

전기방사법에 의한 나노섬유의 기술개발 동향

안경열 · 이수현 · 고재훈

1. 서론

1930년대 이래 연구가 지속되어온 고분자 재료의 전기방사법은 1 마이크로미터 이하의 직경을 갖는 초극세 섬유를 제조할 수 있는 방법으로 관심의 초점이 되어 왔다. 그러나 단위시간당 극미량의 토출량과 노즐오염 등의 문제점을 극복하지 못한 채 상용화와는 다소 거리가 있는 기술로 간주되어 온 것도 사실이다.

1970년대 이후 세계적으로 붐을 형성하기 시작한 컴퓨터 산업과 근래의 비약적인 정보통신의 발달은 소재산업의 단위를 “마이크로”에서 “나노”로 바꾸는 기폭제로 작용하게 되었다. 다양한 산업분야에서 나노미터를 향한 경주가 시작되었다고 할 수 있을 정도로 전세계적으로 기술경쟁이 심화되고 있으며 우리나라에서도 IT, BT, ET와 함께 NT (Nano Technology)의 기술선점을 위한 투자를 확대하고 있음은 시의적절하다 하겠다.

또한 2001년부터 시작된 차세대과제 개발을 통해 섬유분야의 NT라고 할 수 있는 나노섬유 관련 기술 개발에 집중투자가 이루어짐으로써 미국 등 선진국과 어깨를 겨룰 수 있도록 추진되고 있는 시점에서 본 고에서는 나노섬유의 개발동향을 제조장치, 소재의 종류 및 용도전개 방향으로 나누어 소개한다.

2. 기술개발 동향



이수현

1999 전남대학교 섬유공학과(학사)
2001 전남대학교 섬유공학과(석사)
2000~ 나노테크닉스
현재



안경열

1985 전북대학교 섬유공학과(학사)
1987 전북대학교 섬유공학과(석사)
1999 충남대학교 섬유공학과(박사)
1989~ 삼양사 중앙연구소
1998
1998~ 칸텍스 대표
2000
2000~ 나노테크닉스
현재



고재훈

1997 한양대학교 섬유공학과(학사)
1999 한양대학교 섬유공학과(석사)
1999~ 삼양사 중앙연구소
2001
2002~ 휴비스
2003
2003~ 나노테크닉스
현재

Development Trend of Nanofibers by Electrospinning

(주)나노테크닉스 (K. R. Ahn, S. H. Lee, and J. H. Go, NanoTechnics Co. Ltd, 2Ba-103, JeongWang-Dong, Shiwha Industrial Zone, Siheung-Si, Gyeonggi Province 429-450, Korea)
e-mail : krahn@nano21c.com

2.1 나노섬유의 제조장치

전통적인 전기방사 장치의 모식도를 **그림 1**에 나타내었다. 흔히 syringe 방사기로 불리는 이 방사 장치는 현재도 기초연구의 간편한 수단으로 널리 사용되고 있으며 주로 고분자재료와 용매와의 혼합계에서 각각의 배합비율에 대한 가방성을 평가하는 간편한 장치이다.

다만 단위 시간당이나 단위 노즐 (nozzle 및 tip) 당 토출량이 매우 극미량이고, 토출되는 나노섬유가 노즐 (tip)에 부착하여 발생하는 오염으로 인한 빈번한 wiping 및 가끔씩 나타나는 액적(droplet)은 피하기 어려운 한계점으로 보인다. **그림 2**는 액적에

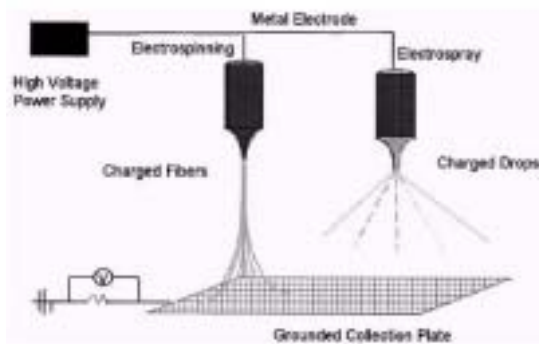
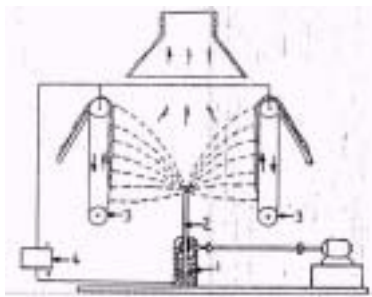
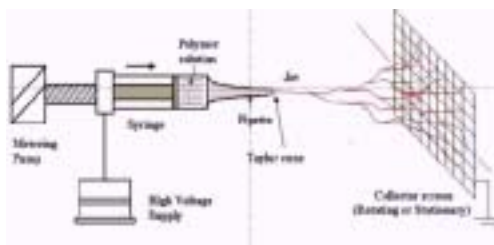


그림 1. 전통적인 syringe 방사기 모식도.



