



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032197

(51)⁷ C05C 11/00; C05B 19/00

(13) B

(21) 1-2015-02380

(22) 07/12/2012

(86) PCT/IB2012/057080 07/12/2012

(87) WO2014/087202 12/06/2014

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/02/2016 335A

(73) SRI LANKA INSTITUTE OF NANOTECHNOLOGY (PVT) LTD. (LK)

Nanotechnology and Science Park, Mahenwatta, Pitipana, Homagama, Sri Lanka.

(72) KOTTEGODA, Nilwala (LK); PRIYADHARSHANA, Gayan (LK);

SANDARUWAN, Chanaka (LK); DAHANAYA, Damayanthi (LK);

GUNASEKARA, Sunanda (LK); AMARATUNGA, A. J. Gehan (LK);

KARUNARATNE, Veranja (LK).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PHÂN BÓN GIẢI PHÓNG CHẬM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng chậm dinh dưỡng đa lượng tới chỗ thực vật, phương pháp sản xuất chế phẩm phân bón giải phóng chậm và chế phẩm phân bón, trong đó chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ được hấp phụ trên bề mặt của các hạt nano hydroxyapatit phosphat. Chế phẩm phân bón này giải phóng chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ vào đất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp giải phóng chậm các chất dinh dưỡng trong nông nghiệp. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hạt nano hydroxyapatit phosphat hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ và phương pháp sử dụng các hạt nano hydroxyapatit phosphat hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ này làm phân bón giải phóng chậm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phân bón bán trên thị trường chứa các chất dinh dưỡng đa lượng và các dinh dưỡng vi lượng thiết yếu cho sự phát triển của thực vật và các chất dinh dưỡng đa lượng được sử dụng bởi thực vật với lượng tương đối lớn. Như được xác định trong bản mô tả này, các chất dinh dưỡng đa lượng trước tiên là nitơ (N), phospho (P) và kali (K) trong khi canxi (Ca), magiê (Mg) và lưu huỳnh (S) là các chất dinh dưỡng đa lượng xếp thứ hai. Tất cả sáu chất dinh dưỡng này là quan trọng cho sự phát triển của thực vật.

Như được xác định trong bản mô tả này, các chất dinh dưỡng vi lượng với lượng nhỏ cho sự phát triển của thực vật là bo (B), clorua (Cl), mangan (Mn), sắt (Fe), kẽm (Zn), đồng (Cu), molypden (Mo) và selen (Se).

Nitơ, phospho và kali (NPK), là được yêu cầu với lượng lớn cho thực vật, không phải luôn luôn có mặt một cách thỏa đáng trong đất tự nhiên để hỗ trợ cho sự phát triển duy trì của thực vật. Do đó, các chất dinh dưỡng đa lượng (NPK) thường có nhu cầu phải bổ sung từ bên ngoài thông qua phân bón. Các phân bón thông thường tan trong nước thường dẫn đến lượng lớn các chất dinh dưỡng đa lượng bị mất do rỉ qua đất hoặc bay hơi. Do đó, có nhiều sự quan tâm đến sự phát triển các loại phân bón giải phóng chậm giải phóng các chất dinh dưỡng đa lượng cho thực vật qua thời gian.

Ưu điểm của các loại phân bón giải phóng chậm là hiệu quả và chất lượng được cải thiện khi phân bón được giải phóng qua thời gian, do đó cải thiện lượng đủ của các chất dinh dưỡng đa lượng cần để có năng suất cây trồng cao hơn. Ngoài ra, các phân bón giải phóng chậm dẫn đến tổn hại với môi trường giảm đi do việc rỉ các chất dinh dưỡng đa lượng vào nước và phát ra dưới dạng khí, so với các phân bón tan trong nước

thông thường.

Các chất dinh dưỡng đa lượng trong các loại phân bón có thể được dùng cho đất ở dạng rắn như bột hoặc dạng viên hoặc dạng phun. Sự hấp thu các chất dinh dưỡng đa lượng bởi thực vật cần được bổ sung bằng bổ sung từ bên ngoài vào đất một cách định kỳ. Nitơ là nguồn dinh dưỡng đa lượng chủ chốt trong nông nghiệp đặc biệt là cho các cây trồng thương mại như chè. Ví dụ, lượng lớn phân đạm được dùng cho đất trồng chè để cải thiện chất lượng và năng suất của lá tạo thành. Nghiên cứu ở Nhật Bản (*Yamada et al., Journal of Water and Environmental Technology, 7, 4, 331-340, 2009*) đã báo cáo rằng lượng lớn phân bón nitơ được dùng cho cây chè, tuy nhiên chỉ 12 % nitơ đưa vào được hấp thu bởi thực vật và phần còn lại bị thải ra môi trường. Do đó, một trong những vấn đề chưa được giải quyết của việc dùng phân bón là, liên quan tới lượng nitơ được dùng cho đất, hiệu quả sử dụng nitơ thấp (Nitrogen Use Efficiency - NUE) bởi cây trồng. Điều này là do lượng thừa nitơ, lên tới 70%, bị mất khi sử dụng phân bón truyền thống do việc ngấm, phát xạ và sự hợp nhất trong thời gian dài bởi các vi sinh vật trong đất. Do đó, việc cung cấp chất dinh dưỡng đa lượng nitơ là cấp bách để phòng sự giảm hiệu suất và lợi ích do sự thoái hóa và già hóa của cây chè (*Kamau et al., Field Crops Research 1, 108, 60-70, 2008*). Các nỗ lực để tăng NUE đã được tiến hành với sự thành công thấp.

