

Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Lazerinių tyrimų centras

Žilvinas Mačiulis

BIURETO IR KARBAMIDO SUGERTIES ARTIMOJOJE INFRARAUDONOJOJE SRITYJE
ANALIZĖ KARBAMIDO AMONIO NITRATO TRĄŠOSE

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinės fizikos ir optinių technologijų
studijų programa

Studentas

Žilvinas Mačiulis

Leista ginti

2018–05–28

Darbo vadovas

dr. Raimundas Steponavičius

Konsultantas

prof. dr. Mikas Vengris

Lazerinių tyrimų centro direktorius

prof. dr. Roaldas Gadonas

Vilnius 2018

TURINYS

Įvadas	3
1 Literatūros apžvalga	5
1.1 Optinių parametrų nustatymo metodai	5
1.2 Optinių sprendimų ir spektroskopijos taikymai cheminėje ir biologinėje aplinkoje	6
1.3 Šviesos šaltiniai naudojami NIR spektroskopijoje	7
1.4 Statistiniai spektroskopinių signalų apdorojimo metodai	7
1.5 Tiesinių lygčių sistemos sprendimas MCR–ALS metodika	8
1.6 Tiriamieji sugerties virpesiai	10
2 Matavimų metodika	12
2.1 Mėginių paruošimas ir matavimas	12
2.2 Eksperimento kalibracinio modelio metodika	16
3 Rezultatai ir jų aptarimas	21
3.1 Karbamido amonio nitrato trąšų sugerties spektrų gavimas	21
3.2 Karbamido amonio nitrato trąšų komponentų grynujų sugerties profilių modeliavimas	22
3.3 Kalibracinio modelio tikslumo įvertinimas	25
Pagrindiniai eksperimento rezultatai ir modeliėtų vyksmų išvados	30
Literatūra	31
SUMMARY	33
SANTRAUKA	34
I Priedas	35
II Priedas	36

Įvadas

Šiais laikais vis labiau populiarėja įvairių spektro sričių spektroskopija produktų (medžiagų) charakterizavimui ir analizei gamybiniuose procesuose (linijose). Artimosios infraraudonosios srities (toliau – NIR) analizatoriai yra naudojami chemijos, biofarmacijos, maisto pramonės šakose, medicinoje. Šie analizatoriai leidžia stebėti produkto kokybės ir gamybos proceso parametrų kitimus realiu laiku. Tai reiškia, kad nereikia tirti produkto mėginių laboratorijose, siekiant efektyviai valdyti gamybos procesą. Šiuo metu NIR sparčiai populiarėja dėl sąlyginai pigių šviesos detektavimo priemonių. Prie to ypač prisidėjo InGaAs puslaidininkiniai detektoriai. Įprastai matuojant chemines medžiagos sudėties savybes, tokias kaip koncentracija, yra naudojama viena iš dviejų metodikų: matuojamas terpės pralaidumas arba matuojamas difuzinis šviesos atspindys. Šviesos pralaidumo pokyčio matavimai tirpaluose turi keletą privalumų prieš matavimus atspindyje. Jie yra stabilesni, jiems neturi įtakos bandinio paviršiaus netolygumai, kurie atsiranda matuojant kietus kūnus ir pakanka apie 5 kartus mažesnių tirpalų koncentracijų matuojant vandens tirpalus [1].

Artimojoje infraraudonojoje srityje yra stebimi viduriniojoje infraraudonojoje srityje (2,5 μm –10 μm) esančių fundamentinių molekulinė virpesinių lygmenų sugerčių juostų virštoniai ir jų kombinacinės sugertys, kurių intensyvumas (amplitudės) yra žymiai mažesnis. Tai leidžia naudoti ilgesnį optinį kelią tiriamoje aplinkoje, kas lengvina ir paprastina matavimo atlikimą. Tai yra labai svarbu praktiniuose taikymuose. NIR srityje ypač gerai yra matomi jungčių, kurias sudaro vandenilis, virpesių spektrai. Galima stebėti NH, CH, OH ir kitas spektrines sugerties juostas. Šiame darbe tiriama medžiaga yra karbamido, amonio nitrato ir vandens tirpalas (toliau – KAS). Populiariausias šių trąšų tipas yra KAS 32 (32% azoto) pramoninės trąšos kurias sudaro iki 45% amonio nitrato, iki 35% karbamido ir apie 20% vandens. Karbamido gamybos procese atsiranda ir nepageidaujama šalutinė medžiaga – biuretas, kurio KAS trąšose gali būti iki 1%. Spektroskopiniu požiūriu NIR srityje biureto ir karbamido medžiagos yra labai panašios, jos abi turi sugerties smaile ties maždaug 1480 nm, o kadangi karbamido tiriamajame junginyje yra apie 30 kartų daugiau, kyla rimtas iššūkis išskirti biureto dedamąją KAS trąšų sugerties spektre ir įvertinti biureto koncentraciją. Šis parametras yra svarbus siekiant užtikrinti produkto kokybę ir gaminamų trąšų standarto laikymąsi, todėl reikia stebėti visų keturių sudedamųjų dalių koncentracijų kitimus. Tam trąšų gamykloje galima įdiegti gamybos procesą valdantį srautinį spektrinį analizatorių. Šis prietaisas nustatytų trąšų sudedamųjų dalių koncentracijas analizuodamas KAS srauto sugerties spektrus.

Šio darbo tikslas – ištirti teorines perspektyvas, bei parengti kalibracinį modelį, kuris būtų skirtas matuoti KAS sudėčiai: amonio nitrato, karbamido, biureto ir vandens koncentracijoms artimojoje infraraudonojoje srityje.

Tikslui įgyvendinti išsikelti uždaviniai:

1. Paruošti matavimui reikalingus KAS trąšų mėginių tirpalus
2. Išmatuoti kiekvieno mėginio sugerties spektrą NIR srityje
3. Parengti (sudaryti) kalibracinį modelį, kuris leistų apskaičiuoti KAS trąšų sudedamųjų dalių koncentracijas mėginiuose iš jų sugerties spektrų
4. Įvertinti biureto prognozavimo tikslumą
5. Įvertinti gautus KAS komponentų sugerties profilius ir palyginti juos su šių medžiagų sugerties profiliais kitose terpėse ir agregatinėse būsenose

Šiame darbe trumpai apžvelgiamas šviesos sklidimas šviesą sugeriančiose ir sklaidančiose terpėse ir jų modeliavimo metodai.

1 Literatūros apžvalga

Šviesos sklaidimas šviesą terpėse yra aprašomas naudojant tris parametrus: sugerties koeficientą, kuris parodo kokia tikimybė šviesai būti sugertai nuėjus 1 cm tam tikroje medžiagoje, sklaidos koeficientą, kuris parodo kokia tikimybė šviesai būti išsklaidytai nuėjus 1 cm tam tikroje medžiagoje ir anizotropijos faktorių, kuris nusako sklaidymo profilį. Naudojant tik vieną iš šių parametrų, kyla sunkumų apribojančių kiekybinės analizės tikslumą, nes spektriniai matavimai šviesą sklaidančiose dispersinėse terpėse neatsiejamai priklauso ne tik nuo cheminių junginių koncentracijų, bet ir nuo šviesos sklaidos, kuri yra susijusi ne su chemine informacija, o su šviesą sklaidančių dalelių fizikinėmis savybėmis tokiomis kaip dalelių dydis. Sugerties koeficientas nusako medžiagų cheminę informaciją (sudarantios medžiagos ir jų koncentracija), o sklaidos koeficientas aprašo fizikinės medžiagų savybės, kaip dalelių dydis ar forma. Todėl gauti tikslias medžiagos savybes matuojant tik šviesos pralaidumą galima tik visiškai optiškai skaidriuose tirpaluose, kuriuose nėra nuosėdų.

Siekiant nustatyti šiuos medžiagų parametrus naudojama įvairūs spektroskopijos bei modeliavimo metodai. Šiame darbe yra apžvelgti skirtingi modeliavimo būdai charakteringiems parametrams nustatyti, aptartas populiarus mažiausių kvadratų regresijos statistinis metodas (angl. *partial least squares regression*, toliau – PLS) ir darbe naudotas daugialypių kreivių skyros metodą (angl. *Multivariate Curve Resolution*, toliau – MCR).

1.1 Optinių parametrų nustatymo metodai

Įvairūs biologiniai audiniai gali būti charakterizuojami aprašant juos optiniais parametrais. Norint sužinoti įvairių terpių optines savybes dažnai tenka pasikliauti įvairiomis modeliavimo metodikomis, kurios leidžia įvertinti skirtingus parametrus. Viena šių metodikų – difuzijos aproksimacijos teorija, leidžianti įvertinti absorbcijos koeficientą bei redukuotą sklaidos koeficientą. Redukuotas sklaidos koeficientas yra sklaidos koeficiento bei anizotropiškumo faktoriaus apibendrinimas.

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (1)$$

Čia μ_s yra sklaidos koeficientas, o g – anizotropiškumo faktorius.

Ši metodika yra išvesta iš Boltzmano pernašos teoremos [2]. Reikia pabrėžti, kad ši metodika yra tinkama audiniams, kurių redukuotas sklaidos koeficientas yra daug didesnis už sugerties koeficientą $\mu'_s \gg \mu_a$ [3]. Taip pat siekiant didesnio tikslumo reikia, kad būtų pakankamas atstumas tarp detektoriaus ir šviesos šaltinio. Tai reiškia, kad šią metodiką yra geriau naudoti kartu su

didesnio storio bandiniais. Tačiau yra mėginama šią modeliavimo teoriją taikyti ir ploniems biologiniams audiniams pasitelkiant šviesolaidžius [4].

Difuzijos aproksimacijos modeliavimo metu yra sprendžiama sekanti diferencialinė lygtis

$$\nabla^2 U_d(r) - \kappa_d^2 U_d(r) = -\frac{3}{4\pi} \sigma \rho P_0 \quad (2)$$

Čia $\kappa_d = \sqrt{3\mu_a\mu'_t}$, o $\sigma\rho = \mu'_t = \mu'_s + \mu_a$, kur μ'_t yra pilnas slopinimo koeficientas, o P_0 yra pilnutinė radiacinė galia. Šios diferencialinės lygties sprendinys yra:

$$U_d(r) = \frac{e^{-\sqrt{3\mu_a\mu'_t}r}}{4\pi r} \left(\frac{3}{4\pi} \mu'_t P_0 \right) \quad (3)$$

Taigi, žinant radialinį atstumą bei atraminio spektro intensyvumą, galima atlikti eksperimentą ir išmatavus intensyvumus skirtinguose erdvės padėtyse – $U_d(r)$ galima sumodeliuoti absorbcijos ir sklaidos koeficientų vertes.

Kita šviesos sklaidimo sklaidančioje terpėje skaičiavimų teorija yra Monte Carlo (toliau – MC) simuliacijos. Ši teorija yra paremta dispersijos vertės mažinimu [5]. Skaitmeninis metodas generuoja atsitiktines vertes ir sieja jas su tam tikra dispersijos verte. Dispersijai sumažinti gali būti naudojami įvairūs algoritmai, kaip, pavyzdžiui, dviejų sistemų su skirtingais parametrais lyginimas [6]. Šio metodo pagrindinis trūkumas yra tai, kad siekiant didinti tikslumą, pavyzdžiui, pradinį fotonų skaičių, skaičiavimams reikalingi kompiuteriniai resursai auga eksponentiškai. MC simuliacijomis paremtos programos leidžia įvertinti ir šviesos sąveiką tarp skirtingų terpių, pavyzdžiui, kiuvetės atveju oras – stiklas – bandinys – stiklas – oras, kas gali būti laikoma, kaip privalumas prieš difuzijos aproksimacijos teoriją [7].

1.2 Optinių sprendimų ir spektroskopijos taikymai cheminėje ir biologinėje aplinkoje

Vienas didžiausių iššūkių medicinoje yra pakeisti invazines procedūras į neinvazines procedūras. Tai ypač aktualu mažiau išsivysčiusiose šalyse, kur nėra galimybių pasiekti aukštą vėžinių susirgimų diagnostikos lygį. Dažnai yra svarstomos galimybės kurti šviesolaidžiais paremtus prietaisus, kur vienu šviesolaidžiu yra nukreipiamas šviesos srautas, o tada vienu ar keliais kitais šviesolaidžiais šviesa yra surenkama [8]. Žinant pradines šviesos savybes ir sveikų audinių sąveiką su šviesa, galima spręsti apie sklaidos ir absorbcijos koeficientų pakitimus pažeistose ar vėžinėse ląstelėse.

Šviesa tarp spinduliuojančių ir šviesą surenkančių šviesolaidžių sklinda audiniu ir gali patirti tokius fizikinius reiškinius, kaip sugertis, sklaida, fluorescencija. Surinkus šviesą, ji yra registruojama spektrometru ir analizuojama spektrometriniais metodais, kaip Monte Carlo simuliacijos [9]. Įvairūs žmogaus organizme esantys pigmentai, kaip melaninas, hemoglobinas ir molekulės, kaip beta – karotinas sugeria šviesą skirtingose spektro srityse. Iš šių junginių sugerties spektrų pokyčių galima spręsti apie koncentracijos pokyčius zonduojamoje terpėje [10]. Vienas pagrindinių dėsnų aprašančių sugertį medžiagoje yra Bero – Lamberto dėsnis, kuris susieja medžiagos pralaidumą su optiniu tankiu ir sugertimi:

$$T = e^{-\tau} = 10^{-A} \quad (4)$$

čia T – pralaidumas, τ – optinis tankis, A – absorbcija.

1.3 Šviesos šaltiniai naudojami NIR spektroskopijoje

Šviesos šaltinius naudojamus spektroskopijoje galima suskaidyti į dvi pagrindines rūšis – tai plataus spektro šviesos šaltiniai, kuriems galime priskirti kaitrines ar halogenines lemputes, superkontinuumo lazerį ir kvazimonochromatinius šviesos šaltinius, kuriems galime priskirti lazerius ir tam tikras šviestukų grupes. Kaitrinė lemputė spinduliuoja labai platų spektrą, tačiau šio šaltinio šviesą yra labai sunku efektyviai surinkti į šviesolaidį ir pasiekto intensyvumo tiesiog neužtektų tirti šviesą sklaidančias terpes. Geras ir didelio intensyvumo lemputės pakaitalas yra superkontinuumą spinduliuojantis šviesos šaltinis. Baltos šviesos kontinuumas sklinda šviesos pluošto pavidalu, o jo dažnių komponentai susiję tam tikrais fazių sąryšiais [11]. Siekiant generuoti superkontinuumą, reikia kubinio netiesiškumo terpės. Tam puikiai tinka fotoninių kristalų šviesolaidžiai. Esant optiškai skaidrioms terpėms kaitrinės ir halogeninės lemputės turi savų pliusų prieš kontinuumo generaciją. Kontinuumo spektras dažnai nėra stabilus laike, todėl reikia atlikti vidurkinimo operacijas norint gauti netriukšmingą spektrą. Siekiant gauti sugerties spektrus optiškai skaidriuose bandiniuose nereikia didelių galių ir nebūtina naudoti šviesolaidžių šviesos pernašai, todėl kainos ir šaltinio stabilumo atžvilgiu lemputė yra geras pasirinkimas.