(a)



(b)

그림 2. (a) 상향 및 (b) 수평방향으로 방사와 나노섬유를 포집하는 방사장치.

의한 불량을 피하기 위해 방사와 나노섬유 포집의 방향을 달리한 방법들이지만 노즐오염과 극미량토출의 문제에 대한 근본적인 해결책은 되지 못하고 있다.

그림 3은 Donaldson의 나노섬유 제조장치를¹ 나타낸 것으로 노즐오염을 주기적으로 청소하면서 측면으로 방사 및 포집시킴으로써 문제점을 개선하고 있으나 대량토출의 개념은 실현하지 못하고 있다.

그림 4는 전북대 김학용 교수 팀과 라이지오케미컬 회사가 적용한 전기방사장치로^{2,3} 전기방사시

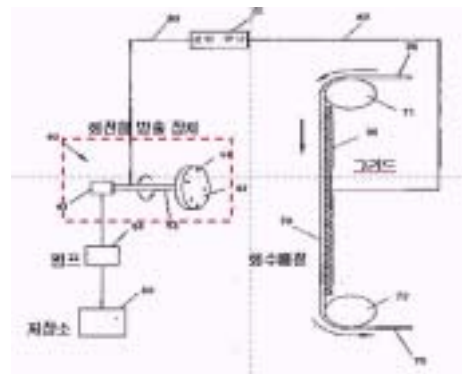
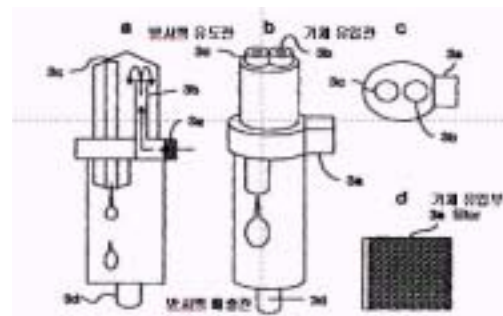
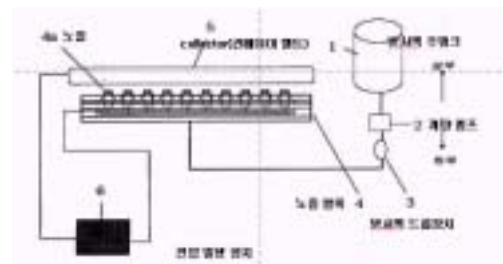


그림 3. 회전형 노즐의 전기방사 장치.¹



(a)



(b)

그림 4. (a) 방사액 드롭장치² 및 (b) 상향식 전기방사 장치.³

방사액을 전압이 걸려있는 노즐블록에 공급하기 전 방사액 드롭장치 내로 통과시켜 방사액의 흐름을 차단시킴으로써 섬유형성 효과를 극대화시키고 상향식 방사 및 토출을 통해 방사용액이 섬유로 형성되지 못하고 물방울의 형태로 낙하하는 현상 (droplet)을 효과적으로 방지하는 특징을 가진 장치이지만 역시 대량토출의 개념을 실현하지 못하고 있다.

그림 5는 (주)나노테크닉스의 전기방사장치로⁴ blown 방법을 전기방사에 도입하여 노즐오염 문제를 해결한 장치이고, 높은 압력으로 토출량을 증가시킴으로써 극미량 토출문제도 해결한 시스템이다. 또한 blown 공정에서 공급하는 air의 온도를 조절하여 용매의 휘발 및 제거 속도를 제어하고 최종적으로 얻어지는 섬유의 형태를 제어할 수 있는 장점도 가지고 있다. Electro-blown 방사장치는 대량토출의 문제점을 극복함으로써 상업화의 가능성을 열어놓은 장치이다.