Patent Mỹ số 6,261,997 B1 cấp cho Rubin và các đồng tác giả bộc lộ sự giải phóng chậm của thuốc trừ sâu được hấp phụ trên đất sét được biến đổi hữu cơ để phòng sự ngấm vào nước bề mặt và nước ngầm. Patent Mỹ số 4,219,349 cấp cho Bardsley bộc lộ chế phẩm hạt đất sét nung khô và dung dịch hoặc huyền phù chứa các chất dinh dưỡng vi lượng (Fe, Zn, Mn, Cu, B, Mo, Cl và S). Patent Mỹ số 4,849,006 cấp cho Milburn và các đồng tác giả bộc lộ chế phẩm giải phóng có kiểm soát của vật liệu hữu cơ hoạt tính sinh học được hấp phụ trên đất sét được biến đổi hữu cơ. Patent Mỹ số 6,821,928 B2 cấp cho Ruskin bộc lộ phương pháp giảm tốc độ khuếch tán của vật liệu giải phóng chậm thông qua các polyme và quy trình tạo thiết bị tưới nhỏ giọt với sự kiểm soát thời gian dài sự phát triển của rễ. Ngoài ra, patent còn bộc lộ vật liệu hoạt tính sinh học như chất diệt cỏ được đưa vào trong hạt đất sét cỡ nano để bảo vệ chống lại sự xâm nhập vào rễ trong các ứng dụng tưới nhỏ giọt. Patent Mỹ số 3,902,886 cấp cho Banin và các đồng tác giả bộc lộ đất sét được gắn chất dinh dưỡng vi lượng để cấp chất dinh dưỡng vi lượng cho thực vật. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số

2009/0169524 A1 của Kalpana và các đồng tác giả bộc lộ các nanocomposit trên cơ sở polyme sinh học của chitosan, montmorillonit (MMT) và hydroxyapatit cho sự phát triển của xương trong các ứng dụng y học.

Có nhu cầu về các dung dịch để cung cấp các chế phẩm chất dinh dưỡng đa lượng giải phóng chậm cho các ứng dụng cho sự phát triển của thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ được hấp phụ trên các hạt nano HAP và được dùng làm phân bón. Các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng bộc lộ trong bản mô tả này, khi áp dụng cho môi trường đất và nước, giải phóng chậm chất dinh dưỡng đa lượng vào đất. Môi trường đất đóng vai trò làm kênh để vận chuyển chất dinh dưỡng đa lượng như urê tới rễ thực vật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: là hình ảnh SEM phương án của sáng chế thể hiện các hạt nano HAP được hấp phụ urê được sản xuất bằng phương pháp mẫu (a) khi được tổng hợp (b) sau 2 giờ tổng hợp, kết quả là mảnh rắn, thể hiện các hạt nano và cấu trúc dạng chuỗi hạt thu được do sự phát triển định hướng của các hạt nano, một cách tương ứng.

Fig.2: là hình ảnh SEM của phương án của sáng chế trong đó thể hiện các chế phẩm hạt nano HAP hấp phụ urê dùng cho lá được sản xuất với tỷ lệ HAP:Urê là (a) 1:1, (b) 1:3, (c) 1:4, (d) 1:5 và (e) 1:6.

Fig.3: là hình ảnh TEM của phương án của sáng chế trong đó (a) các hạt nano HAP được tổng hợp và (b) các hạt nano HAP hấp phụ urê được tổng hợp.

Fig.4: là hình ảnh SEM của phương án của sáng chế trong đó cấu trúc dạng chuỗi hạt của các hạt nano HAP-urê được tạo bởi phương pháp Sol-Gel.

Fig.5: biểu diễn tinh thể hạt nano HAP.

Fig.6: Biểu diễn sơ đồ sự phát triển định hướng của hạt nano giống hạt nano thành hạt dạng chuỗi hạt.