1.4 Statistiniai spektroskopinių signalų apdorojimo metodai

Chemometrija tai mokslas, taikantis matematinius ar statistinius metodus cheminiams vyksmams ir cheminių matavimų rezultatams analizuoti. Viena iš dažniausiai pritaikomų sričių yra daugialypių kalibracinių modelių kūrimas (angl. *multivariate calibration*). Pagrindinis šios teorijos tikslas yra kurti modelius, kurie galėtų nuspėti norimų parametrų kitimą pagal išmatuotas fizikinių ar cheminių parametrų priklausomybes. Šios priklausomybės gali būti temperatūros ar slėgio

kitimai, medžiagos sugerties ar fluorescencijos spektrai, branduolių rezonanso spektrai ir kiti. Taikymo būdai gali būti tokie kaip, koncentracijų nustatymas iš turimų spektrinių komponentų, molekulių biologinio aktyvumo nustatymas, pH ar drumstumo įvertinimas. Kalibraciniam modeliui parengti reikia turėti dviejų tipų duomenis: atramines modeliuojamo parametro vertes ir pamatuotas charakteristikas, kurios, kaip tikimasi atitinka atramines vertes. Kalibracijos procesą galima apibrėžti, kaip nežinomos kiekybinės informacijos – Y gavimą iš turimų matavimų – X pasitelkiant tam tikrą matematinę perdavimo funkciją [12].

Daugelis aukštųjų technologijų kompanijų gaminančių analitinius instrumentus, kartu siūlo ir savo kalibracinių metodų, tokių kaip mažiausių kvadratų regresiją modeliuojančią programinę įrangą. Šių įrenginių tikslumui įtaką daro įvairios vibracijos, bandinio, dispersinio srauto ar detektoriaus sukeltas netiesiškumas. PLS metodas leidžia kurti statistinius modelius, kai tiek X , tiek Y sudaro 2 ir daugiau kintamųjų. Metodui yra būdingas matricinis atvaizdavimas. Galima įsivaizduoti, kad Y sudaro I bandinių ar stebėjimų, kurie pasižymi K kintamųjų, kas atitinka matricią $I \times K$, o X sudaro tas pats bandinių skaičius I ir J prognozuojančių veiksmių (angl. *predictors*), kas atitinka matricią $I \times J$. Metodo tikslas yra parengti modelį, kurį naudojant Y matricos nebereiktų, o jos vertes galėtume nustatyti iš X matricos. PLS regresija išardo tiek X tiek Y matricas kaip ortogonalias faktorių vertes (angl. *scores*) ir jiems priskiriant tam tikrą krūvį (angl. *loading*) [13]. X matrica išskaidoma kaip $X=TP^T$, kur $T^T T = I$ (I yra bandinio identifikavimo matrica). Šiuo atveju T yra verčių matrica, o P yra krūvių matrica. Y matrica yra prognozuojama kaip $Y^*=TBC^T$, kur B yra diagonali matrica su regresiniais svoriais. PLS regresijos metodikoje iš matricų duomenų vektorius galima sudaryti įvairiais būdais, todėl norint specifikuoti T reikia įvesti papildomas sąlygas. Kovariacija (angl. *covariance*) yra dviejų kintamųjų nuokrypių nuo savo vidurkio reikšmių sandaugos vidurkis. Yra įvedami papildomi svoriai w ir c , kurie sukuria tiesines X ir Y matricų stulpelių kombinacijas taip, kad jų kovariacija būtų maksimali. Gaunama pirma pora vektorių $t=Xw$ ir $u=Yc$ (kraštinės sąlygos yra $w^T w=1$, $t^T t=1$ ir $t^T u$ yra maksimalus. Sugeneravus pirmąjį vektorių jis yra atimamas tiek iš X tiek iš Y matricų ir procedūra kartojama daugelį iteracijų, kol X tampa nuline matrica [14].

1.5 Tiesinių lygčių sistemos sprendimas MCR–ALS metodika

Grynos medžiagos sugertis tam tikrame bangos ilgyje yra lygi ekstinkcijos skerspjūvio, jos koncentracijos ir optinio kelio sandaugai:

$$A_\lambda = SCl. \quad (5)$$

Čia S ekstinkcijos skerspjūvis C koncentracija l optinio kelio ilgis. Optinio kelio ilgį paprastumo atžvilgiui galime parinkti lygų vienetui ($l = 1$). Tuomet medžiagos sudarytos iš daugelio komponentų sugerties spektras būtų aprašomas lygčių sistema:

$$\begin{cases} A_{\lambda 1} = S_1^{\lambda 1} C_1 + S_2^{\lambda 1} C_2 + S_3^{\lambda 1} C_3 + S_4^{\lambda 1} C_4 + \dots \\ A_{\lambda 2} = S_1^{\lambda 2} C_1 + S_2^{\lambda 2} C_2 + S_3^{\lambda 2} C_3 + S_4^{\lambda 2} C_4 + \dots \\ \dots \end{cases} \quad (6)$$

Taigi norint aprašyti visą medžiagos sugerties spektrą reikia žinoti visų komponentų koncentracijas ir gryųjų komponentų spektrus (angl. *pure component spectra*). Šie komponentai (faktorai) nebūtinai privalo būti atskirų medžiagų sugerties spektrai, tai gali būti ir spektro modifikavimui skirti kintamieji, pavyzdžiui, bazinės linijos korekcija. Turint tik vieną sugerties spektrą lygčių sistemos (6) išspręsti ir parengti modelį tam tikro daugiakomponenčio junginio koncentracijoms nustatyti nėra įmanoma, todėl yra reikalingas didelis mėginių kiekis, kas leistų rasti gryųjų komponentų spektrų rinkinį S [15]. Turint šį spektrų rinkinį galima nustatyti komponentų koncentracijas, žinant sugerties spektrus, arba nustatyti sugerties spektrus, žinant komponentų koncentracijas. Matriciniu požiūriu žiūrint turime tris matricas $A[N \times M]$, kur N atitinka tiriamųjų mėginių skaičių M priklauso nuo taikomomos resolucijos ir atitinka matuojamus bangos ilgius, matrica $C[N \times K]$, kur K atitinka principinių komponentų indeksą, o N atitinka tiriamųjų mėginių skaičių ir matricą $S[K \times M]$. Šias matricas sieja lygybė:

$$A = CS. \quad (7)$$

Kadangi stačiakampių matricų atveju įprastai negalime išspręsti lygybės tiesiogiai, yra reikalingas mažiausių kvadratų metodo algoritmas. Šiuo atveju naudotas besikeičiančių mažiausių kvadratų metodas (angl. *alternating least squares*).

$$C^T A = C^T CS. \quad (8)$$

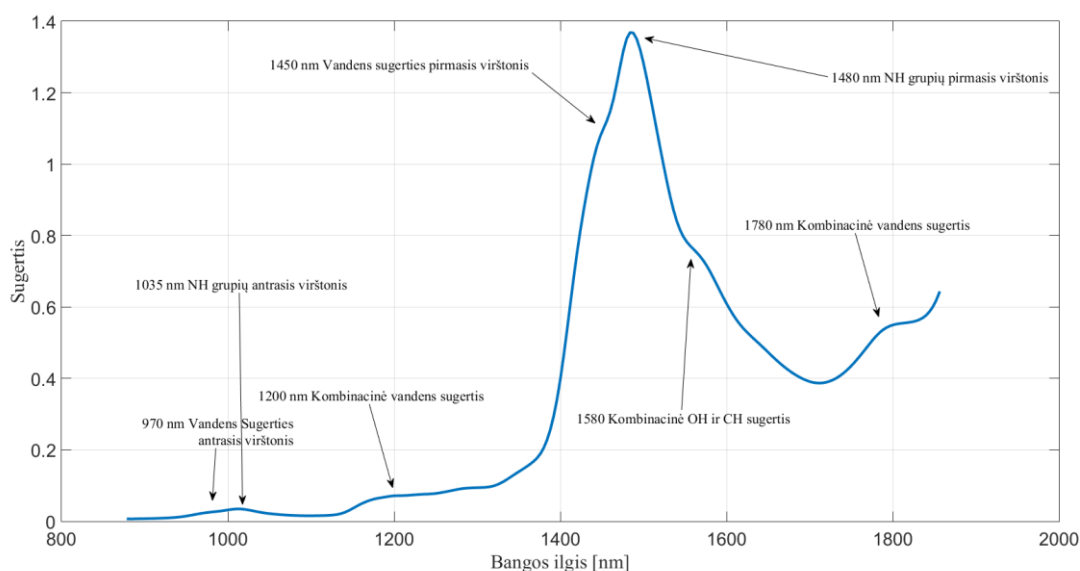
$$(C^T C)^{-1} C^T A = S. \quad (9)$$

Šiuo atveju yra taikomas mažiausių kvadratų metodas gauti matricą S .

Į šį algoritmą įvedus matricą A ir vienos iš matricų S arba C (priklausomai nuo matricos dydžio) pirminį spėjimą bei aprašius optimizacijos konvergavimo kriterijus algoritmas nuspėja ir įvertina abi C ir S matricas. Pirminio spėjimo įvertis yra taip pat svarbi optimizacijos dalis. Algoritmas leidžia pasirinkti arba kietai fiksuotą parametro vertę arba palikti ją laisvą ir leisti optimizacijos modeliui pačiam nuspėti ir optimizuoti vertes. C matricos atveju taip galima įvertinti bandinius, kurių koncentracijos buvo nustatytos netiksliai gaminimo metu ar matavimo metu buvo pastebėti neatitikimai, pavyzdžiui, išsikristalizavusi medžiaga.

1.6 Tiriamieji sugerties virpesiai

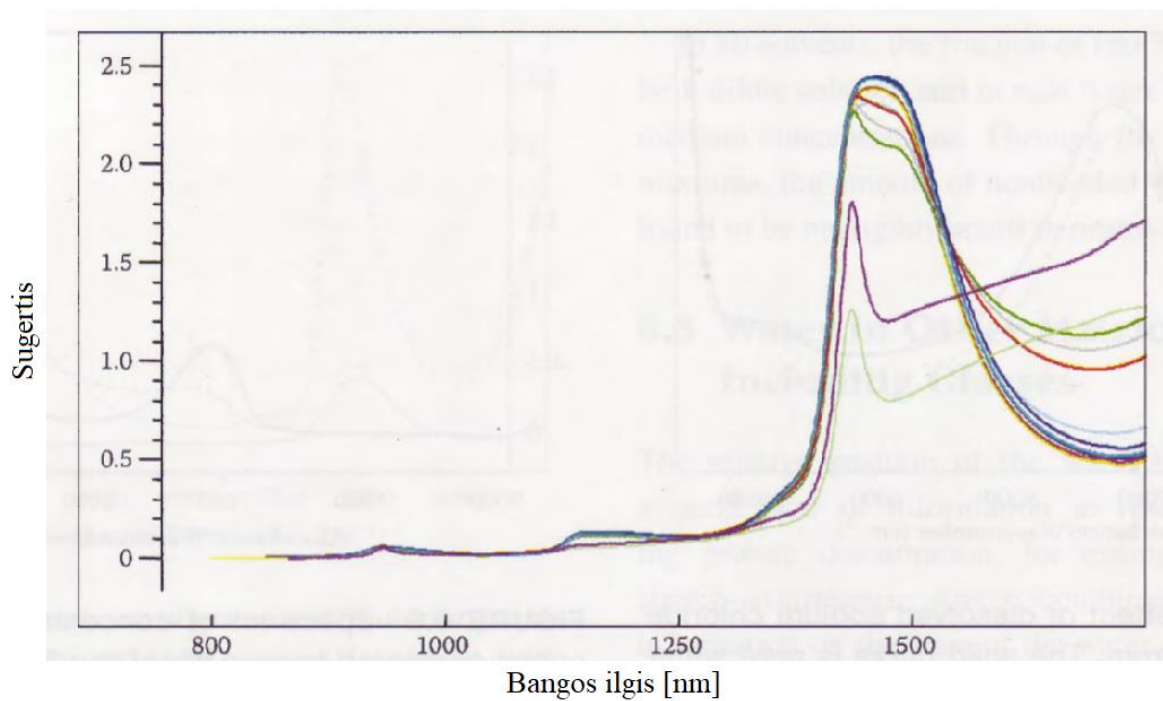
Karbamido amonio nitrato trąšų artimojo infraredo sugerties spektras yra sudarytas iš daugelio jį sudarančių junginių sugerčių superpozicijos (žr. 1.1 pav.). Yra įprasta šias sugerties smailes įvardinti, kaip įvairių jonų grupių vibracijų virštoniais (mažesnio intensyvumo IR spektro dalyje pasireiškiančių virpersių atsikartojimai NIR srityje) ar kombinacinėmis sugertimis priklausomai, kiek skirtingų virpesių pasireiškia tiriamojame spektrinėje srityje. Pagrindinės grupės pasireiškiančios KAS trąšų sugertyje yra NH, OH, CH, amonio jono ir vandens grupės. Kaip ir galima tikėtis iš kaimyninių azoto ir deguonies padėčių cheminėje periodinėje lentelėje šių elementų grupės tiriamojame srityje turi gretimus pirmuosius sugerties virštonius ties 1450 nm ir 1480 nm bei gretimus antruosius sugerties virštonius ties 970 nm ir 1035 nm. Amonio jonai ištirpę vandenyje turi sugerties juostą ties 1534 nm, tačiau KAS mėginiuose jos išskirti negalima dėl aplinkinių NH 1480 nm bei kombinacinės OH – CH jonų sugerties ties 1580 nm. [16].



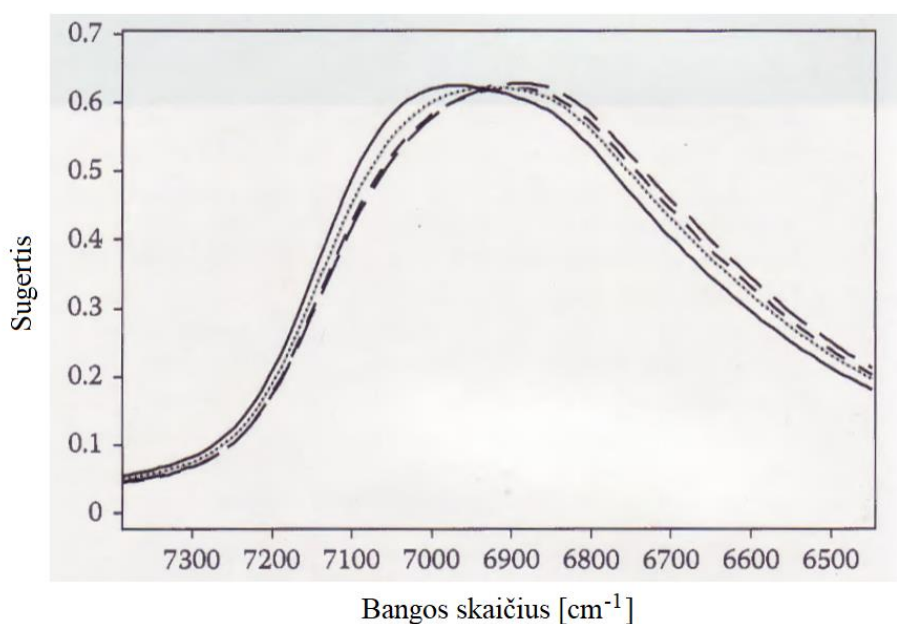
1.1 pav. KAS tirpale esančių pagrindinių jonų grupių sugerčių smailelės

Vienas iš veiksnių keičiančių vandens sugerties spektrą yra ištirpę joniniai junginiai ir naujų joninių jungčių formavimasis. Stebimi kitimai kaip vandens koncentracijos mažėjimas, krūvių ir dipolių sąveika tarp ištirpusių jonų ir vandens molekulių, kas daro įtaką vandenyje esantiems vandeniliniams ryšiams, naujų vandenilinių ryšių formavimasis tarp vandens ir deguonies ar azoto grupių. Taip pat OH jonų grupė vandens tirpaluose turi sau būdingą smailelę, kuri išsiskiria iš gryno vandens sugerties. Jos pirmas virštonis pasireiškia ties 1421 nm o antrasis ties 967 nm. Taip pat sekli negili juosta ties 1100 nm yra priskiriama junginiui kurį sudaro dvi vandens molekulės susijungdamos į OH joną [17]. Esant didelioms OH jonų koncentracijoms vandens 1450 nm

sugerties smailė mažėja, o OH grupės 1421 nm smailė tampa dominuojančia. Šį efekta galima stebėti NaOH ir vandens tirpale (žr. 1.2 pav.). Tirpalų sugerties smailių padėtims didelę įtaką daro ir tiriamojo mėginio temperatūra. Įprasta, kad didėjant temperatūrai sugerties smailė slenkasi į trumpesnių bangos ilgių sritį (žr. 1.3 pav.). Šis procesas yra sudėtingas esant daugeliui skirtingų komponentų, nes bangos ilgio poslinkis skirtingoms elementų grupėms yra skirtingas.