2.2 소재의 종류

전기방사법이 소개된 이후 이제까지 많은 고분자 소재들이 전기방사법을 통하여 초극세 나노섬유로 제조되었다. 기존의 용액 및 용융방사법과는 메카니즘이나 시스템에서 많은 차이점이 있기 때문에 다른 합섬섬유 및 천연섬유용 고분자뿐만 아니라 섬유형성능이 없거나 떨어지는 고분자 및 무기재료 등의 소재에 대한 연구도 진행되고 있다. 또한 생분해성 및 생체적합성 고분자의 전기방사를 통한 나노섬유의 제조에 대하여 많은 관심이 집중되어 있다.

나노섬유 관련 논문 중 최근 많이 발표되고 있는 내용은 무기재료 (inorganic material)를 이용한 나노섬유의 제조이다. 유기고분자와 무기재료를 혼합하여 제조하면 무기재료의 특성인 고강도, 고내열성, 열안정성, 내화학성 등과 유기재료의 특성인 가볍고 유연성을 지니고 형태제어 및 제조공정이 간

단함 등의 복합적인 특성을 보유한 하이브리드 재료가 생성되는 것이다. 또한 이들 유기-무기 하이브리드 재료를 전기방사를 통하여 초극세 나노섬유로 제조하게 되면 상대적으로 높은 표면적 등 나노섬유의 특징까지 함유한 신소재를 얻게 된다. 한편 유기-무기 하이브리드 나노섬유를 고온에서 열처리 (calcining)를 해주면 유기고분자는 분해되어 사라지고 무기재료만 남은 무기 나노섬유가 얻어지게 된다. 이 무기 나노섬유는 섬유화할 수 없는 무기재료를 섬유화하였다는 점과 무기재료의 특성을 다양하게 발현시킬 수 있다는 점에서 많은 관심이 집중되고 있다. 하지만 아직은 가망성 평가 단계이고 실험실 규모로 연구가 진행되고 있기 때문에 상업화까지는 많은 연구가 필요하다.

제조방법은 무기재료를 용해하여 졸-겔 시스템으로 만들고, 유기고분자를 용매 (solvent)에 녹인 용액에 졸-겔 용액을 첨가하여 방사용 프리커서 용액을 제조한다. 전기방사법을 이용하여 프리커서 용액을 방사하면 100 nm~수 천 nm의 초극세 나노섬유를 얻게 되는데 이를 300 °C 이상의 고온에서 열처리를 하여 무기 나노섬유를 제조하였다. 지금까지의 연구에서 유기고분자는 폴리비닐알코올 (PVA)과 폴리비닐아세테이트 (PVAc)가 주로 사용되었다.

Kim 등은⁵ 광변색 장치용 재료로 적용가능한 Niobium oxide를 전기방사법을 이용한 나노섬유의 제조에 관하여 보고하였다. **그림 6**은 Nb 나노섬유와 이의 열처리 온도에 따른 섬유의 형태변화를 전자현미경 (SEM)을 이용하여 관찰한 결과이다. 773 K에서 열처리된 Niobium oxide 나노섬유는 PVAc의 분해로 인해 섬유 직경의 급격한 감소 (약 50%)를 이루었고 수축이 발생하였다 (**그림 6** (b), (c)). 더 높은 온도인 973 K에서 열처리되면 분말 (particle) 형태의 결정구조가 섬유의 표면에 형성된 것을 확인할 수 있고 (**그림 6**(d)) 1273 K에서 열처

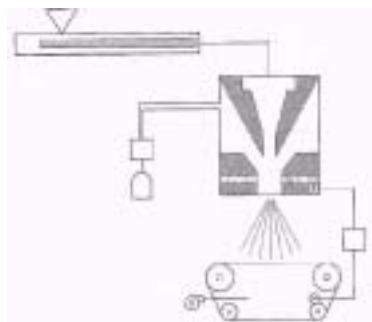


그림 5. Electro-blown 전기방사장치.⁴

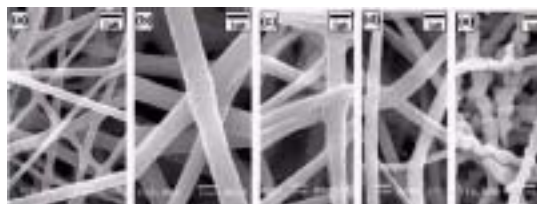


그림 6. Niobium oxide 나노섬유. (a), (b) as-synthesised nanofiber (c) 773 K, (d) 973 K, and (e) 1273 K 열처리.