Fig.7: là hình ảnh SEM của các hạt nano HAP được tạo thành với tỷ lệ bổ sung axit phosphoric khác nhau là, (a) 250 ml phút⁻¹, (b) 70 ml phút⁻¹, (c) 20 ml phút⁻¹ và (d) 6 ml phút⁻¹.

Fig.8: là hình ảnh SEM của các hạt nano HAP được tạo ở các giá trị độ pH khác nhau là (a) 5, (b) 7, (c) 9 và (d) 11.

Fig.9: là hình ảnh SEM của các hạt nano HAP được tạo bởi (a) phương pháp thêm từng giọt và (b) phương pháp phun.

Fig.10: là hình ảnh SEM của các hạt HAP được tạo thành với tốc độ khuấy khác nhau là, (a) 100, (b) 200, (c) 300, (d) 400, (e) 600 và (f) 800 vòng/phút.

Fig.11: là hình ảnh SEM của các hạt nano HAP được tạo thành ở các nhiệt độ phản ứng khác nhau là (a) 10°C, (b) 25°C, (c) 70°C, (d) 85°C và (e) 100°C.

Fig.12: là hình ảnh SEM của các hạt nano HAP được tạo thành sử dụng (a) 0,6 M và (b) axit phosphoric cô đặc.

Fig.13: mẫu PXRD cho Urê, hạt nanocomposit Urê-HAP và hạt nano HAP theo một phương án của sáng chế.

Fig.14: mẫu khuếch tán electron của (a) các hạt nano HAP và (b) hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế.

Fig.15: Phổ FTIR của vùng giãn dài carbonyl của (a) các hạt nano HAP (b) hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế và (c) Urê.

Fig.16: Phổ FTIR của vùng giãn dài amin của (a) các hạt nano HAP (b) hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế và (c) Urê.

Fig.17: Phổ FTIR cho vùng giãn dài N-C-N của (a) các hạt nano HAP (b) hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế và (c) Urê.

Fig.18: phổ Raman của (a) Urê, (b) các hạt nano HAP và (c) hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế.

Fig.19: So sánh sự giải phóng của Urê, mảnh hạt nano Urê-HAP, bột hạt nano Urê-HAP và Urê và hạt macro HAP trong nước.

Fig.20: So sánh sự giải phóng trong nước của (a) Urê; hạt nanocomposit Urê-HAP theo một phương án của sáng chế với tỷ lệ HAP :Urê là (b) 1:1, (c) 1:3, (d) 1:4, (e) 1:5 và (f) 1:6 trong pha lỏng.

Fig.21: So sánh sự giải phóng của Urê và mảnh hạt nano Urê-HAP theo một phương án của sáng chế trong đất.

Fig.22: chiều cao cây lúa/cm ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.23: số chồi rễ trên một chậu ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.24: số ngày tính đến lúc ra hoa ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.25: số chùy trên một chậu ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.26: 1000 khối lượng hạt/g ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.27: số hạt mây trên một chậu ở các lần xử lý từ 1-4.

Fig.28: khối lượng hạt/g trên một chậu ở các lần xử lý từ 1-4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như xác định trong bản mô tả này, sự giải phóng chậm các chất dinh dưỡng đa lượng cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây một cách dần dần trong thời gian kéo dài. Như được mô tả trong bản mô tả này một cách chi tiết, thời gian kéo dài này có thể lên đến ba tháng. Đất được bón phân bón giải phóng chậm chứa các chất dinh dưỡng đa lượng này sẽ cần ít phân bón hơn. Việc sử dụng phân bón giải phóng chậm dẫn đến hiệu quả của sự giải phóng các chất dinh dưỡng đa lượng cao hơn so với các phân đạm giải phóng nhanh thông thường.

Sự hấp phụ như được định nghĩa trong bản mô tả này, đề cập đến bất kì phương thức nào tạo thành phức hợp giữa chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ và các hạt nano hydroxyapatit phosphat (“HAP” hoặc “HA”). Các phương thức này bao gồm các liên kết đồng hóa trị, các liên kết tĩnh điện, các liên kết Van der Waals và các liên kết hydro.

Bất kỳ chất chứa nitơ nào khác có thể cấp nitrat hoặc nitrit cho thực vật có thể được sử dụng làm chất dinh dưỡng đa lượng để hấp phụ lên các hạt nano HAP. Ví dụ về các chất chứa nitơ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, urê, thiourê, amit, polyamin, amoniac và alginat.

Tổng quan về sản xuất và hình thái học của chế phẩm dinh dưỡng đa lượng chứa hạt nano HAP – Nitơ

Các hạt nano HAP có thể được tổng hợp hóa học sử dụng huyền phù canxi hydroxit và axit phosphoric (Mateus et al., Key Engineering Materials, 330-332, 243-246, 2007). Sự mô tả chi tiết sự tổng hợp các hạt nano HAP là như được mô tả trong bản mô tả này.