1.2 pav. Vandens sugerties NaOH tirpale, kai apatinė kreivė žymi 50% NaOH tirpalo sugertį, o viršutinė gryną vandens sugertį [17]



1.3 pav. Vandens sugerties smailės padėties kitimas didėjant temperatūrai nuo 25 °C iki 65 °C [17].

2 Matavimų metodika

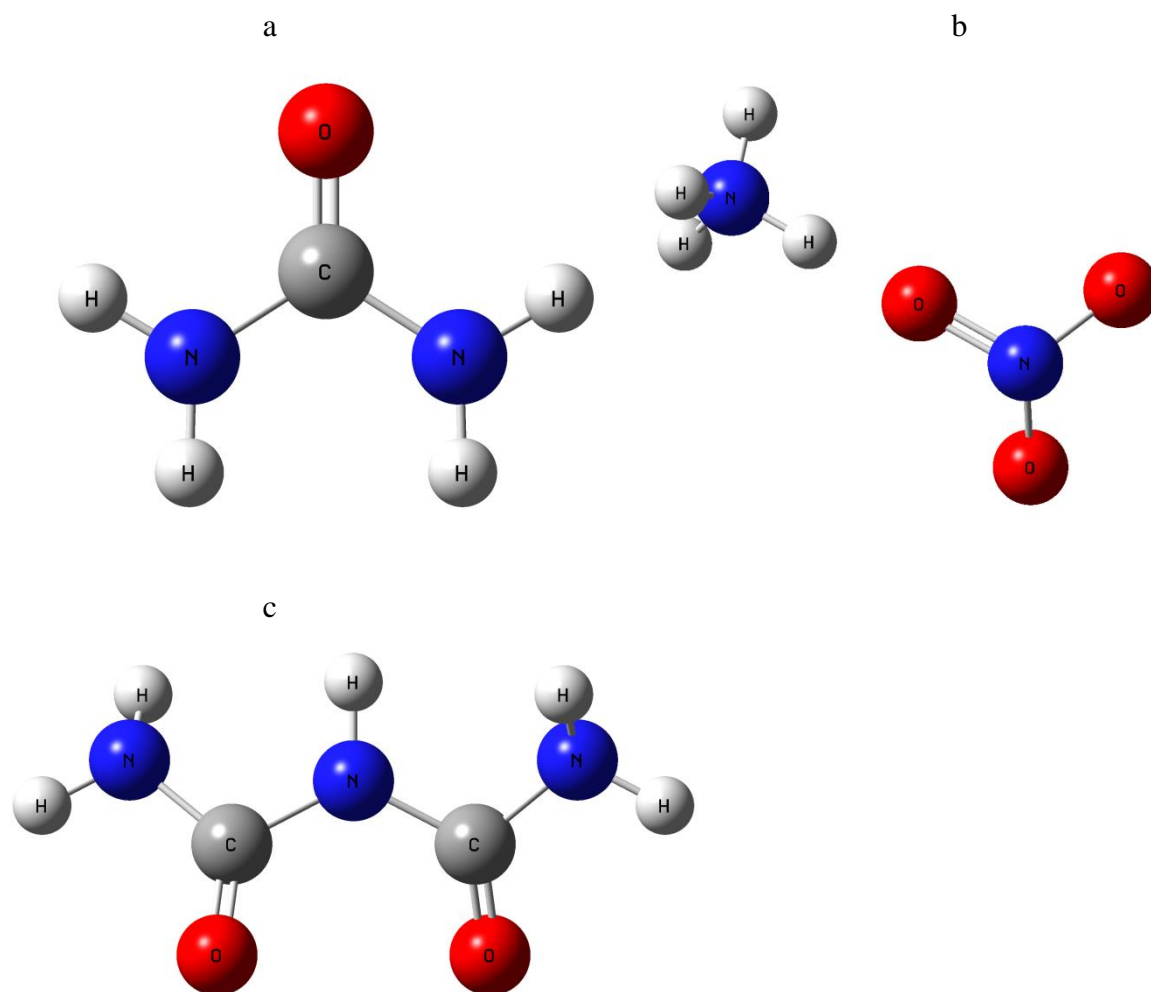
2.1 Mėginių paruošimas ir matavimas

Siekiant atlikti kalibracinius skaičiavimus yra patartina turėti kuo daugiau įmanomų kalibracinių spektrų – taškų. Buvo nuspręsta apsisistoti ties trisdešimties bandinių matavimu. Tiesa verta pabrėžti, kad vėliau buvo paruošti papildomi dešimt bandinių, kurie buvo naudojami kalibraciniam modeliui tikrinti – validacijai. Šis tikrinimas yra reikalingas, kad būtų galima įvertinti, kaip modelis apskaičiuoja koncentracijas, kurių jis iš anksto nežino. Dažnai daroma klaida, kuriant kalibracinius modelius ir siekiant aukšto tikslumo yra tai, kad labai griežtai modelis yra pritaikomas prie kalibracinių bandinių (angl. *overfitting*) ir modelis tiksliai skaičiuoja tik kalibracijoje naudotus parametrus (įvedus naują kalibracijoje nenaudotą mėginį gaunamos didelės paklaidos).

Pasirinktas modelis, kuriame bandinius sudaro: karbamidas (žr. 2.1 pav. a), amonio nitratas (žr. 2.1 pav. b), biuretas (žr. 2.1 pav. c) ir vanduo. 2.1 paveiklyje atvaizduotos molekulės yra modeliuotos su „Gaussian 9.0“ programiniu paketu ir molekulių geometrinė struktūra optimizuota vakuume aplinkoje naudojant tankio funkcionalo (DFT) metodiką su B3LYP/6–311g(d,p) bazinėmis funkcijomis [18].

Amonio nitratas sudarytas iš amonio jono – NH_4 ir nitrato jono NO_3 . Šiam junginiui yra būdingas joninis ryšys, todėl jonai formuoja atskiras molekulių struktūras, o ne vieną bendrą. Svarbu pabrėžti, kad amonio nitratas net ir kambario temperatūros sąlygomis absorbuoja ore esantį vandenį, todėl vandens santykinė dalis amonio nitrato reagente didėja. Šį pokytį yra galima įvertinti naudojant drėgmės matavimo prietaisą arba įvedant parametro vertę kalibracinio modelio aprašyme. Būtent modelinis drėgmės įvertinimo metodas ir buvo pasirinktas. Kadangi trisdešimties mėginių paruošimas truko apie savaitę, o modelio patikrinimui gaminti mėginiai buvo pagaminti dar už kelių dienų, galima spręsti, kad modelio validacijai skirtuose mėginiuose amonio nitrato galima aptikti daugiau vandens, nei kalibracijai skirtuose mėginiuose.

Kitas svarbus reagentus siejantis parametras yra karbamido kiekis biureto reagente ir biureto kiekis karbamido reagente. Karbamido gamybos procese atsiranda pašalinis nepageidaujamas produktas – biuretas. Pagal reagentų gamintojų nurodytus duomenis tiek biurete yra iki 2% karbamido, tiek karbamide yra iki 2% biureto. Tikslios priemaišų koncentracijos nėra žinomos, tačiau šios priemaišos keičia faktines biureto ir karbamido koncentracijas.



2.1 pav. a) Karbamido molekūlės atvaizdas, b) amonio nitrato atvaizdas, c) biureto molekūlės atvaizdas

Pirmųjų trijų medžiagų koncentracijos pasirinktos kaip nepriklausomi kintamieji, o vanduo pasirinktas kaip priklausomas kintamasis. Karbamido koncentracijoms buvo leista kisti nuo 29% iki 39%, amonio nitrato koncentracijai leista kisti nuo 39% iki 49% ir biureto koncentracijai leista kisti nuo 0% iki 1%. Pagal šią sąlygą buvo sugeneruotos ruošiamų tirpalų pradinės koncentracijų vertės, lyginant koncentracijų koreliacijos vertes tarp tiriamųjų kintamųjų. Koreliacijos vertės yra siekiama minimizuoti, kad leidžia sumažinti skirtingų bandinių koncentracijų tarpusavio panašumą ir geriau padengia tiriamąjį koncentracijų intervalą [19]. Koreliacijos vertės yra lyginamos pasitelkiant Pearson koreliacijos koeficientą:

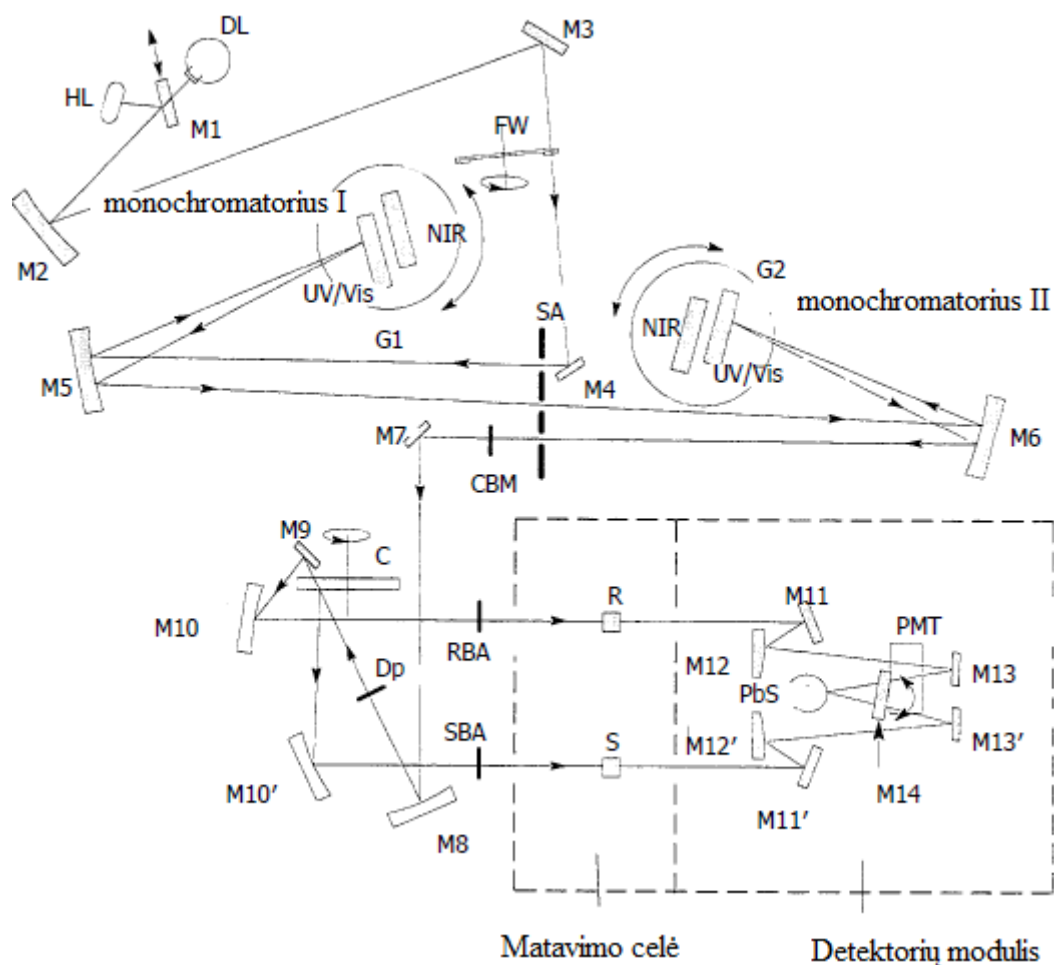
$$\rho(A, B) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} \right) \left(\frac{B_i - \mu_B}{\sigma_B} \right). \quad (10)$$

Čia μ_A ir σ_A yra atitinkamai pirmojo kintamo dydžio vidurkis ir standartinis nuokrypis, o μ_B ir σ_B antrojo kintamo dydžio vidurkis ir standartinis nuokrypis, N kintamųjų dydžių stebėjimo skaičius. Panaudojant šiuos suskaičiuotus koeficientus yra galima gauti koreliacijos koeficientų matricą:

$$R = \begin{pmatrix} \rho(A, A) & \rho(A, B) \\ \rho(B, A) & \rho(B, B) \end{pmatrix}. \quad (11)$$

Kadangi A ir B visada koreliuos su patys savimi, diagonalūs elementai yra visada lygūs vienetui. Karbamido amonio nitrato atveju, yra gaunama 4x4 matricą, kas reprezentuoja keturis skirtingus sudėties komponentus. Viena iš problemų kylančių su šiuo koreliacijos koeficientu yra ta, kad koeficientas neatskiria priklausomų kintamųjų nuo nepriklausomų. Kadangi koncentracijų suma visada yra 100% vienas iš kintamųjų yra priklausomas nuo kitų trijų, tai daro įtaką koreliacijos koeficientų vertėms. Sugeneruotų kalibracinių bandinių koncentracijų vertės ir jų koreliacijos koeficientai pateikti I priede.