리를 하면 이 분말형태의 결정구조는 매끈한 표면으로 변한다 (그림 7). 그림 8은 Niobium oxide 나노섬유의 열처리 전 (a)과 열처리 후 (b)의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 그래프이다. 열처리 전 보이는 PVAc 신축 및 굽힘운동에 의해 나타나는 $1000 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 열처리 후 모두 사라진 것을 확인할 수 있다.

또 다른 재료로 Kim 등은⁶ vanadium oxide 나노섬유를 발표하였는데 이 vanadium oxide는 $-147 \sim 68 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 반도체와 금속의 전이가 보고된 재료이다. 그림 9와 같은 고결정성 vanadium oxide 나노섬유를 500의 고온에서 열처리하여 얻을 수 있었고 FT-IR 및 XRD 분석을 통하여 고결정성을 지닌 재료임을 확인할 수 있었다.

C. Shao 등은^{7,8} 촉매 (catalysis), 배터리 전극 (battery cathode), 기체 센서 (gas sensors), 전기변색 필름 (electrochromic films) 및 자기재료 (magnetic materials) 등으로 사용되는 니켈 (nickel oxide)과 기체 센서 (gas sensors), 자기저장 미디어 (magnetic storage media), 태양에너지 변환 (solar energy transformation), 반도체 (semiconductors), 및 촉매 (catalysis) 등의 용도에 사용가능한 구리 (copper oxide)를 전기방사하여 나노섬유로 제조

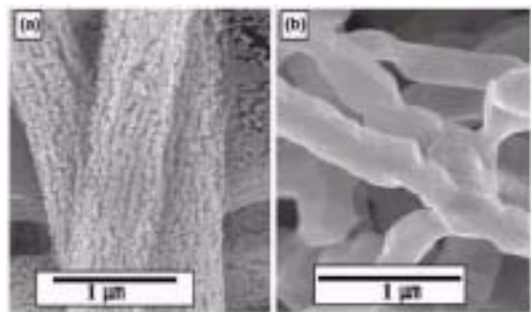


그림 7. 열처리 된 Niobium oxide 나노섬유. (a) 973 K and (b) 1273 K.

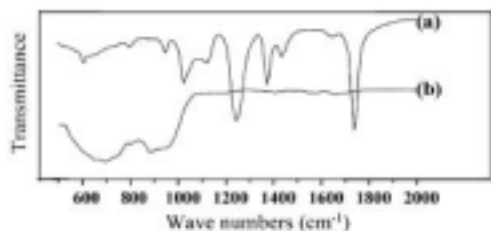


그림 8. Nb oxide 나노섬유의 FT-IR 스펙트럼. (a) as-synthesised and (b) 973 K 열처리.

하는 연구를 진행하여 $50 \sim 200 \text{ nm}$ 정도의 무기 나노섬유를 제조하였다고 보고하였다.

유기고분자로 나노섬유를 제조할 때 무기재료를 첨가하여 유기 나노섬유의 물성을 향상시키거나 분해속도를 제어한 연구도 진행되었다. J. Gong은⁹ 높은 인장강도, 우수한 유연성, 높은 열안정성 및 화학 안정성, 물 흡수성을 지니며 생분해성이지만 분해속도가 매우 느리기 때문에 환경문제를 유발하는 PVA에 광촉매재료인 이산화티탄 (TiO_2)을 첨가하여 광분해속도를 제어한 내용을 보고하였다. 전기방사법을 이용하여 제조한 PVA 나노섬유는 그림 10과 같이 광촉매의 유무 및 제품의 형태에 의해 분해반응에 의한 무게 감소가 다양하게 발생하는 것을 확인할 수 있다. 필름상과 비교해 보면 초극세 나노섬유는 상대적으로 높은 비표면적을 갖기 때문에 광촉매 분해반응이 활발하게 발생하여 16시간 이후에는 약 80%에 이르는 무게 감소를 나타내었다. 약 10%의 무게 감소에 그친 필름상 재료에 비하여 매우 큰 분해속도 및 분해 결과를 얻었다. 또

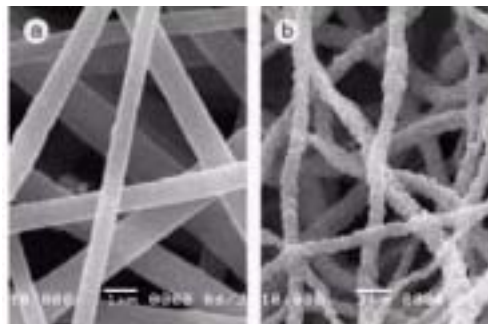


그림 9. Vanadium oxide 나노섬유. (a) As-synthesised and (b) $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 열처리.