Hình thái cấu trúc của các hạt nano HAP được mô tả trong bản mô tả này chỉ ra rằng sự tạo thành ban đầu của các hạt nano HAP dạng hạt phát triển thành cấu trúc dạng chuỗi hạt. Dạng phát triển này gợi ý rằng một mặt của hạt nano HAP dạng hạt là có khả năng được tạo tinh thể với tế bào đơn vị sáu cạnh và có năng lượng cao do đó dẫn đến sự phát triển định hướng trong một định hướng. Sự phát triển định hướng này có thể xảy ra thông qua mặt phẳng kết thúc PO_4^{2-} . (xem Fig. 5 và 6). Điều này dẫn đến kết quả là cấu trúc giống chuỗi hạt nano chuyển thành hình dạng que. Sự phát triển định hướng này bị gián đoạn hoặc làm chậm với sự co mặt của phân tử đệm như amin và amit trong môi trường vì Ca^{2+} có thể tạo phức với chất cho nito.

Các phương pháp hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng chứa nito như urê trên các hạt nano HAP là cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Hình ảnh SEM cho thấy kích thước hạt các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng nhỏ hơn 30 nm trong phương án ưu tiên. Theo hình ảnh TEM (xem Fig. 3a và 3b), phương án ưu tiên của các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng thể hiện hình thái dạng que tương tự như các hạt nano HAP trước khi hấp phụ. FTIR và Raman chỉ ra rằng, trong phương án ưu tiên về các hạt nano này, urê được gắn vào đầu hydroxyl và các mặt kết thúc Ca^{2+} của các hạt nano HAP.

Theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, trước khi làm khô, các hạt nano chất dinh dưỡng đa lượng chứa HAP-nitơ có thể thu được ở dạng phân tán trong nước ổn định. Sau khi làm khô, các hạt nano chất dinh dưỡng đa lượng chứa HAP-nitơ có thể thu được ở dạng các hạt nhỏ hoặc các mảnh rắn trắng. Ngoài ra, các hạt hoặc mảnh này có thể được nghiền để tạo bột. Việc nghiền này tốt hơn là được thực hiện sử dụng trục lăn hoặc máy nghiền bi. Dịch phân tán trong nước, các mảnh hoặc các hạt có thể được sử dụng làm chế phẩm dinh dưỡng đa lượng giải phóng chậm.

Sự giải phóng trong đất

Các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng để cung cấp chất dinh dưỡng đa lượng cho cây trồng như chè; cao su; ngô; đậu tương; bông; thuốc lá; mía đường; các cây ngũ cốc như lúa, ngô, bột mì, lúa miến và lúa mạch; các cây hoa quả như táo, cam, cà chua; rau; các cây trang trí; và các cây nông sản thương mại ngắn ngày khác mà phát triển trong khoảng đất pH. Có nhu cầu về phân đạm chứa nito vì sự sinh sản của cây trồng lấy nito là nguyên tố chính

cho sự phát triển của cây, từ đất. Ví dụ, việc sản xuất 1000 kg lá chè (khối lượng khô) lấy đi khoảng 100 kg nitơ từ đất. Nguồn nitơ này phải được bổ sung bằng việc dùng phân bón bên ngoài.

Chế phẩm dạng hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cho đất ở dạng bột, viên nhỏ, mảnh, dạng phun hoặc huyền phù trong nước được bao bằng vỏ có khả năng phân hủy sinh học. Trong các phương án nhất định của sáng chế, sự giải phóng chậm của nitơ trong thời gian tới ba tháng là đã được ghi nhận. trong quá trình bón phân cho, ví dụ, cây chè, tần suất của việc dùng có thể được giảm đi phụ thuộc vào yêu cầu về phân bón cho việc canh tác cây chè. Điều này có thể được thực hiện bằng cách bắt đầu dùng các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng lần hai ở thời điểm thích hợp trước khi tiêu thụ hết dinh dưỡng của lần dùng thứ nhất. Trong phương án khác, việc dùng nhiều lần các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng cho đất được phân bố trong ba tháng.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận ra rằng độ pH của đất đóng vai trò trong sự giải phóng chất dinh dưỡng đa lượng từ các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng vào đất. Ngoài ra, độ pH của đất là quan trọng trong sự phát triển của các cây kinh tế, (lúa, chè và cao su) và các cây trang trí (cây dương xỉ và cây phong lan). Nói chung, cây chè phát triển nhanh trong đất axit trong phạm vi độ pH nằm trong khoảng từ 4,2 đến 5,7. Tuy nhiên, lúa chịu được độ pH nhẹ hơn một chút, phạm vi lý tưởng nằm trong khoảng từ 5,0 – 6,0. Hàm lượng chất hữu cơ cao trong đất được tin là có thể dẫn đến làm giảm độ pH của đất. Độ cao so với mực nước biển có thể đóng vai trò đối với năng suất. Thông thường, độ cao cao hơn chứa nhiều chất hữu cơ hơn so với độ cao thấp hơn như ở độ cao mực nước biển. Hàm lượng chất hữu cơ của đất nằm trong khoảng 487,68m đến 1219,2m (1600 đến 4000 feet) có thể nằm trong khoảng từ 2 đến 3%.