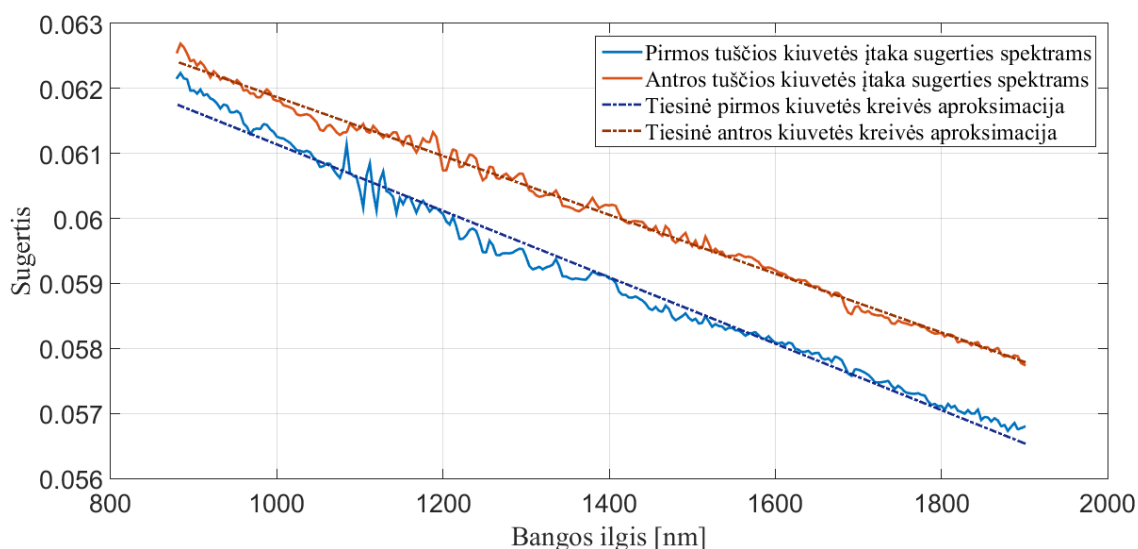
Naudojant reagentus ir matavimo svarstyklės pagaminti eksperimente naudoti bandiniai. Kiekvieno bandinio tūris viršijo daugiau nei 40 ml. Ruošiant mėginius buvo fiksuojamos įdedamų reagentų masės ir suskaičiuotos komponentų koncentracijos, kaip mėginio masės dalis. Matavimus buvo nuspręsta atlikti su mokslinės klasės „PerkinElmer UV/VIS/NIR spectrometer Lambda 1050“ spektrofotometru (žr. 2.2 pav.). Mėginių sugerties spektrai buvo matuojami 880 nm – 1900 nm bangos ilgių srityje, 4 nm skyra. Reiktų pabrėžti, kad dėl greitai augančios vandens sugerties ties 1900 nm, modelio kūrime naudotas 880 nm – 1856 nm intervalas. Prieš kiekvieno naujo bandinio matavimą buvo nuimta naujas atraminis ir naujas fono signalai. InGaAs detektoriaus integravimo laikas parinktas 0,4s, o eksperimentui naudojama buvo 2 mm storio (optinio kelio) kvarcinė kiuvetė. Šis spektrofotometras pasižymi itin geru tiesiškumu net iki 10 sugerties vienetų (dėka dvigubo monochromatoriaus, yra pasiekiamas labai mažas klaidžiojančios šviesos kiekis patenkantis ant detektoriaus). Atlikus eksperimentą iš gautųjų spektrų buvo sumodeliuotas kalibracinis modelis, naudojant MCR metodą, panaudojant „Matlab“ programinį paketą. Šis metodas buvo pasirinktas po testavimo su PLS metodu, kuris blogiau modeliuoja procesus, kuriuose pasireiškia netiesiniai reiškiniai, pavyzdžiui, dėl koncentruotame tirpale – trąšose atsirandančių vandenilinių ryšių.



2.2 pav. Spektrofotometro principinė veikimo schema (adaptuota iš „PerkinElmer UV/VIS/NIR spectrometer Lambda 1050“ naudotojo intrukcijos)

Naudojamą spektrofotometrą galima suskaidyti į tris pagrindines įrangos dalis: Šviesos šaltinį ir šviesos formavimo sistemą, matavimo celę ir detektorių modulį. HL ir DL atitinkamai atitinka halogeninę ir deuterio lempas, kurių spinduliuojama šviesa yra M1–M10 veidrodžiais nuvedama iki matavimo celės. Šviesa iš lempos praėjusi pro dvigubą monochromatorių ir plyšių sistemą yra padalinama į dvi dalis – atraminį spindulį (angl. *reference beam*) ir bandinio spindulį (angl. *sample beam*). Dvigubas monochromatorius padeda į detektorių nukreipti mažiau klaidžiojančios šviesos, kuri neatitinka norimo bangos ilgio, kas pagerina prietaiso matavimo teisiškumą. Spektrofotometro tiesiškumas parodo iki kiek absorbcijos vienetų galima naudoti spektrinius duomenis nedarant pataisų atsižvelgiant į netiesiškumo kreivę. Tiek atraminio, tiek bandinio spindulio intensyvumą yra galima keisti naudojant RBA ir SBA atenuatorius. Tai yra aktualu prieš kiekvieną matavimą atliekant bazinės „nulio“ linijos matavimą ir atraminio spektro matavimą. Kitas šių atenuatorių panaudojimo būdas yra aukštos sugerties matavimams, kurio metu yra koreguojamas atraminio spektro atenuavimas. Šiame spektrofotometre yra galimybė taikyti 1% ar 0,1% atraminio spektro atenuavimą taip dirbtinai padidinant tiriamojo bandinio pralaidumą. Tai leidžia šiuo prietaisu

pamatuoti labai aukštas sugertis – iki dešimties absorbcijos vienetų. Pro atenuatorių praėjusi šviesa patenka į antrąją spektrofotometro dalį – matavimo celę, kurioje yra talpinami tiriamieji bandiniai. Prieš kiekvieno bandinio matavimą nuimant atraminį spektrą celėje galima laikyti tuščią kiuvetę, kuri leidžia iš sugerties pašalinti atspindžių nuo stiklo daromą įtaką. Tuščios kiuvetės sugertį galima aproksimuoti tiese, kurios vertė mažėja didėjant bangos ilgiui (žr. 2.3 pav.).



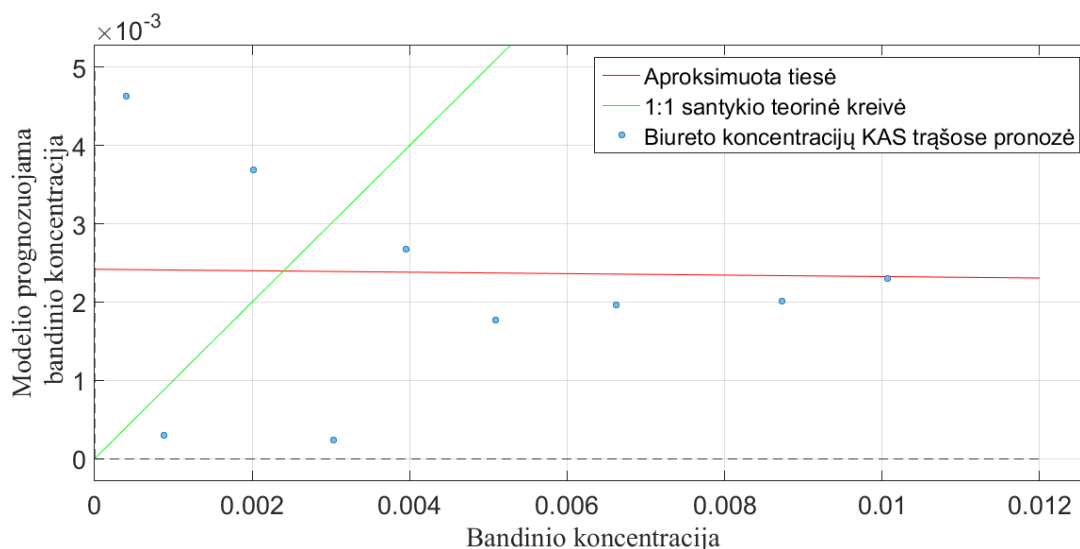
2.3 pav. Dviejų naudojamų 2mm storio kiuvečių daroma įtaka sugerties matavimams

Dėl šios priežasties, tuščia kiuvetė nebuvo laikoma spektrofotometre atraminio spektro matavimo metu (spektrofotometro matavimo celė buvo tuščia), o į atspindžių ir sugerties daromą įtaką buvo atsižvelgta į modelį įtraukiant kintamąjį, kuris keičia spektro kampą. Trečioji spektrofotometro dalis yra detektorių mazgas. Pralaidumo matavimams prietaise yra galimi trys detektoriai: PbS, InGaAs ir PMT. Paveiksle InGaAs detektorius nėra pavaizduotas, todėl kad jis erveje yra žemiau PbS detektoriaus. Šiame darbe dėl fiksuotos matuojamo bangos ilgio srities yra naudojamas tik minėtas InGaAs detektorius. Visą detektorių modulį yra galima pakeisti į atspindžiui tinkamą detektorių, kuriame yra įmontuota integruojanti sfera.

2.2 Eksperimento kalibracinio modelio metodika

Gautieji sugerties spektrai buvo apdoroti „Matlab“ kompiuteriniu paketu (PLS Toolbox 7.9). Buvo naudojamas matematinis statistinis MCR modelis. Siekiant gauti pakankamą kalibracinį tikslumą reikia pasirinkti optimalų kintamųjų kiekį, įvertinti sistemai įtaką darančius veiksnius, patikslinti reagentų svėrimo metu gautas koncentracijas. Labai svarbus faktorius modelio kūrimo yra tai, kad Lamberto–Bugerio–Bero dėsnis yra pritaikytas tūrinėms, o ne masės dalies koncentracijoms. Naudojant šį dėsnį, bet nekonvertuojant iš masės dalių yra galima gauti kalibracinį

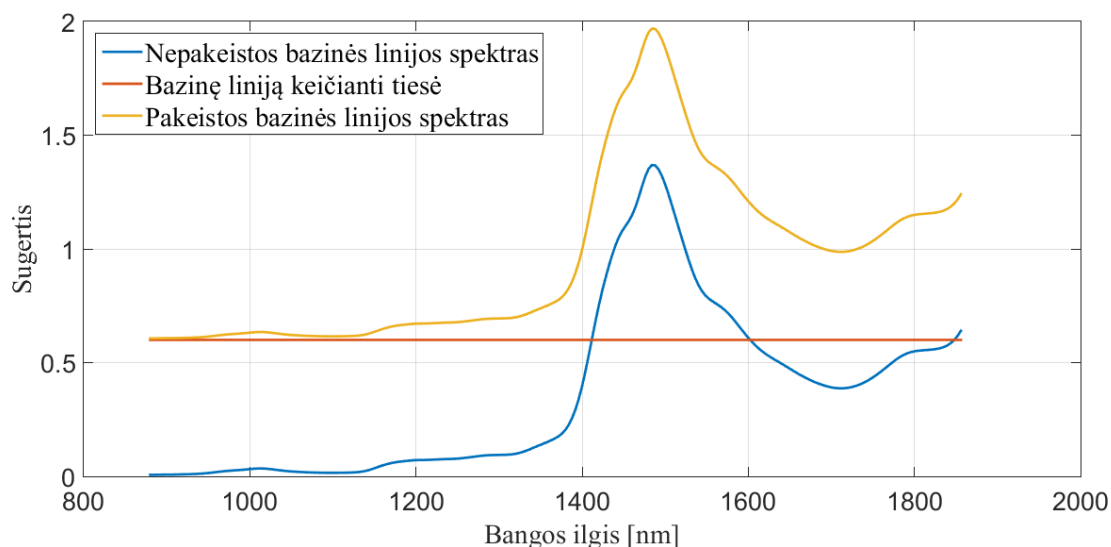
modelį, tačiau jei mėginių tankis keičiasi ženkliai, galima didelė paklaida. Tai ypač aktualu siekiant matuoti biureto koncentracijas, kurių mėginiuose yra tik iki vieno procento (žr. 2.4 pav.).



2.4 pav. Biureto koncentracijų bandiniuose ir modelio prognozuojamų koncentracijų neatitikimas teorinės priklausomybės, kai modeliui parengti yra naudojamos masės dalies, o ne tūrinės biureto koncentracijos

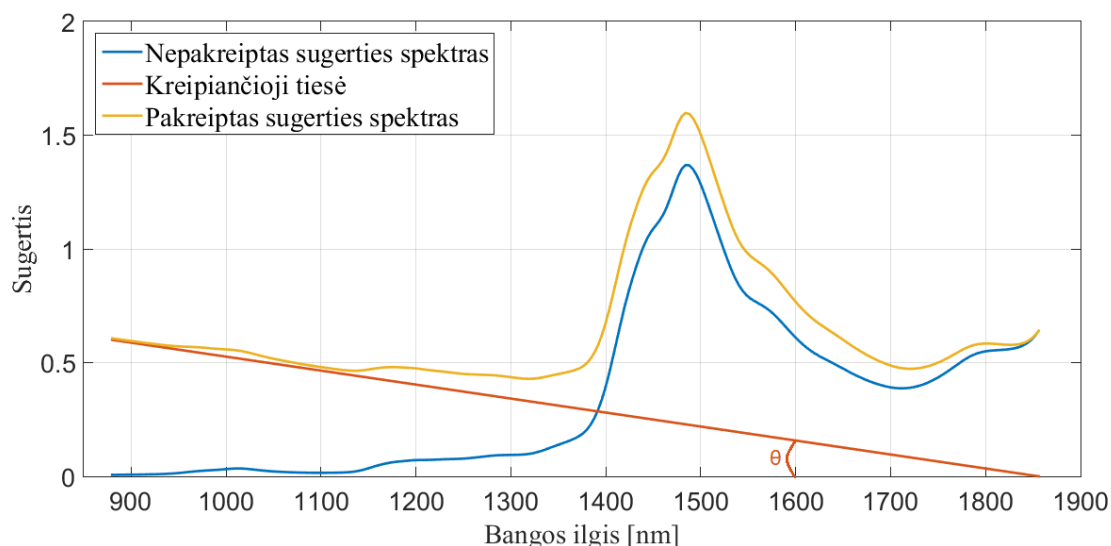
Norint gauti mažesnes modelio paklaidas reikia konvertuoti iš masės dalių koncentracijų į tūrinės koncentracijas. Šiame darbe aprašomame modelyje masės dalies koncentracijos yra paverčiamos į gramus litre. Atlikti šią operaciją nėra paprasta, nes reikia žinoti kiekvieno paruošto mėginio tankį. Reikia pabrėžti, kad tirpalo tankis nėra atskirų komponentų tankių suma. Įvertinti mėginių tankį yra galima naudojant areometrą. Neturint ar nenaudojant šio prietaiso yra galima įvertinti (surasti) kiekvieno tirpalo tankio vertes, išsprendžiant tam suformuluotą optimizacijos uždavinį. Siekiant paversti koncentracijas į gramus litre buvo taikytas iteracinis optimizacijos modelis kiekvienam iš tiriamųjų mėginių nustatant pradinę tankio vertę, siejant ją su atskirų komponentų tankių suma ir leidžiant modeliui šį parametą keisti apibrėžtose ribose. Taigi į sistemą buvo įvesta trisdešimt kintamųjų, kurie apibrėžia, kalibracinių mėginių tankį. Validaciniams mėginiams to daryti nereikia, nes modelis nuspėja būtent tūrinių koncentracijų vertes, kurias vėliau yra galima konvertuoti atgal į masės dalis, kiekvieno komponento koncentraciją padalinant iš atskirų komponentų koncentracijų sumos. Kiti svarbūs optimizacijoje naudojami kintamieji yra biureto kiekis karbamide, karbamido kiekis biurete, bei amonio nitrato drėgmė. Pirmieji du kintamieji buvo vertinami globaliai visiems keturiasdešimt mėginių (trisdešimt kalibracinių ir dešimt validacinių) leidžiant kintamųjų vertei kisti apibrėžtame intervale, o amonio nitrato drėgmė įvertinta visiems keturiasdešimt mėginių atskirai (žr. II priedas).

Kiti svarbūs optimizacijos tikslumui veiksniai yra susiję su gautųjų spektrinių duomenų apdorojimu. Kadangi atraminis spektras buvo matuojamas optiniame kelyje nesant kiuvetei, atliekant sugerties skaičiavimą yra įvedamos papildomos paklaidos dėl Frenelio atspindžių nuo kiuvetės sienelių. Taip pat dėl kiuvetės plovimo ir džiovinimo po kiekvieno matavimo, kurio švarumą įvertinti sunku, šiek tiek kinta spektrų bazinė linija (angl. *baseline*). Dėl šių priežasčių į optimizaciją buvo įvestas bazinės linijos korekcijos kintamasis, kuris normalizuoja kiekvieną iš spektrų į mažiausią spektrų vertę (žr. 2.5 pav).