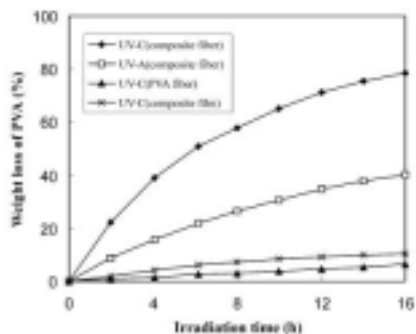


그림 10. 자외선 (UV) 조사 시간에 따른 PVA 섬유들의 무게 감소. ◆ : PVA-Pt/ TiO_2 섬유, ▲ : 순수 PVA 섬유, X : PVA-Pt/ TiO_2 필름.

한 UV-C와 UV-A를 이용하여 광촉매 분해한 결과 각각 80%와 40% 무게 감소가 발생하였다. 즉 자외선 (UV)의 파장을 조절하여 생분해성 고분자인 PVA의 광촉매 분해속도를 제어할 수 있기 때문에 생명의학 (biomedical) 재료로서 효율적인 적용이 가능하리라 예상된다.

2.3 용도전개 방향

초극세 나노섬유의 용도는 생명과학 (life science), 조직공학 (tissue engineering), 필터미디어 (filter media), 방호복 (protective clothing), 센서 (nano-sensors) 등 다양한 적용이 가능하고 그 중 의료용 재료 및 필터미디어에 대한 용도전개가 최근 연구의 주요 관심의 대상이다 (그림 11). 특히 생명과학과 조직공학용 나노섬유와 생체고분자 등 의료용 재료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

2003년 발표된 나노섬유 관련 논문의 주요 테마는 80% 이상이 주로 scaffold에 관한 생명의학에 집중되어 있다. 주로 생체적합성 및 생분해성 고분자인 PLA, PGA, PLGA, Collagen, elastin 등의 전기방사 가능성과 이들 초극세 나노섬유 웹에 대한 세포배양 가능성 및 생분해 속도제어를 이용한 DDS에의 적용 등에 관한 연구가 보고되고 있다. 이와 같이 전기방사된 나노섬유가 생체의학용으로 응용 가능한 이유는 세포외기질과 구조적으로 유사한 특성과 물리적으로 비슷한 특성을 보유하고 있기 때문이다.¹¹ 실제 여러 연구보고에 따르면 나노섬유는 신체조직으로부터 웹의 다공성 표면의 내부로 세포 부착과 성장을 촉진시키는 재료로 평가받고 있다. DDS의 약물전달 시간을 조절할 수 있다면 약물의 효과를 지속적으로 유지하고 치료기간을 길게 하면서 치료효과를 높이고 아울러 약물이 한꺼번에 대량으로 방출되는 것을 막아 안정성을 높일 수 있다. 많은 연구가들에 의해 나노섬유는 후처리¹² 및 첨가제를⁹ 통하여 생분해성 나노섬유의 분해 속도를 조절하고 약물전달 시간을 제어할 수 있다고 보고되었다.

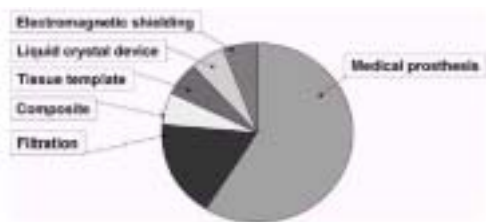


그림 11. 미국특허의 용도전개의 목표.¹⁰

Kenawy 등은¹³ 생분해성 재료는 아니지만 생체 적합성을 지닌 poly(ethylene-co-vinyl acetate) (EVA)에 대한 연구를 전기방사에 관한 연구보고 이후 약물방출 및 세포배양에 대한 연구를 계속 진행하였다. 그림 12에서 보는 것과 같이 세포들이 원형의 죽어있는 형태가 아닌 웹과 같은 납작한 자연 형태로 나노섬유와 상호작용을 하며 성장한 것을 확인할 수 있었고 전기방사된 EVOH 나노섬유는 세포배양에 효과적인 기재라고 평가하였다. 이러한 결과를 통해 EVOH 나노섬유는 높은 섬유형 기공성 재료를 만들 수 있고 세포배양 및 조직배양, 상처치료, 약물전달 시스템 등의 다양한 생명의학 용으로 적용할 수 있다고 판단하였다.