Trong khi không bị bó buộc bởi lý thuyết, sự thêm proton của các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng được tin là dẫn đến sự giải phóng các chất dinh dưỡng đa lượng được hấp phụ. Ở đây, urê, do tính bazơ, có thể được thêm proton một cách dễ dàng có thể được thêm proton một cách dễ dàng. Điều này có thể hỗ trợ quá trình giải phóng.

Trong phương án về phương pháp giải phóng chậm, đất có độ pH là 5 quan sát

thấy ở độ cao 487,68m (1600 feet) ở nông trường chè ở Kandy, Sri Lanka, có thể được sử dụng với các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng để giải phóng chất dinh dưỡng đa lượng theo cách giải phóng chậm và duy trì. Trong phương án khác, các thử nghiệm trong chậu được thực hiện với lúa ở Viện nghiên cứu và phát triển lúa (Rice Research and Development Institute), Sri Lanka (độ pH 5,5 – 6,0) có thể được sử dụng với các hạt nano HAP hấp phụ chất dinh dưỡng đa lượng để giải phóng chậm chất dinh dưỡng đa lượng. Ngay cả trong đất cát thấy ở mực nước biển (độ pH 7), ví dụ ở Colombo, Sri Lanka, nơi hàm lượng chất hữu cơ thấp hơn 2%, sự giải phóng chậm và duy trì có thể đạt được. Tóm lại, trong khi sự giải phóng chậm chất dinh dưỡng đa lượng sẽ xảy ra trong đất có phạm vi độ pH từ 3,5 đến 7,00, đất có trị số pH axit trong phạm vi khoảng từ 4,2- 6,5 là được ưu tiên nhất.

Sự giải phóng qua lá

Trong phương án khác, dịch phân tán trong nước thu được một cách trực tiếp khi tổng hợp các hạt nano chất dinh dưỡng đa lượng chứa HAP-nitơ có thể được sử dụng để giải phóng chậm chất dinh dưỡng đa lượng khi dùng cho lá. Do đặc tính hóa học của bề mặt lá thường có độ pH nằm trong khoảng từ 5 và 7, chế phẩm chứa nước này có thể giải phóng chất dinh dưỡng đa lượng khi dùng cho lá theo cách dùng cục bộ thông qua việc dùng thủ công hoặc trên quy mô rộng hơn bằng cách phun vào không khí. Việc dùng này có thể là nhiều lần trong chu trình sống của thực vật nếu cần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp tổng hợp mẫu

a) Sự tổng hợp các hạt nano HAP – Urê bằng phương pháp tổng hợp mẫu

Dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (19,29 g, 250 ml) được chuẩn bị và được khuấy trong nửa giờ. Thêm urê (31,28 g) vào dung dịch và khuấy thêm một giờ. Sau đó, thêm từng giọt H_3PO_4 (0,6 M, 250,0 ml) vào trong khi khuấy ở 750 vòng/phút. Dung dịch được khuấy thêm 10 phút sau khi kết thúc việc thêm axit phosphoric để tạo ra dịch phân tán ổn định chứa các hạt nano HAP-urê (tỷ lệ HAP:Urê 1:1). Theo cách tương tự, các hạt nano HAP-urê được tạo với tỷ lệ HAP:Urê là 1:3, 1:4, 1:5 và 1:6 thu được chế phẩm phân bón lá.

Dịch phân tán thu được có thể được làm khô trong lò ở 60°C hoặc tốt hơn là được làm khô nhanh để tạo thành chế phẩm phân bón rắn ở dạng mảnh hoặc hạt. Các

mảnh hoặc hạt thu được này có thể được nghiền thành bột.