2.5 pav. Bazinės linijos pakeitimo principinė schema

Vienas iš svarbių faktorių, kuriuos verta įskaityti yra šviesos sklaida. Nors tirpalai prieš matavimą žmogaus akiai yra optiškai skaidrūs matavimas vyksta artimojoje infraraudonojoje srityje, kurios akis nemato. Reilėjaus sklaidos aprašyme sklaidos koeficientas atvirkščiai priklauso nuo bangos ilgio ketvirtojo laipsnio taigi didėjant bangos ilgiui sklaidos faktorius mažėja [X]. Dėl šios priežasties į modelį yra įvedamas parametras, kuris leidžia keisti spektro kampą apibrėžtose ribose. (žr. 2.6 pav.). Modelyje kreipiančiosios tiesės nuokrypio kampas θ yra apie $1,315 \times 10^{-5}$ rad.



2.6 pav. Sklaidos faktoriaus įvertinimo kalibraciniame modelyje principinė schema

Koncentruotuose tirpaluose pasireiškia įvairūs cheminiai ir fizikiniai procesai, kurie daro įtaką sugerties spektrams. Vienas iš jų yra tarp molekulių atsirandantys vandeniliniai ryšiai. Taip pat koncentruotuose tirpaluose gali susidaryti įvairūs izomerai (dimerai), trąšose gali išsiskirti azoto ar amoniako dujų. Šių veiksnių įtaką įvertinti tiesiškai nėra įmanoma, todėl buvo įvestas papildomas spektrinis komponentas netiesiniams veiksniams aprašyti. Kadangi buvo spėjama, kad iš netiesinių procesų didžiausią įtaką daro vandenilinės jungtys, šiam spektriniam komponentui leista kisti tik srityje, kuri būdinga vandenilinių OH^- jungčių smailės (1380–1504 nm).

Kadangi modelyje yra atliekamas optimizacijos procesas, reikia apibrėžti tikslo funkciją (toliau F) kurią yra siekiama minimizuoti ir konvergencijos kriterijus, kurie būtų naudojami optimizacijos laipsniui vertinti. Į šį parametą yra įtraukiami validacinių ir kalibracinių mėginių, suskaičiuotų su modeliu, koncentracijų standartiniai nuokrypiai (angl. *root-mean-square-error*, toliau RMSE), o tiksliau visų mėginių komponentų koncentracijų RMSE suma. Taip pat į F yra įtraukiamas visų komponentų RMSE skirtumų absoliutinės vertės. Tai reikalinga tam, kad modelis nesukurtų išbalansuotos sistemos, kur vienas iš komponentų turėtų labai mažas paklaidas, o kiti komponentai santykinai didesnes paklaidas. Paskutinis minimizavimo narys buvo parinktas, kaip suma spektrinių komponentų skirtumo kvadrato tarp gautų sugerties spektrų ir spektrų suskaičiuotų panaudojant optimizacijos metu gautus kintamuosius.

$$F = \sum(RMSE_k + RMSE_v + |\Delta RMSE_k| + |\Delta RMSE_v| + (X_{k1} - X_{k2})^2 + (X_{v1} - X_{v2})^2). \quad (12)$$

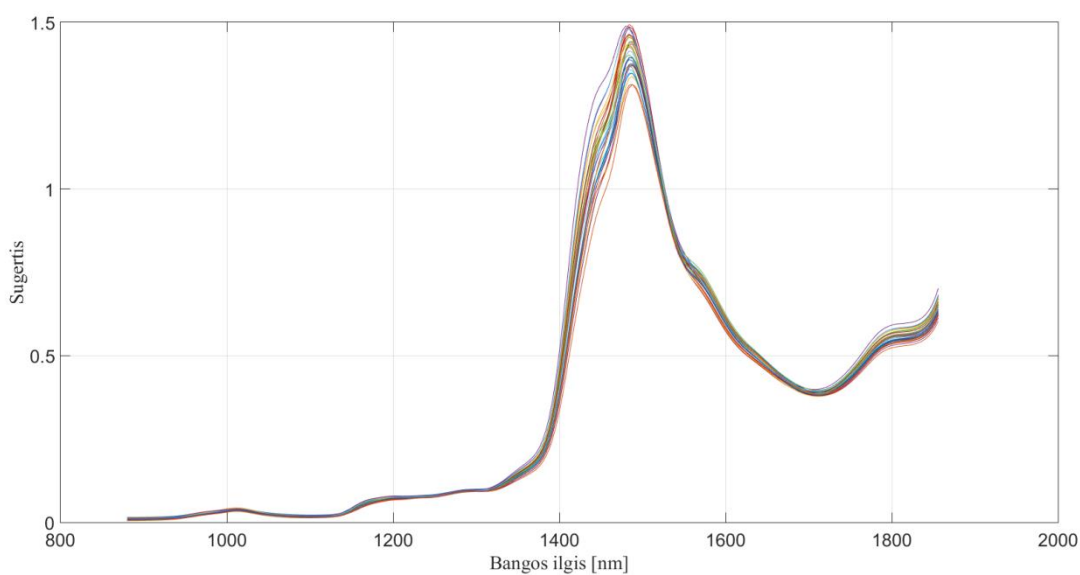
Čia X_{k1} yra pamatuoti kalibracinių mėginių spektrai, X_{k2} modelio sumodeliuoti kalibracinių mėginių spektrai, X_{v1} yra pamatuoti validacinių mėginių spektrai, X_{v2} modelio sumodeliuoti validacinių mėginių spektrai.

Ši tikslo funkcija optimizacijos metu mažėja, kol pasiekiamas vienas iš konvergavimo (sustabdymo) optimizacija yra sustabdoma. Nusprendus kiek kintamųjų bus naudojama modelio kūrime buvo sukurtas modelis, kuris leidžia apskaičiuoti visų 4 turimų medžiagų koncentracijas. Pirmiausia buvo modeliuojama su visų trisdešimties mėginių duomenimis, tačiau pastebėjus, kad keletas mėginių turi didelį svorį modelyje ir taip pat turi dideles paklaidas, buvo nuspręsta pradines šių mėginių koncentracijas leisti modeliui spėti pačiam jų tiksliai ir griežtai nenurodant. Taigi modelis buvo sukurtas su dvidešimt šešiomis apibrėžtomis koncentracijų ir spektrų poromis ir keturiomis poromis, kur koncentracijos griežtai neapibrėžtos.

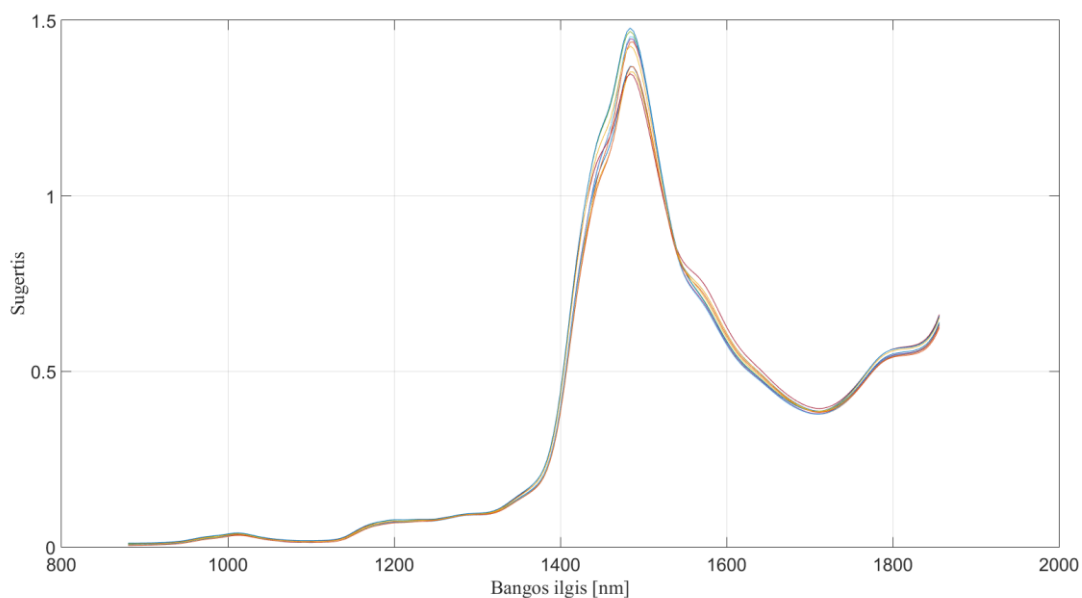
3 Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Karbamido amonio nitrato trąšų sugerties spektrų gavimas

Paruoštų trisdešimt skirtingų koncentracijų tirpalų spektrinės charakteristikos buvo matuojamos spektrofotometru. Atlikus šį eksperimentą buvo matuojamos validacinių mėginių spektrinės charakteristikos. Gautieji spektrų rezultatai pavaizduoti 3.1 pav. ir 3.2 pav.



3.1 pav. Skirtingų kalibracinių mėginių sugerties spektrai NIR srityje



3.2 pav. Skirtingų validacinių mėginių sugerties spektrai NIR srityje

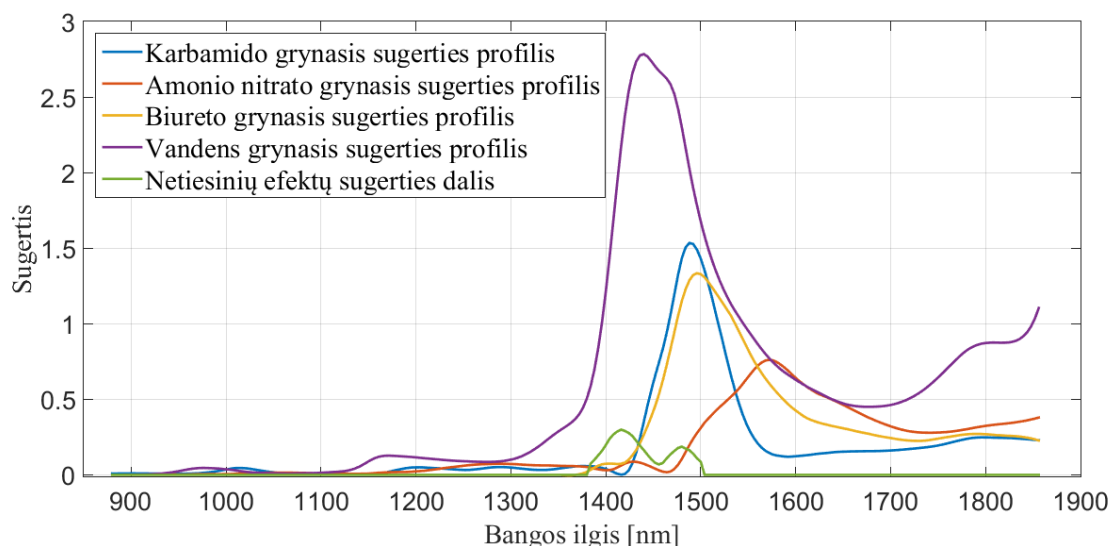
3.2 Karbamido amonio nitrato trąšų komponentų grynujų sugerties profilių modeliavimas

Panaudojant MCR–ALS algoritmą su aprašytais kintamaisiais ir kintamųjų ribinėmis vertėmis buvo sukurtas modelis, kuris gali rasti ryšį tarp karbamido amonio nitrato trąšų sudėties komponentų sugerties spektrų ir jų koncentracijų. Šį ryšį galima aprašyti kaip grynuosius komponentų sugerčių profilius (žr. 3.3 pav.). Biureto sugerties profilis yra šiek tiek pasislinkęs į ilgabangę bangos ilgių sritį lyginant su karbamido sugerties profiliu. Tačiau įvestas netiesinių efektų nario antrasis sugerties pikas sutampa su karbamido sugerties piku. Kadangi yra žinoma, kad biurete ir karbamide stebimo sugerties smailės maksimalios vertės bangos ilgis sutampa (1480 nm), tai gali reikšti, kad optimizacijos modelis dalį grynojo biureto sugerties spektro pernešė į netiesinį efektų narį, taip palengvindamas biureto koncentracijų spėjimą.

Vandens spektras taip pat yra nevisiškai tipinis. Jame yra matoma ir vandens sugertis (1450 nm) ir koncentruotose tirpaluose išryškėjanti OH grupių sugertis ties 1421 nm. Pirmoji netiesinių efektų komponento sugerties smailė taip pat yra ties 1421 nm. Tai rodo, kad mėginiuose yra OH grupių kurios daro įtaką matavimams, galimai formuoja vandenilines jungtis. Ši daroma įtaka yra dalinai perkeliama iš vandens grynojo sugerties profilio į netiesinių efektų kompensavimo narį. Turint medžiagų grynuosius sugerties profilius ir koncentracijas užtenka juos sudauginti norint gauti trąšų sugerties spektrus. Atitinkamai panaudojant mažiausių kvadratų regresiją nesunku suskaičiuoti ir koncentracijas turint trąšų sugerties spektrą:

$$C = ((SS^T)^{-1}SA^T)^T \quad (13)$$

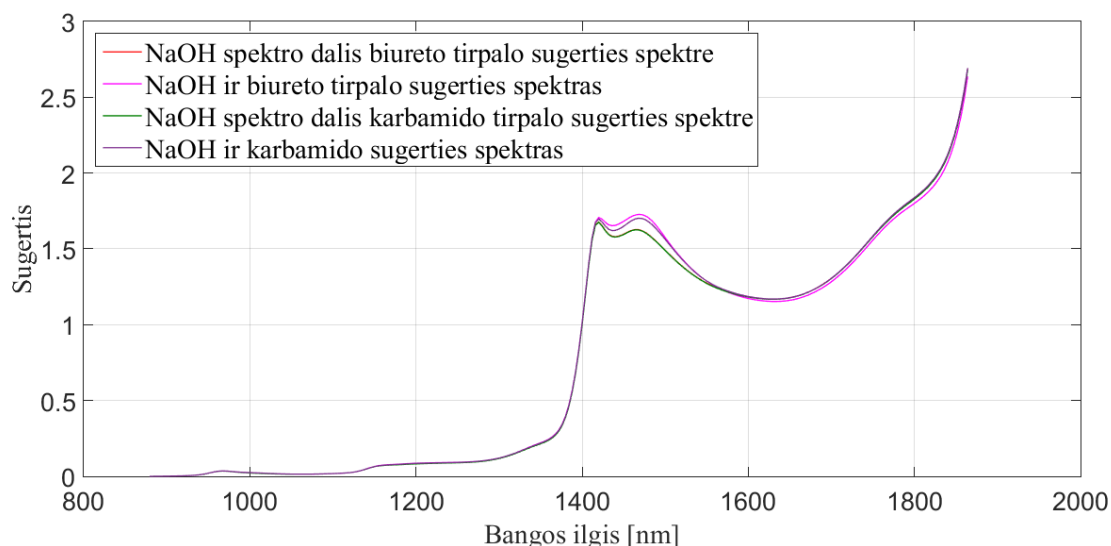
Čia S – grynujų sugerties profilių matrica, o A – medžiagos sugerties spektrai tiriamojoje srityje



3.3 pav. Nustatyti grynieji komponentų sugerties profiliai karbamido amonio nitrato trąšose

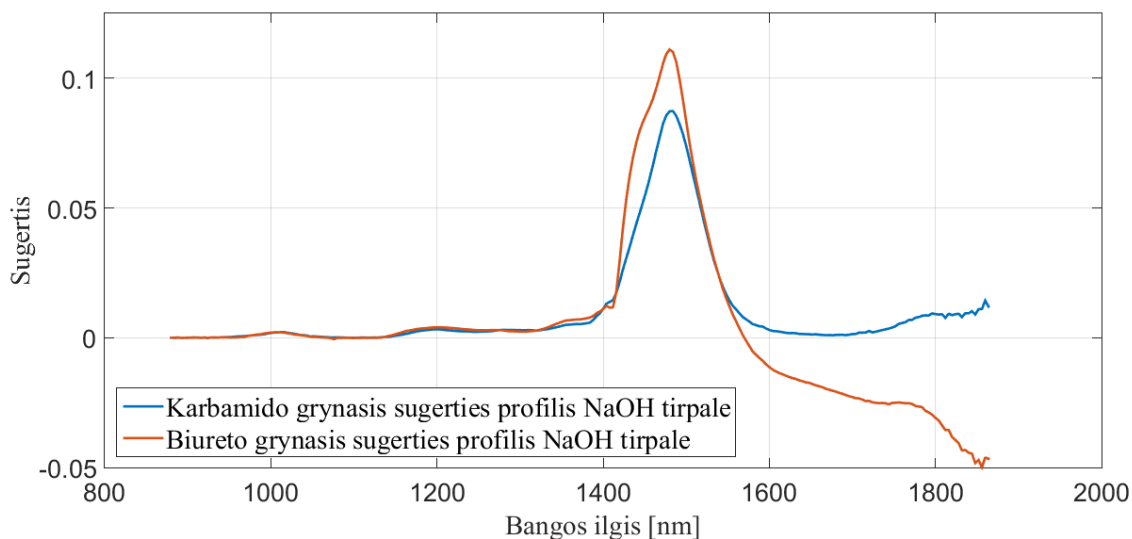
Labai svarbu suprasti, kad dėl koncentruotame KAS tirpale esančių medžiagų sąveikų šie grynieji profiliai yra tik šiai medžiagai būdingos formos ir tipo. KAS trąšose apskaičiuoti sugerties profiliai skiriasi nuo sugerties, kurią galime stebėti grynuose komponentuose. Siekiant suprasti ir įvertinti šį skirtumą buvo atlikti biureto ir karbamido sugerties matavimo eksperimentai kitose medžiagose.