약물 전달 시스템 (drug delivery system, DDS)에 대한 연구로 Zeng 등은¹⁴ 생분해성 원료인 poly (L-lactic acid) (PLA)에 약물을 혼입하고 전기방사하여 나노섬유를 제조한 후 약물의 방출 특성을 평가하였다. 제조된 나노섬유 내부에 약물은 캡슐 형태로 존재하였고 약물의 방출특성 평가 결과 약물의 방출은 나노섬유 내부에서 약물의 확산이나 투과에 의존하지 않고 단지 담체인 고분자섬유의 분해에 영향을 받는다. 그림 13에서 보는 것과 같이 PLA를 분해시키는 proteinase K의 존재 유무에 따라 약물의 방출이 결정된다. Luu 등은¹⁵ plasmid DNA를 혼입하여 DNA 방출특성을 고찰한 결과 그림 14에서와 같이 초기 혼입된 DNA의 최대 80%까지 방출되고 대부분의 DNA가 2시간 이내에 방출되었다. DNA 방출의 지속시간은 약 20일 정도로 보고하였다.

DDS에 직접적인 관계가 있는 생분해성 고분자의 분해거동 및 분해속도 제어 등에 관한 연구도 많이 진행되었다. 생분해성 고분자이지만 분해시간이

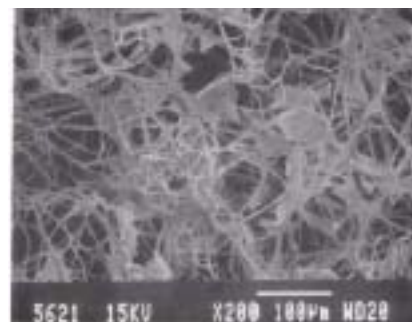


그림 12. 세포배양 결과 근육세포(smooth muscle cells)와 나노섬유(7일 경과).¹³

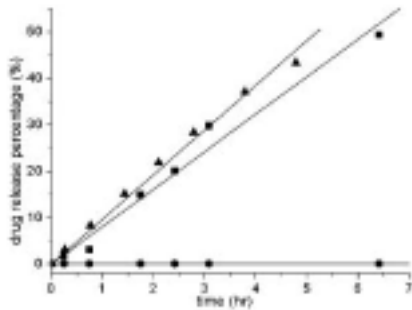
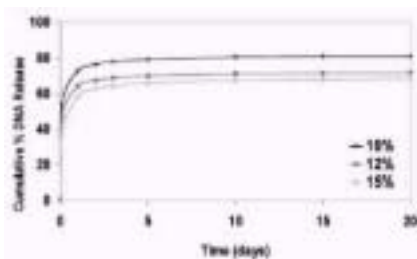
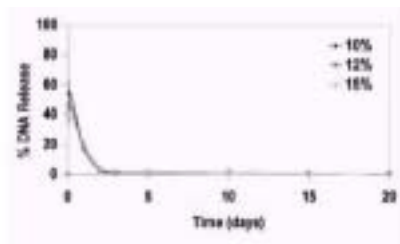


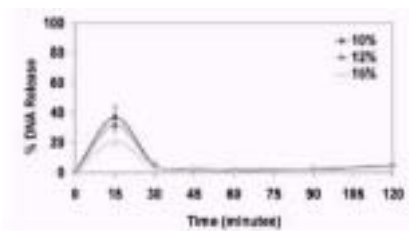
그림 13. 시간에 따른 나노섬유로부터 방출되는 약물농도.¹⁴
 ● : proteinase K 미첨가, 15 wt% 약물 첨가, ■ : proteinase K 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15 wt% 약물 첨가, ▲ : proteinase K 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 wt% 약물 첨가.



