(1980) pp 59~60.

Formation of Cobalt Ferrite Epitaxial Iron Oxide and Their Magnetic Properties(I)

T. B. Byeon, D. Y. Kim, J. Y. Lee, and J. G. Shon

Research Institute of Industrial Science & Technology

(Received 20 August 1991)

To improve the coercivity of γ -Fe₂O₃ particles. We have made cobalt ferrite epitaxial γ -Fe₂O₃ particles by crystallizing cobalt ferrite on the surface of γ -Fe₂O₃ particles. The coercivity of Co_xFe_{3-x}O₄ which is conform to coating layer showed the most superior characteristic when the value of x was 1. On the formation of cobalt epitaxial γ -Fe₂O₃ particles, controlling reaction atmosphere as oxidation atmosphere after non-oxidation atmosphere was the optimum condition to prepare cobalt epitaxial γ -Fe₂O₃ particles with superior magnetic properties. Epitaxial growth of cobalt ferrite on the surface of γ -Fe₂O₃ particles was accomplished at 90°C for 30 minutes.