Ekspimento metu karbamidas ir biuretas buvo ištirpdytas natrio šarme (NaOH). Natrio šarmas buvo pasirinktas, todėl kad jame galima ištirpdyti sąlyginai didelį biureto kiekį. Biuretas yra labai sunkiai tirpstanti medžiaga ir įprastuose tirpikliuose, kaip vandenyje, etanolyje, acetone, chloroforme kambario temperatūroje ištirpinti daugiau kaip 1–2% biureto yra labai sunku. Norint pagreitinti tirpimo procesą ir ištirpdyti didesnę kiekį yra galima paruoštą tirpalą maišyti, kaitinti arba naudoti ultragarsą. Kaitinant didelėje temperatūroje ar naudojant ultragarsą gali atsirasti komponentų koncentracijų pakitimų dėl molekulių skilimo ar geometrijos kitimų. Natrio šarme yra galima ištirpinti biuretą kambario temperatūros sąlygomis. Ekspimentui buvo paruošti 4,33% biureto tirpalas ir 4,45% karbamido tirpalas. Šie tirpalai ir grynas bazinis NaOH tirpalas buvo matuoti spektrofotometru 880–1864 nm intervale. Tada buvo gauti NaOH šarmo spektrinės komponentės biureto ir karbamido tirpaluose atitinkamai padauginus gryno NaOH sugerties spektrus iš jo masės dalies koncentracijų karbamido ir biureto tirpaluose (žr. 3.4 pav). Kadangi NaOH dalis tarp biureto ir karbamido tirpalų skiriasi tik 0,12% paveiksle atvaizduotos priklausomybės skyros neužtenka išskirti abu šiuos spektrus, jie vienas su kitu persidengia.



3.4 pav. Karbamido ir biureto tirpalų natrio šarme sugertis artimojoje infraraudonojoje srityje

Atlikus aritmetinę operaciją t.y. iš biureto ir karbamido tirpalų sugerties spektrų atėmus NaOH spektro komponentes yra gaunami biureto ir karbamido grynieji sugerties profiliai natrio šarmo tirpale (žr. 3.5 pav.). Yra galima stebėti, kad smailės maksimumas tiek biurete, tiek karbamide yra ties 1480 nm. Kaip ir KAS trąšose grynųjų sugerties profilių forma skiriasi, tačiau NaOH šarme biuretas yra pasislinkęs į trumpesnių bangos ilgių pusę.

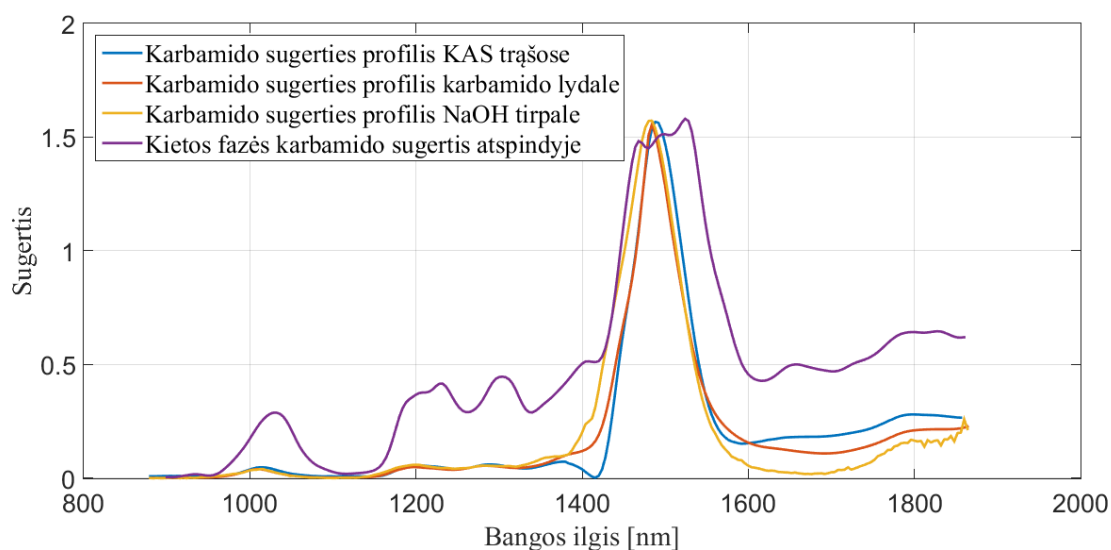


3.5 pav. Biureto ir karbamido grynieji sugerties profiliai natrio šarmo tirpale

Optimizacijos metu gautą karbamido grynąjį sugerties profilį taip pat galima palyginti su eksperimentiškai gautais karbamido sugerties profiliais (žr. 3.6 pav). Karbamido trąšų gamybos procese šis junginys yra naudojamas aukštoje temperatūroje – lydalo pavidalo. Karbamido lydalas turi skystą ir matomojoje srityje optiškai skaidrų pavidalą. Šis junginys lydosi apie 133°C temperatūroje. Norint gauti karbamido lydalo sugerties spektrą jis buvo patalpintas į uždara 4 mm

storio kiuvetė, kuri savo viduje palaiko aukštą slėgį ir neleidžia į aplinką išsiskirti lydymosi metu susidarančioms dujoms. Tada kiuvetė talpinama į spektrofotometro matavimo celėje sumontuotą šilumos palaikymo mazgą ir atliekamas sugerties matavimas 880–1864 nm srityje. Nors karbamido lydymosi metu susidaro azoto ir amoniako dujos, karbamido lydalas yra artimiausias junginys grynajam karbamidui, kuriam yra tinkamas sugerties įvertinimas iš pralaidumo matavimo. Karbamido lydalo sugerties spektre yra matomas aiškus smailės poslinkis į trumpesnių bangų sritį, lyginant su KAS tirpale esančio karbamido spektru. Yra didelė tikimybė, kad šis poslinkis atsiranda dėl matavimo sąlygų – didelio temperatūrų skirtumo tarp lydalo ir KAS trašų.

Gryno kristalinio karbamido sugertis taip pat buvo pamatuota naudojant „PerkinElmer UV/VIS/NIR spectrometer Lambda 1050“. Šiame spektrofotometre galima patalpinti integruojančią sferą ir atlikti matavimus atspindyje. Karbamidas buvo susmulkintas kavamale ir suslėgtas stūmokliu į matavimui skirtą lėkštę. Galima pastebėti, kad matuojant atspindyje karbamido sugerties smailė ties 1480 nm išplatėja skyla į kelias sugerties smailes, kas yra būdinga kristalinei karbamido struktūrai [X]. Sugerties matavimus atspindyje labai stipriai veikia, dalelių sklaida, kurią nulemia dalelių dydis ir jų suslėgimo laipsnis. Šiuos parametrus įvertinti nėra paprasta, o jų įtaka yra matoma sugerties profilio pasiskirstyme, kuriame stipriai išryškėja mažesnės sugerties smailės, kurių intensyvumas yra kelis kartus didesnis už intensyvumus skystoje terpėje.

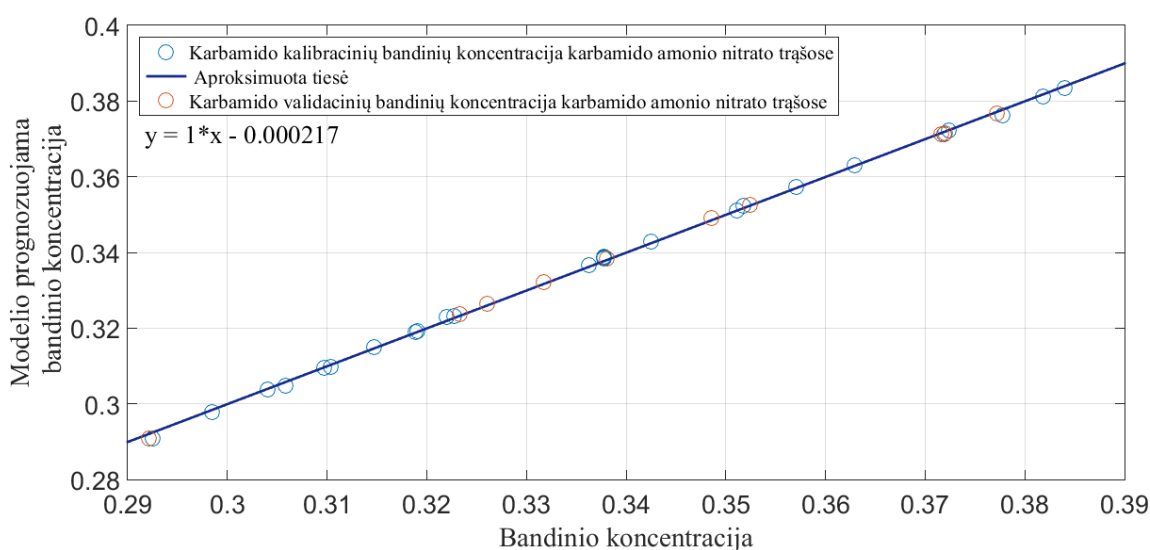


3.6 pav. Karbamido grynieji sugerties spektrai, skirtingose bandinių terpėse, būsenose

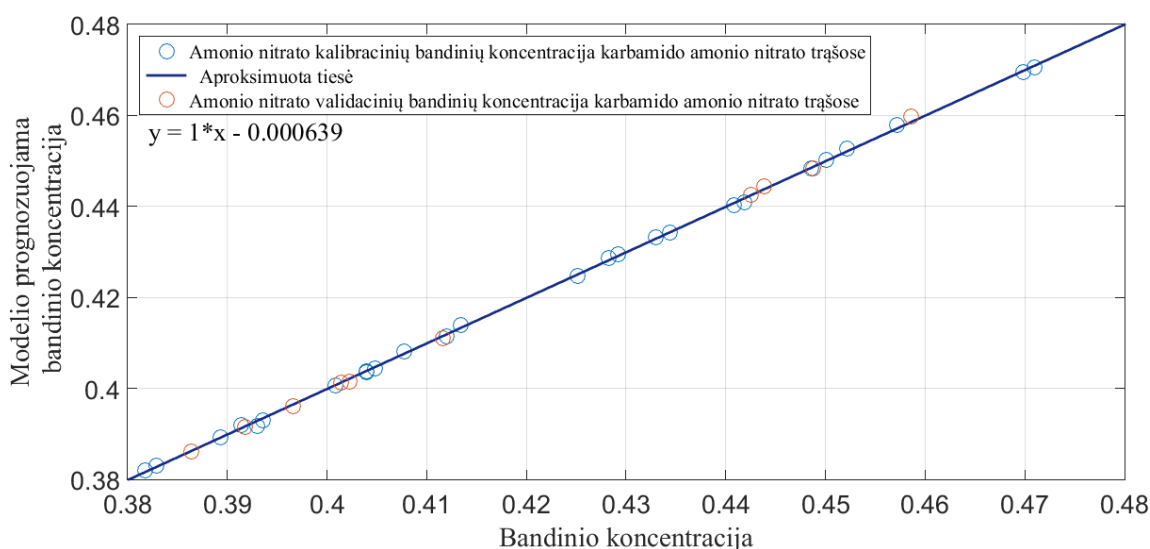
3.3 Kalibracinio modelio tikslumo įvertinimas

Iš spektrinių duomenų gautas tūrinės koncentracijas yra galima paversti į masės dalies koncentracijas, kas leidžia palyginti modelio prognozuojamas koncentracijas su mėginių gamybos metu fiksuotomis koncentracijomis. Teorinė šių duomenų priklausomybė yra tokia, kai abscisių

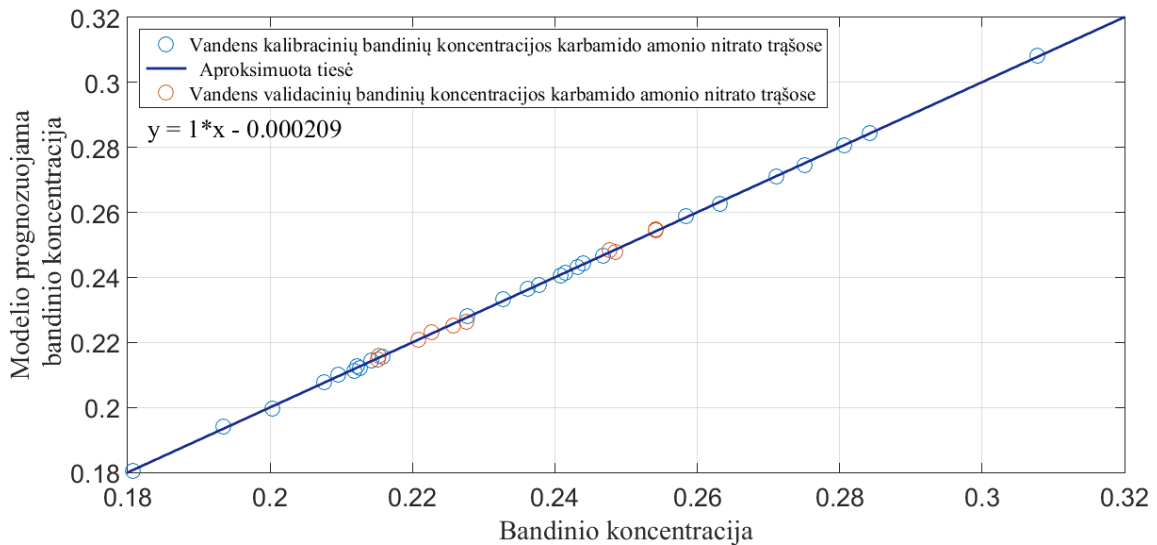
ašies vertės yra lygios ordinačių ašies vertėms. Gautos tiesinės aproksimacijos labai gerai atitinka teorinį modelį karbamido, amonio nitrato ir vandens koncentracijoms spėti ir prasčiau biureto atveju (žr. 3.7–3.10 pav.). Tam įtaką daro ir atvaizdavimo principas, biureto koncentracijos kinta tik 1% ribose, o likusių medžiagų koncentracijos kinta apie 10% ribose. Taigi įnešant vienodą paklaidą į biureto koncentracijos prognozavimą ir likusių medžiagų koncentracijų prognozavimą biurete gaunamos didesnės santykinės paklaidos lyginant su medžiagos koncentracijos verte. Galima pastebėti, kad validacinių mėginių nuspėjamos koncentracijos gerai koreliuoja su aproksimuota kalibracinių mėginių kreive.