(a)



(b)



(c)

그림 14. PLA-PEG-PLA block copolymer 함량 별 제조된 나노섬유의 시간에 따른 DNA 방출 및 방출거동.¹⁵

길고 기계적으로 딱딱하고 소수성 등의 특성을 가지고 있는 PLA는 생명의학용 용도로 적절하지는 않다. 하지만 PLGA와 PLA-PEG block copolymer 등을 혼합하여 특징을 제어할 수 있다. 그림

16에서 PLA의 함량에 따른 분해거동을 나타낸 결과인데 PLA의 함량이 증가할수록 초반에 급격하게 분해가 되고 나중에 분해가 되지 않았고 최종 분해율도 매우 낮게 나왔다.

이처럼 PLA의 분해속도를 PLGA의 첨가로 제어한 경우와 달리 공정 제어를 통하여 분해속도를 제어한 연구도 있다. Zong 등은¹² PLGA의 분해속도를 연신 (post-draw)과 열처리 (thermal treatment)를 가해줌으로써 요구하는 분해성능과 기계적 성능을 가질 수 있는지에 대하여 조사하였다.

그림 17은 전기방사된 PLGA 나노섬유 웹과 연신 및 열처리된 시료의 SEM 사진이다. 이 두 시료의 분해속도와 거동을 그림 18에서 살펴보았다. 전기방사된 PLGA 웹은 연신과 함께 열처리를 해주면 결정배향성이 증가하였고, 신장율이 증가하면서 배향도와 인장강도도 증가하였다. 또한 초기의 분해

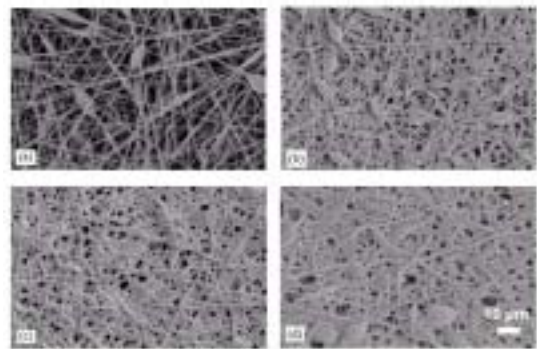


그림 15. 37의 PBS buffer 용액에서 분해되는 전기방사된 scaffolds의 형태학적 구조변화 (90K PLA / LA / 10K PLGA=50/10/40)16. (a) 0 week, (b) 1 week, (c) 3 weeks, and (d) 6 weeks.

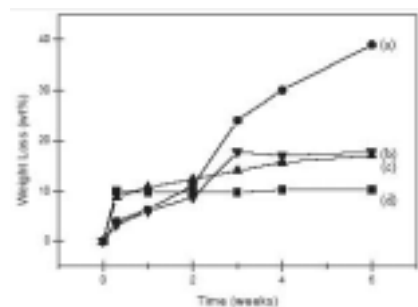
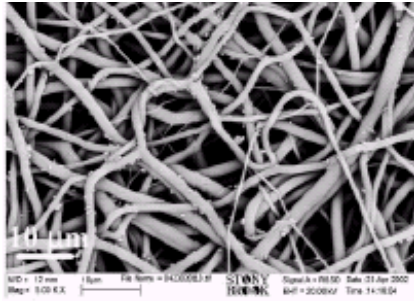
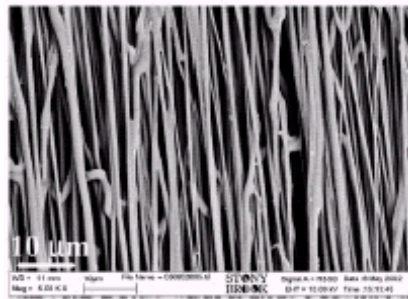


그림 16. 90K PLA / LA / 10 K PLGA의 함량에 따라 전기방사된 scaffold의 분해거동.¹⁶ (a) 90K PLA / LA / 10K PLGA = 50/10/40, (b) 90K PLA / LA / 10K PLGA = 60/10/30, (c) 90K PLA / LA / 10K PLGA = 70/10/20, and (d) 90K PLA / LA / 10K PLGA = 90/10/00.