b) Hình thái học của hạt nano composit HAP-Urê: phương pháp tổng hợp mẫu

Như có thể thấy trên Fig.1 (a), các hạt nano dạng hạt (đường kính 10 – 20 nm với kích thước đồng nhất) được tạo thành. Sự bám dính hoặc sự phát triển định hướng bị làm chậm là kết quả của sự có mặt của các chất biến đổi bề mặt như các amin, các di-amin và các nhóm amit chứa các phân tử hữu cơ làm chậm sự phát triển định hướng của các hạt nano dạng hạt. Tuy nhiên, với thời gian quan sát được (*xem* Fig.1(b)) mà các hạt nano dạng hạt này gắn vào cấu trúc chuỗi hạt như quan sát thấy với phương pháp tổng hợp sol-gel (được mô tả dưới đây), (đường kính 10 – 15 nm, chiều dài 30 – 150 nm). Với sự tăng nồng độ của các phân tử mẫu (phân tử mẫu được đề cập ở đây là nguyên tử khác loại chứa phân tử hữu cơ như amin hoặc amit), sự phát triển định hướng của các hạt giống hạt được kiểm soát, dẫn đến kết quả là vùng bề mặt cao hơn trong các cấu trúc nano. Vùng bề mặt cấu trúc nano cao hơn được ưu tiên cho việc phủ các dinh dưỡng cho cây hiệu quả hơn và để tăng khả năng tải các dinh dưỡng lên trên HAP.

Cấu trúc giống chuỗi hạt tương tự được quan sát thấy khi bao urê thấp hơn trong khi các hạt cho thấy có dạng hình cầu khi hàm lượng tăng lên. Tuy nhiên, ngay cả sau khi tải ở tỷ lệ HAP:Urê là 1:6, composit cho thấy có kích thước hạt là dưới 100 nm.

Ví dụ 2:

a) Sự tổng hợp các nanocomposit HAP – Urê bằng phương pháp Sol-Gel

H₃PO₄ (0,6 M, 250 ml) được thêm từng giọt vào huyền phù canxi hydroxit (19,29 g Ca(OH)₂ trong 250 ml nước), trong khi khuấy mạnh trong điều kiện rung lắc (1000 vòng/phút). Dịch phân tán hạt nano HAP được tạo ra. Phản ứng xảy ra theo công thức sau.



Sự tổng hợp hạt nano HAP được lặp lại ở các điều kiện thử nghiệm khác nhau ở các thông số sau đây:

- (i) Tốc độ thêm các chất phản ứng: việc thêm trực tiếp axit phosphoric vào dịch phân tán canxi hydroxit, axit phosphoric ở 70 ml/phút, axit phosphoric ở 20 ml/phút và axit phosphoric ở 6 ml/phút,
- (ii) Độ pH: 5, 7, 9 và 11

- (iii) Phương pháp thêm: phun và thêm từng giọt
- (iv) Tốc độ khuấy: 100, 200, 300, 400, 600 và 800 vòng/phút
- (v) Nhiệt độ phản ứng: 20°C, 30°C, 40°C và 60°C
- (vi) Nồng độ axit phosphoric: H_3PO_4 cô đặc (11 M) và 0,6 M

Sự biến đổi bề mặt của các hạt nano HAP với urê được thực hiện như được mô tả dưới đây. Dung dịch urê (1 M, 250 ml) được thêm từng giọt vào dịch phân tán các hạt nân HAP được tạo ra trên đây. Trong phương án ưu tiên, 25g của urê rắn được thêm vào dịch phân tán HAP. Sử dụng urê rắn làm giảm lượng nước trong hỗn hợp, cải thiện quy trình làm khô. Dung dịch thu được được cho già hóa trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng để tạo ra dịch phân tán ổn định, có thể được sử dụng để dùng cho lá hoặc được bao trong lớp phủ có khả năng phân hủy sinh học. Sau đó, dịch phân tán được làm khô ở 60°C qua đêm bằng cách sử dụng làm khô bằng lò hoặc làm khô nhanh.

b) Hình thái của nanocomposit HAP – Urê: phương pháp Sol-Gel

Như có thể thấy qua sự tham khảo tới hình ảnh TEM của Fig.3(a), các hạt nano HAP dạng que được thể hiện. Các hạt nano HAP được tạo ra bằng phương pháp Sol-Gel được mô tả trong ví dụ 2 trên đây.

Fig.3(b) là hình ảnh TEM của các nanocomposit HAP-urê. Các nanocomposit HAP-urê được tạo ra bằng phương pháp Sol-Gel được mô tả trong ví dụ 2 trên đây.