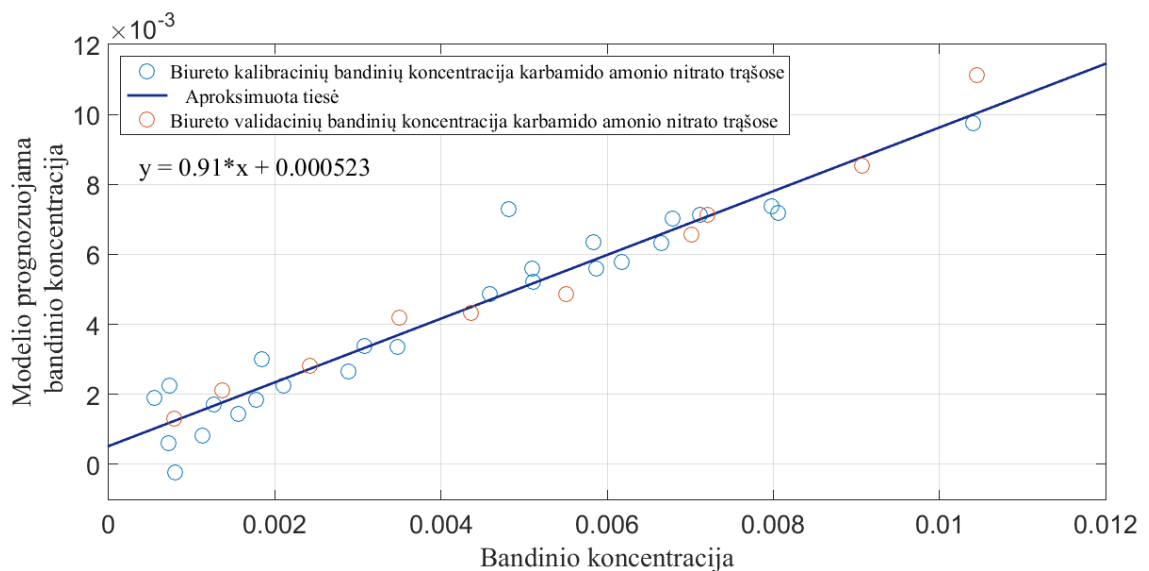
3.7 pav. Karbamido koncentracijų modelio atitikimas paruoštų tirpalų koncentracijų vertes



3.8 pav. Amonio nitrato koncentracijų modelio atitikimas paruoštų tirpalų koncentracijų vertes



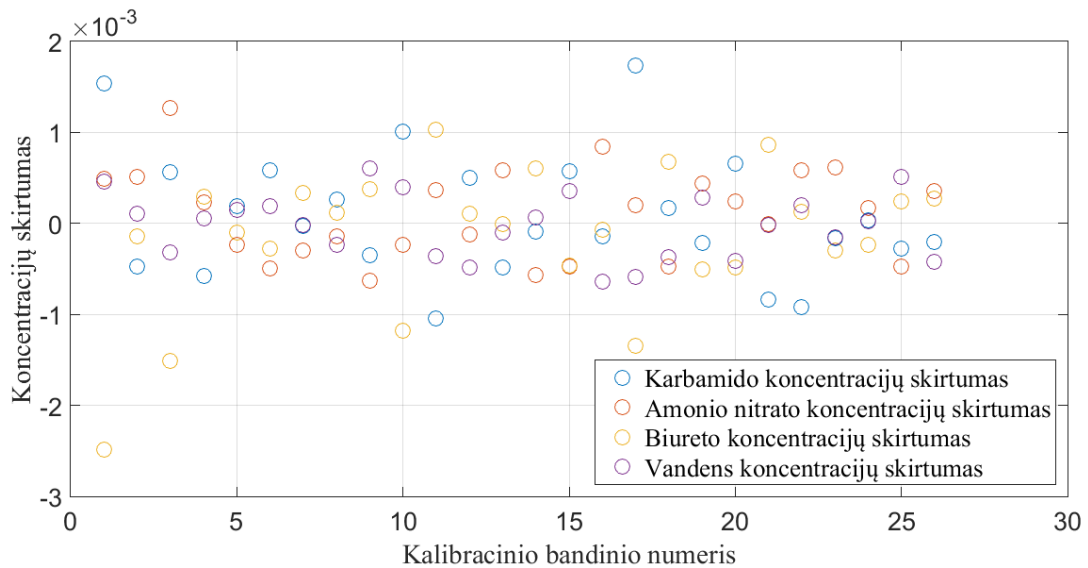
3.9 pav. Vandens koncentracijų modelio atitikimas paruoštų tirpalų koncentracijų vertes



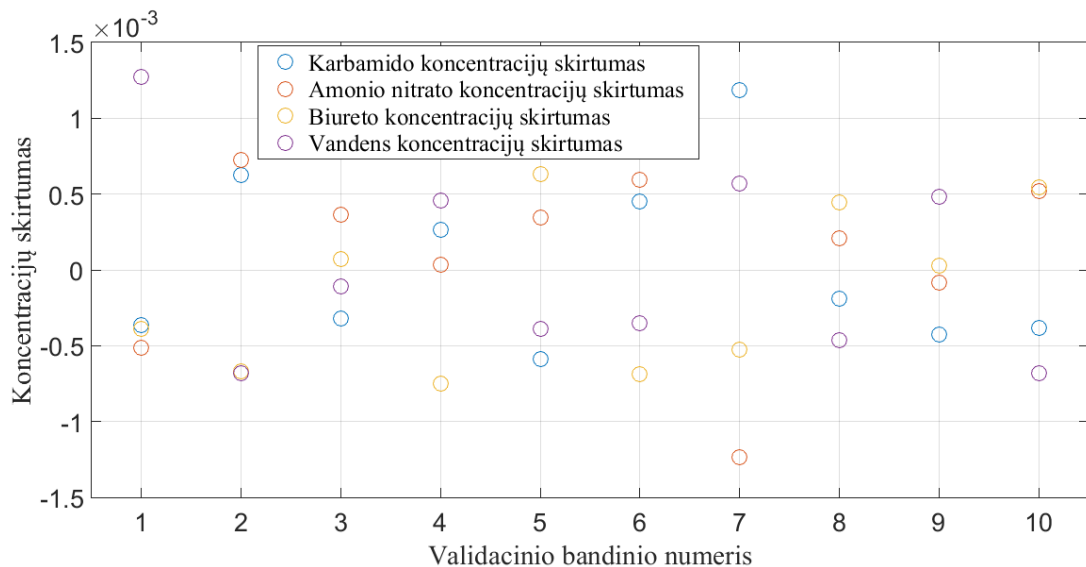
3.10 pav. Biureto koncentracijų modelio atitikimas paruoštų tirpalų koncentracijų vertes

Norint geriau įvertinti, modelio tikslumą ir daromas paklaidas yra galima apskaičiuoti skirtumą tarp mėginių gaminimo metu fiksuotų koncentracijų, kurioms buvo atliktos karbamido kiekio biurete, biureto kiekio karbamide ir vandens kiekio amonio nitrato korekcijos ir modelio suskaičiuotų koncentracijų (žr. 3.11 – 3.12 pav.). Prognozuojamų koncentracijų masės dalies vertės daugumoje mėginių skiriasi nuo pradinių mėginio koncentracijų apie 0,1%, o likusios mėginių dalies šis skirtumas siekia 0,2%. Kadangi modelio optimizacijoje į minimizuojamo parametro vertę buvo įtraukti ir validacinių mėginių įverčiai didelio skirtumo tarp kalibracinių taškų ir validacinių taškų nėra matoma. Šio validacinių taškų duomenų rinkinio mėginio ir modelio prognozuojamų koncentracijų skirtumai apsiriboja 0,15%. Paklaidų išsibarstymas yra atsitiktinis (gerai atitinka

normalųjį Gauso skirstinį) aplink nulinį tašką ir nėra įžvelgiama sisteminių paklaidų, kas reiškia, kad išmodeliavimas geras (modelis validus), nestebime jokių likusių neišmodeliuotų netiesiškumų ar kitokių efektų.



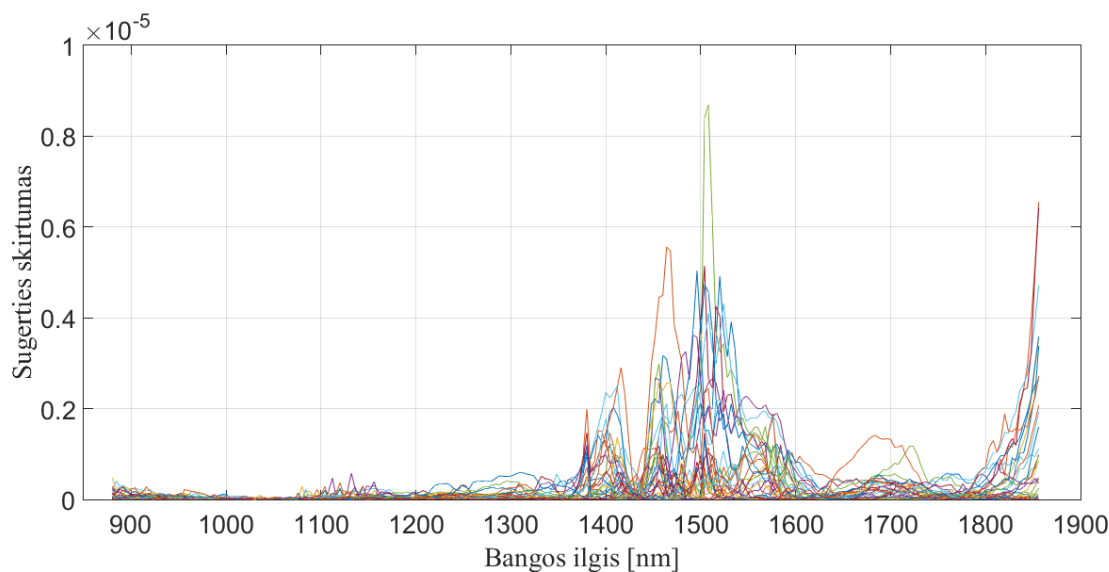
3.11 pav. Kalibracinių mėginių koncentracijų ir modelio prognozuojamų koncentracijų skirtumas



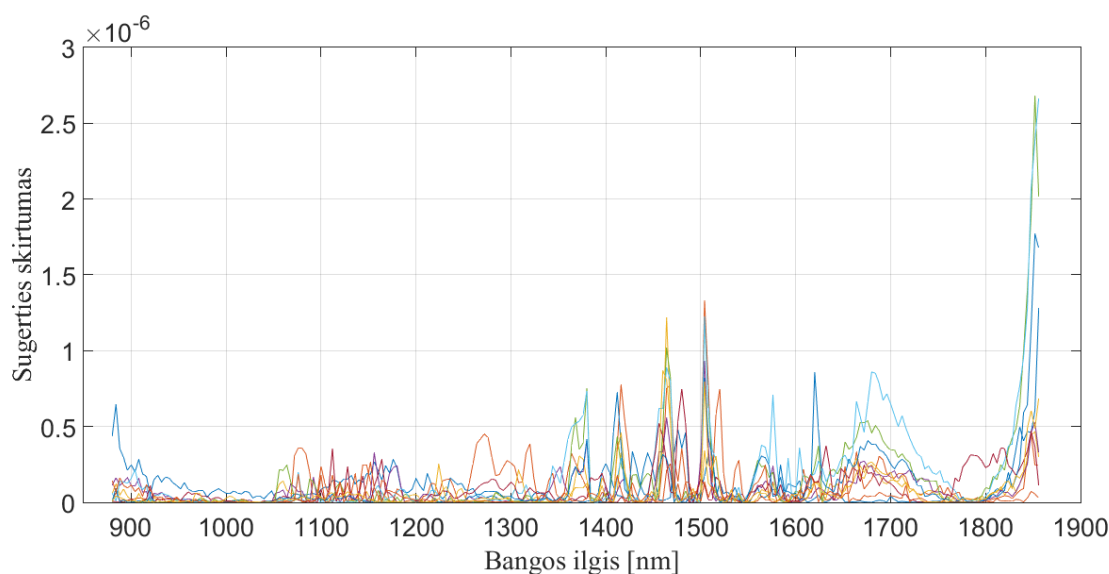
3.12 pav. Validacinių mėginių koncentracijų ir modelio prognozuojamų koncentracijų skirtumas

Kitas būdas įvertinti modelio tikslumą yra suskaičiuoti, kaip atrodytų karbamido amonio nitrato spektrai suformuojant juos iš grynujų medžiagų profilių ir prognozuojamų medžiagų koncentracijų. Iš prognozuojamų duomenų gavus spektrus juos galima atimti iš spektrofotometru pamatuotų spektrų. Tam, kad gauti tik teigiamas vertes yra skaičiuojamas šio skirtumo kvadratas (žr. 3.13–3.14 pav). Didžiausi skirtumai tarp šių spektrų pasireiškia tose spektro srityse, kuriose pasireiškia karbamido amonio nitrato trąšų sugertis (1350 nm – 1600 nm ir 1800 – 1856 nm). Nors modelyje

naudojama ilgesnių bangos ilgių spektro srities riba ir buvo sumažinta nuo 1900 nm iki 1856 nm šioje srityje atsiranda, palyginti su kitomis spektro dalimis, didelės paklaidos. Reikia pabrėžti, kad šioje spektro dalyje (1800 – 1856 nm) iš keturių tiriamųjų komponentų stipriai pasireiškia tik vandens sugertis. Kadangi ši sritis savyje neturi spektrinės informacijos apie visas naudojamas medžiagas, o įneša didelę santykinę vertę, siekiant didinti modelio tikslumą yra galima atlikti skaičiavimus be 1800 – 1856 nm srities. Kadangi validacinių mėginių koncentracijų ir prognozuojamų koncentracijų skirtumas yra mažesnis už kalibracinių mėginių koncentracijų skirtumus atitinkamai ir spektrų skirtumai yra mažesni naudojant validacinius mėginius.



3.13 pav. Pamatotų spektrų ir iš sumodeliuotų parametų suskaičiuotų spektrų skirtumas kalibraciniuose mėginiuose



3.14 pav. Pamatotų spektrų ir iš sumodeliuotų parametų suskaičiuotų spektrų skirtumas validaciniuose mėginiuose

Pagrindiniai eksperimento rezultatai ir modeliuotų vyksmų išvados

- Parodyta, kad esant koncentruotiems tirpalams, artimojoje infraraudonojoje srityje pasireiškia netiesiniai efektai, formuojasi vandeniliniai ryšiai tarp molekulių ir todėl atliekant kalibracinius MCR skaičiavimus reikia papildomos spektrinės komponentės netiesiniams efektams modeliuoti.
- Parodyta, kad gryųjų medžiagų sugerties profiliai priklauso nuo terpės kurioje jie yra, medžiagos fazinės būsenos ir temperatūros.
- Parengtas kalibracinis modelis tinkamas karbamido amonio nitrato trąšų sudedamųjų dalių koncentracijoms nustatyti.
- Šis kalibracinis modelis yra tinkamas įdiegti į pramoninį linijos tipo spektrinį analizatorių ir kontroliuoti linijos proceso kokybę karbamido amonio nitrato trąšų gamyboje.
- Nors biureto mėginiuose yra iki 1%, o sugerties smailės padėtis stipriai sutampa su karbamido sugertimi, kurio trąšose yra apie 35%, kalibracinis modelis gerai išskiria biureto komponentę ir nuspėja šios medžiagos koncentracijas tokiu pat tikslumu, kaip ir likusių trijų komponentų.
- Biureto santykinės paklaidos dėl jo mažos koncentracijos mėginiuose išlieka didžiausios iš keturių komponentų.