(a)



(b)

그림 17. 전기방사 된 PLGA 나노섬유 (a)와 450% 연신 및 90 열처리 된 PLGA 나노섬유 (b).¹²

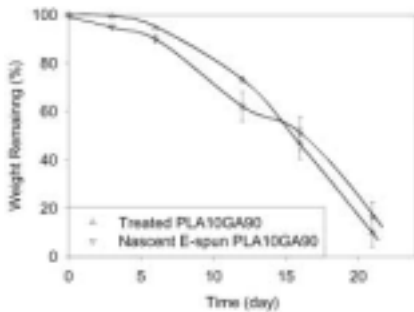


그림 18. 전기방사된 PLGA 나노섬유의 300% 연신 및 열처리 된 시료와 미처리 시료의 시간에 따른 무게 변화 거동.¹²

속도는 늦추어졌고, 반대로 2주 후 나중의 분해속도는 빠르게 제어되었다.

3. 결론

세계적으로 전기방사기술은 방사장치 시스템의 개선으로 대량생산의 기초를 다지는 상용화 초기단계이기에 기술개발에 대한 연구뿐만 아니라 기술의

공업적 소유권의 선점도 중요하다. 상용화에 대한 연구 중 나노섬유 자체의 대량생산을 통한 상용화는 거의 시장진입 단계이지만 용도에 따른 상용화는 더 많은 연구가 이루어져야 한다.

생명공학 (BT) 분야에 대한 나노섬유의 용도적 용은 scaffolds, DDS 등에 대한 연구로 활발하게 진행되고 있다. 전자 재료 및 에너지 저장재료의 정보통신공학 (IT) 분야는 전기이중층 캐패시터 (EDLC)와 전도성고분자 및 탄소나노섬유 등 점진적으로 증가하고 있다.

전기방사에서 사용되는 용매는 고분자와의 상호성, 휘발성 및 유해성 등 용매선정에서부터 용매의 회수 및 처리 그리고 최종적으로 나노섬유에 잔류할 수 있는 용매 등 고려해야 할 문제점이 많다. 앞으로의 연구는 용매를 사용하지 않는 (solvent-free) 용융 전기방사 (melt-electrospinning)를 개발하여 환경 친화성 소재 나노섬유를 제조해야 할 것이다.

참고문헌

1. 청후와이, 홀존알비, 고진스마크에이, 크로프트글라스지, 웨이크토마스엠, PCT/US2001/24948 (WO 02/20668, 특허 2003-0045794), 도날드슨, 2003.
2. 김학용, 강영식, 이세철, 이상욱, and 차동일, 특허 2003-0003925(PCT/KR01/02158, WO 03/004735), (주)라이지오케미칼코리아, 2003.
3. 김학용, 길명섭, 이근형, 류영준, 김관우, 라영민, 특허2003-0065799, (주)라이지오케미칼코리아, 2003.
4. Y.-M. KIM, Y.-B. Sung, R.-S. Jang, and K.-R. Ahn, PCT/KR02/02165 (WO 03/0801905), Nano-Technics Co., Ltd. (2003).
5. P. Viswanathamurthi, N. Bhattarai, H. Y. Kim, D. R. Lee, S. R. Kim, and M. A. Morris, Chem. Phys. Lett., **374**, 79 (2003).
6. P. Viswanathamurthi, N. Bhattarai, H. Y. Kim, and D. R. Lee, Scripta Materialia, **49**, 577 (2003).
7. H. Guan, C. Shao, B. Chen, J. Gong, and X. Yang, Inorg. Chem. Commun., **6**, 1409 (2003).
8. H. Guan, C. Shao, S. Wen, B. Chen, J. Gong, and X. Yang, Inorg. Chem. Commun., **6**, 1302 (2003).
9. C.-H. He and J. Gong, Polym. Degrad. Stabil., **81**, 117 (2003).
10. Z.-M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, Compos. Sci. Technol., **63**, 2223 (2003).

11. Y. -S. Nam, W. -K. Son, and W. -H. Park, *Polym. Sci. Technol.*, **14**(3), 274 (2003).
12. X. Zong, S. Ran, D. Fang, B. S. Hsiao, and B. Chu, *Polymer*, **44**, 4959 (2003).
13. El-Refaie Kenawy, J. M. Layman, J. R. Watkins, G. L. Bowlin, J. A. Matthews, D. G. Simpson, and G. E. Wnek, *Biomaterials*, **24**, 907 (2003).
14. J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, *J. Control. Release*, **92**, 227 (2003).
15. Y. K. Luu, K. Kim, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, *J. Control. Release*, **89**, 341 (2003).
16. K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y.-S. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, *Biomaterials*, **24**, 4977 (2003).