Sử dụng phương pháp Sol-Gel được mô tả trong ví dụ 2 trên đây, các hạt nano giống hạt (đường kính 10 – 20 nm với kích thước đồng nhất) được tạo thành ban đầu và sự phát triển định hướng nhanh dẫn đến cấu trúc dạng chuỗi hạt (đường kính 10 - 15 nm, chiều dài 30 – 150 nm) được quan sát thấy.

c) Hiệu quả của các điều kiện phản ứng (i – vi)

(i) Hiệu quả của tốc độ bổ sung

Trước tiên, các hạt nano HAP dạng hạt với đường kính xấp xỉ 10-35 nm được tạo thành. Sự phát triển định hướng nhanh dẫn đến các cấu trúc dạng chuỗi hạt đường kính 10 – 35 nm và chiều dài 150 nm xảy ra với tốc độ thêm axit phosphoric nhanh hơn. Hình thái dạng chuỗi hạt được quan sát thấy ở tốc độ thêm là 20 ml phút⁻¹. Hình thái dạng chuỗi hạt với đường kính hạt là 10-60 nm, được quan sát thấy ở tốc độ chậm hơn

là 6 ml phút⁻¹. Các cấu trúc nano dạng chuỗi dạng là có chiều dài dài hơn khi giảm tốc độ thêm axit phosphoric cho thấy rằng khoảng thời gian dài hơn cho phép sự phát triển định hướng của các hạt nano dạng hạt hiệu quả hơn. Đối với chế phẩm phân bón bột ló trong bản mô tả này, tốt nhất là sử dụng tốc độ thêm là 70 ml phút⁻¹.

(ii) Hiệu quả của độ pH dung dịch

Như được thể hiện trên Fig.8, hình thái hạt nano dạng chuỗi hạt được quan sát thấy ở mọi trị số pH của dung dịch cuối khi vật liệu pha tinh sạch được quan sát thấy ở mọi trị số pH thử nghiệm. Tuy nhiên, đường kính hạt thay đổi trong phạm vi từ 10 – 100 nm. Rõ ràng rằng chiều dài của các hạt giống chuỗi hạt phụ thuộc vào nồng độ ion hydroxyl trong dung dịch. Chiều dài của hạt là dài hơn khi nồng độ ion hydroxyl cao là được sử dụng khi đường kính hạt không phụ thuộc một cách đáng kể vào nồng độ ion hydroxyl.

(iii) Hiệu quả của phương pháp bổ sung

Như có thể thấy trên Fig.9, các hạt nano pha tinh sạch với hình thái giống chuỗi hạt quan sát được ở cả phương pháp thêm từng giọt và phương pháp phun. Các hạt nhỏ hơn (đường kính 10-40 nm) với sự phân bố kích thước hạt đồng nhất hơn quan sát thấy với phương pháp phun là ưu tiên hơn.

(iv) Hiệu quả của tốc độ khuấy

Sự tổng hợp các hạt HAP được thực hiện ở các tốc độ khuấy khác nhau (100, 200, 400, 600 và 800 vòng/phút) trong thiết bị phản ứng quy mô bán thí điểm (semi pilot plant reactor). Các hạt nano giống chuỗi hạt pha tinh sạch (đường kính 10 – 60 nm, chiều dài 50 – 100 nm) quan sát được ở tất cả các tốc độ khuấy thử nghiệm. Đường kính hạt (*ca.* 60 nm) quan sát được ở tốc độ thấp hơn (100 vòng/phút) và các hạt nhỏ với đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 10 – 20 nm quan sát được ở tốc độ khuấy cao nhất, và tốt nhất nhất là tốc độ khuấy là 800 vòng/phút.

(v) Nhiệt độ phản ứng:

Như thể hiện trên Fig.11, ở các nhiệt độ thấp hơn, các cấu trúc giống chuỗi hạt dài hơn (đường kính 10 – 50 nm, chiều dài 50 – 200 nm) được tạo thành. Với sự tăng nhiệt độ môi trường phản ứng, các hạt hình cầu được tạo nhiều hơn (đường kính 10 – 50 nm) gợi ý rằng nhiệt độ cao hơn ít có lợi hơn cho sự phát triển định hướng. Trong

phương án ưu tiên, nhiệt độ môi trường được sử dụng.

(vi) Nồng độ axit phosphoric

Tham chiếu tới Fig.12, kích thước và hình thái của các hạt được sử dụng với axit phosphoric cô đặc là tương tự như các hạt nano dạng chuỗi hạt (đường kính 10 – 50 nm, chiều dài 50 -200 nm) quan sát được với 0,6 M axit phosphoric. Tốt hơn là sử dụng axit phosphoric cô đặc.

Đặc tính PXRD

Các nghiên cứu PXRD trên các hạt nano HA được tổng hợp được thực hiện phù hợp một cách chặt chẽ với các kết quả báo cáo trong hồ sơ nhiều xạ của bột cho HA trong ICDD, (số PDF 09-0432) với thông số lưới là $a = 9,42 \text{ \AA}$ và $c = 6,90 \text{ \AA}$ dựa trên tế bào đơn vị sáu cạnh. Không có đỉnh đặc trưng cho sự không tinh khiết như $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ được quan sát thấy, điều này gợi ý rằng sự tạo thành HA pha tinh sạch được tạo thành theo ví dụ 2. Bản chất đa tinh thể của các hạt nano HAP và hạt Urê-HAP được xác nhận bởi dữ liệu nhiễu xạ thu được bằng phương pháp nhiễu xạ electron. Kích thước mầm tinh thể được tính toán theo công thức Schreer là khoảng 18 nm có thể tương ứng với các nano hình cầu và gợi ý rằng sự phát triển định hướng xảy ra dọc trục c .