Literatūra

- [1] J. D. S. Goulden, D. J. Manning, Infra-red spectroscopy of inorganic materials in aqueous solution. *Spectrochim. Acta A.* **23A**, 2249–2254 (1967).
- [2] T. J. Farrell, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties in vivo, *Med. Phys.* **19**, 879–888 (1992).
- [3] R. ChRoberto, A. Ousama, J. B. Irving. Analytical model of light reflectance for extraction of the optical properties in small volumes of turbid media. *Appl. Opt.* **46**(29), 7317–7328 (2007).
- [4] G. Zonios, L. T. Perelman, V. Backman, R. Manoharan, M. Fitzmaurice, J. Van Dam, and M. S. Feld, “Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo,” *Appl. Opt.* **38**, 6628–6637 (1999).
- [5] M. Hiraoka, M. Firbank, M. Essenpreis, M. Cope, S. R. Arridge, P. van der Zee, and D. T. Delpy, “A Monte Carlo investigation of optical pathlength in inhomogeneous tissue and its application to near-infrared spectroscopy,” *Phys. Med. Biol.* **38**, 1859–1876 (1993).
- [6] P. Marquet, F. Bevilacqua, C. Depeursinge, E. B. de Haller. Determination of reduced scattering and absorption coefficients by a single chargecoupled-device array measurement, part I: comparison between experiments and simulations. *Opt. Eng* **34**(7), 2055–2063 (July 1995).
- [7] T. J. Farrell, M. S. Patterson. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo. *Med. Phys.* **19**(4) 879–888 (1992).
- [8] Th. Papaioannou, N. W. Preyer, Q. Fang, A. Brightwell, M. Carnohan, G. Cottone, R. Ross, L. R. Jones, and L. Marcu. Effects of fiber-optic probe design and probe-to-target distance on diffuse reflectance measurements of turbid media: an experimental and computational study at 337 nm. *Appl. Opt.* **43**(14) 2846–2860 (2004).

- [9] Jiantang Sun, Kun Fu, Adrien Wang, Alex W. H. Lin, Urs Utzinger, and Rebekah Drezek. Influence of fiber optic probe geometry on the applicability of inverse models of tissue reflectance spectroscopy: computational models and experimental measurements. *Appl. Opt.* **45**(31) 8152–8162 (2006).
- [10] B. Yu, D. G. Ferris, Y. Liu, V. K. Nagarajan. Emerging Optical Techniques for Detection of Oral, Cervical and Anal Cancer in Low–Resource Settings. *Austin J Biomed Eng* 1(2): 1007 (2014).
- [11] A. Dubietis. *Netiesinė optika*, 1st ed., 176 (VU leidykla, 2011).
- [12] H. Martens, T. Naes. *Multivariate Calibration*, 1st ed., 397 (John Wiley & Sons, 1989)
- [13] P. Geladi, B. Kowalski, Partial least square regression: A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* **35** 1–17 (1986).
- [14] I.E. Frank, J.H. Friedman, A statistical view of chemometrics regression tools. *Technometrics*, **35** 109–148 (1993).
- [15] P. Gemperline. *Practical Guide to Chemometrics* 2nd ed., 520 (Taylor & Francis group, 2006)
- [16] B. Stuart. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* 1st ed., 203 (John Wiley & Sons, 2004)
- [17] J. Workman Jr., L. Weyer. *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*, 2nd ed., 302 (Taylor & Francis group, 2012)
- [18] K.I. Ramachandran, G. Deepa, K. Namboori. *Computational Chemistry and Molecular Modelling* 1st ed., 397 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008)
- [19] J. Hauke, T. Kossowski, Comparison of Values of Pearson’s and Spearman’s Correlation Coefficients on the Same Sets of Data. *Quaestiones Geographicae.* **30**(2) 87–93 (2011).

NEAR–INFRARED STUDY OF BIURET AND UREA IN UREA AMONIUM NITRATE FERTILIZER

Žilvinas Mačiulis

SUMMARY

The aim of this work is to investigate the possibility to determine the composition of urea ammonium nitrate fertilizer (UAN) using near–infrared (NIR) spectroscopy. The major goal is to create a calibration model which would be able to determine the concentrations of different compounds in the fertilizer with high degree of precision.

Urea ammonium nitrate fertilizer consists of four major compounds: urea, ammonium nitrate, biuret and water. It is worth noting that biuret is a side–product from the production of urea and is unwished component in UAN. The major challenge of this work is to be able to determine biuret concentration, which is only up to 1%. Biuret molecule vibrations possess high similarity to urea vibrations (35%) which makes it very hard to distinguish.

The range of forty samples with different concentrations were made and their absorptions spectra were investigated using a spectrophotometer in 0,88–1,90 μm wavelength region using a 2 mm width cuvette. Upon finishing the experiment the modeling using multivariate curve resolution (MCR) method was carried. Samples were divided into two groups. Thirty samples were used for calibration and ten for model validation. During the creation of the calibration model it was noticed that there is a need to add a fifth component to model parameters to account for non–linear effects such as hydrogen bond, temperature differences or different gas in the compound. After carrying optimization, model is capable of predicting all four components with 99,8–99,9% degree of precision. Absorption profiles of biuret and urea in UAN were compared with the profiles of biuret and urea absorption in other compounds like melted urea, solid urea or biuret–NaOH solution. This shows that same material is capable of having different absorption spectra depending on the state of matter and surrounding medium.

BIURETO IR KARBAMIDO SUGERTIES ARTIMOJOJE INFRARAUDONOJOJE SRITYJE ANALIZĖ KARBAMIDO AMONIO NITRATO TRĄŠOSE

Žilvinas Mačiulis

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas – ištirti teorines perspektyvas pramoninio spektrinio analizatoriaus panaudojimo sričiai, kuris būtų skirtas matuoti karbamido amonio nitrato trąšų (KAS) sudėčiai artimojoje infraraudonojoje srityje. Trąšų gamintojams tai yra aktualu, nes gaminamas produktas turi atitikti jam nustatomus reglamentus ir neviršyti nustatytų normų. Artimoji infraraudonoji sritis tampa vis populiareesnė dispersinių srautų analizatorių gamybai dėl palyginti žemos InGaAs detektorių kainos, galimybės turėti kelių milimetrų storio tiriamąją terpę ir plataus šviesos šaltinių pasirinkimo. Vienas pagrindinių uždavinių yra kalibracinio modelio parengimas, kuris galėtų iš jam užduoto spektro apskaičiuoti medžiagos koncentracijas kuo didesniu tikslumu.

Karbamido amonio nitrato trąšas sudaro keturios pagrindinės sudedamosios dalys: karbamidas, amonio nitratas, biuretas ir vanduo. Biuretas yra šalutinė medžiaga atsirandanti karbamido gamybos metu ir jos KAS trąšose yra tik iki 1%. Vienas pagrindinių iššūkių paruošti kokybišką kalibracinį modelį yra biureto spektrinių komponentų išskyrimas iš karbamido spektro, kuris sudaro apie 35% KAS. Dėl molekulių geometrijos panašumo abi šios medžiagos turi sugerties smaile ties 1,48 μm .

Ekspertas buvo atliktas panaudojant keturiasdešimt skirtingų koncentracijų tirpalų, kurių sugertis buvo matuojama 0,88–1,90 μm srityje naudojant 2 mm storio kiuvetę, pasitelkiant spektrofotometrą. Gautieji spektrai buvo apdorojami taikant daugialypių kreivių rezoliucijos (MCR) modelį ir buvo gautas kalibracinis modelis medžiagų koncentracijoms išskaičiuoti. Pagrindinis modelio rezultatas – grynujų komponentų sugerties profiliai, kurie leidžia panaudojus mažiausių kvadratų regresijos operaciją iš sugerties spektrų nuspėti KAS sudėtį. Gautas kalibracinis modelis sugeba prognozuoti visų keturių komponentų koncentracijas 99,8–99,9% procentų tikslumu. Biureto ir karbamido grynujų komponentų sugerties profiliai yra lyginami su atitinkamais sugerties profiliais kituose junginiuose ir agregatinėse būsenose, kaip lydytame karbamide, kietos fazės karbamide ar NaOH tirpale. Tai atskleidžia, kad grynujų komponentų sugerties profiliais didelę įtaką daro terpė kurioje yra tiriamoji medžiaga.

I Priedas

1 lentelė. Sugeneruotos procentinės koncentracijos ir paruoštų bandinių koncentracijos

Sugeneruotų koncentracijų vertės				Pagamintų bandinių koncentracijos			
Karbami- das n, %	Amonio nitratas n, %	Biuretas n, %	Vanduo n, %	Karbami- das n, %	Amonio nitratas n, %	Biuretas n, %	Vanduo n, %
37.8323	41.5065	0.4234	20.2378	37.8323	41.5065	0.4234	20.2378
33.1518	42.7121	0.0171	24.1190	33.1518	42.7121	0.0171	24.1190
32.3315	41.3060	0.1587	26.2038	32.3315	41.3060	0.1587	26.2038
29.8965	40.2136	0.0237	29.8661	29.8965	40.2136	0.0237	29.8661
35.2319	41.2967	0.0546	23.4168	35.2319	41.2967	0.0546	23.4168
30.4526	46.0900	0.4654	22.9920	30.4526	46.0900	0.4654	22.9920
37.2510	41.7976	0.4014	20.5500	37.2510	41.7976	0.4014	20.5500
31.9114	44.3517	0.6253	23.1115	31.9332	44.4194	0.6196	23.0277
36.8661	39.4589	0.0114	23.6636	37.3021	39.1903	0.0095	23.4981
33.7055	46.9563	0.5765	18.7618	33.6803	46.9251	0.5674	18.8271
33.2114	44.2500	0.4016	22.1370	33.1516	44.2823	0.3913	22.1748
30.6131	44.0443	0.1448	25.1978	30.6334	44.0547	0.1343	25.1776
33.8638	43.5051	0.0243	22.6068	33.8376	43.4540	0.0236	22.6848
38.4561	39.1128	0.1141	22.3170	38.4598	39.0919	0.0923	22.3560
33.8013	45.1511	0.6637	20.3839	33.8308	45.1747	0.6633	20.3312
36.5670	40.1443	0.7576	22.5312	36.3463	40.2595	0.7453	22.6489
31.0434	42.4836	0.0653	26.4077	31.0843	42.4311	0.0751	26.4095
36.2405	45.2088	0.1245	18.4263	36.3497	45.1872	0.1178	18.3454
29.2336	45.9584	0.0097	24.7982	29.3026	45.9275	0.0060	24.7639
31.0460	46.4340	1.0000	21.5200	31.0121	46.4630	1.0009	21.5240
34.0193	40.7769	0.2404	24.9634	33.9767	40.8921	0.2326	24.8986
32.1509	46.5473	0.7904	20.5114	32.0974	46.5763	0.7959	20.5303
34.3708	48.0399	0.5539	17.0354	34.3038	48.1767	0.5319	16.9877
38.2621	40.9250	0.4737	20.3392	38.2424	40.9883	0.4508	20.3184
31.9636	40.0014	0.7871	27.2479	32.2338	39.9350	0.7714	27.0599
33.7844	42.1730	0.2885	23.7542	33.8195	42.1450	0.3065	23.7290
31.8925	40.3603	0.2682	27.4791	31.9452	40.3028	0.2684	27.4837
35.0366	44.5397	0.6583	19.7653	35.1541	44.5543	0.6392	19.6523
35.7958	43.9221	0.2186	20.0635	35.7491	43.9614	0.2440	20.0456
31.4537	47.9273	0.5599	20.0592	31.5115	48.0701	0.5516	19.8668

2 Lentelė: Sugeneruotų koncentracijų ir paruoštų mėginių koreliacijos koeficientų vertės

Sugeneruotų koncentracijų koeficientų vertės				Pagamintų mėginių koncentracijų koeficientų vertės			
Karbami- das	Amonio nitratas	Biuretas	Vanduo	Karbami- das	Amonio nitratas	Biuretas	Vanduo
1	-0.3959	-0.0271	-0.5151	1	-0.4025	-0.0446	-0.5040
-0.3959	1	0.3790	-0.5790	-0.4025	1	0.3907	-0.5838
-0.0271	0.3790	1	-0.4081	-0.0446	0.3907	1	-0.4063
-0.5151	-0.5790	-0.4081	1	-0.5040	-0.5838	-0.4063	1

II Priedas

3 lentelė: Optimizacijos metu nustatytos biureto kiekio karbamide ir karbamido kiekio biurete vertės

	Pirminis spėjimas	Optimizuota vertė
Biureto koncentracija pirmame karbamido reagento pakuotėje	0,00150	0,00167
Biureto koncentracija antroje karbamido reagento pakuotėje	0,00150	0,00133
Karbamido koncentracija biureto reagento pakuotėje	0,01001	0,01155

4 lentelė: Optimizacijos metu nustatytos kalibraciniuose bandiniuose esančios vandens kiekio amonio nitrato koncentracijų vertės

Bandinio numeris	Pradinis spėjimas	Optimizuota vertė	Bandinio numeris	Pradinis spėjimas	Optimizuota vertė
1	0,024718	0,024691	21	0,024718	0,024718
2	0,024718	0,024718	22	0,024718	0,024718
3	0,024718	0,022032	23	0,024718	0,022471
4	0,024718	0,022714	24	0,024718	0,022042
5	0,024718	0,021731	25	0,024718	0,025104
6	0,024718	0,023527	26	0,024718	0,022444
7	0,024718	0,02459	27	0,024718	0,023402
8	0,024718	0,025215	28	0,024718	0,024955
9	0,024718	0,023123	29	0,024718	0,025838
10	0,024718	0,025651	30	0,024718	0,024203
11	0,024718	0,024718	31	0,024718	0,024861
12	0,024718	0,025822	32	0,024718	0,024124
13	0,024718	0,021546	33	0,024718	0,024512
14	0,024718	0,023383	34	0,024718	0,024809
15	0,024718	0,02424	35	0,024718	0,024807
16	0,024718	0,027866	36	0,024718	0,024511
17	0,024718	0,025764	37	0,024718	0,024772
18	0,024718	0,022215	38	0,024718	0,02466
19	0,024718	0,023304	39	0,024718	0,025252
20	0,024718	0,026779	40	0,024718	0,024203

Galima pastebėti, kad gautos koncentracijų vertės neturi didėjimo tendencijos, nors santykinė drėgmė ruošiant vėlesnius bandinius naudojamame reagente didėjo. Taip galėjo įvykti, todėl kad drėgmė reagente pasiskirsto netolygiai – reagento pakuotės paviršiuje esantis amonio nitratas absorbuoja daugiau drėgmės nei apačioje esantis, o dėl atsitiktinio reagento dozavimo, į mėginį patenka skirtingas vandens kiekis. Kaip jau minėta 3.2 skyrelyje, buvo optimizuojamos ir validacinių mėginių koncentracijos. Jos atitinka 31–40 bandinio numerį.