Phân tích nguyên tố

Phân tích tán sắc năng lượng tia X (Energy Dispersive X-ray - EDX) xác nhận sự có mặt của Ca (17,24 %) và P (10,16 %) trong thỏa thuận với tỷ lệ mong muốn của Ca: P là 1,67. Phân tích Kjeldhal xác nhận sự có mặt của nitơ trong nanocomposit là $22\% \pm 3\%$.

Phân tích đặc tính FTIR

Bản chất của các tương tác giữa các hạt nano HA và các phân tử urê được nghiên cứu bởi sự phân tích đặc tính FTIR. Đặc biệt, đỉnh thay đổi trong phổ FTIR của các hạt nano HA đặc biệt rộng và đối với sự thay đổi số sóng thấp hơn trong tần số giãn dài O-H dự đoán rằng các tương tác đã xảy ra thông qua liên kết O-H của các hạt nano HA. Tần số giãn dài urê, N-H theo cặp ở 3430 cm^{-1} và 3340 cm^{-1} trong urê được liên kết với các hạt nano HA đã dẫn tới sự mở rộng đáng chú ý. Ngoài ra, sự thay đổi trong tần số giãn dài carbonyl của urê tinh sạch từ 1682 cm^{-1} đến 1669 cm^{-1} trong các hạt nano

HA hấp phụ urê chỉ ra rằng, là như mong đợi, mật độ electron C=O bị ảnh hưởng bởi sự tương tác giữa các phân tử urê và các hạt HA. Sự quan sát này đã củng cố niềm tin bằng sự dao động của đỉnh đáng chú ý của tần số giãn dài N-C-N (1460 cm^{-1}) của urê tới tần số thấp hơn ở các hạt nano HA hấp phụ urê (1446 cm^{-1}).

Phổ Raman

Phân tích phổ Raman (như thể hiện trên Fig.18) làm rõ môi trường liên kết của các hạt nanocomposit Urê-HAP, đặc biệt là trong vùng đầu vân tay. Như có thể thấy qua dữ liệu phổ Raman, có sự dao động đáng chú ý ở đỉnh 800 cm^{-1} của HA tới 775 cm^{-1} của hạt nanocomposit Urê-HAP và tại đỉnh xung quanh 825 cm^{-1} của HA tới 800 cm^{-1} của hạt nanocomposit Urê-HAP. Các đỉnh này có thể tăng từ bất kì tương tác phối tử kim loại nào, và do đó có thể được chỉ định với bất kì thay đổi nào của môi trường phối vị của các ion Ca gợi ý khả năng có mặt của các tương tác dạng kim loại-phối tử ngoài môi trường liên kết hydro yếu hydroxyl – carbonyl trong hạt nanocomposit Urê-HAP. Bằng chứng này cũng gợi ý thêm rằng có thể có liên kết phối vị giữa bất kì bề mặt kết thúc Ca mang điện dương của các hạt nano HAP và các nhóm amino của urê. Các quan sát này là phù hợp với các loại liên kết khác nhau quan sát thấy trong các tương tác protein (các hạt nano HAP) của xương. Theo các nghiên cứu trước đây về các nanocomposit protein – xương, có thể có ba loại tương tác giữa các hạt nano HAP và protein, cụ thể là, (i) van Der Waals, (ii) Culông và (iii) tạo phức.

Phân tích BET

Vùng bề mặt BET, kích thước lỗ và thể tích lỗ trung bình của các hạt nano HAP và các nanocomposit U-HA được tổng kết trong Bảng 1.

Bảng 1: Vùng bề mặt BET, kích thước lỗ và thể tích lỗ của các hạt nano HAP và các nanocomposit U-HA.

Mẫu	Vùng bề mặt BET (m^2/g)	Kích thước lỗ (nm)	Hấp phụ điểm đơn Tổng thể tích lỗ của các lỗ nhỏ hơn $d = 60,8014\text{ nm}$ ở $P/P_0\ 0,96714194$ (cm^3/g)
HA	81	14	0,287050
HA - Urê	58	17	0,251985
HA lỗ nano	24	35	N/A
D = đường kính			

Như có thể thấy qua phân tích BET trong Bảng 1, các hạt nano HAP được tổng hợp như được mô tả trong thử nghiệm này có bề mặt cao một cách đáng kể so với các giá trị trong tài liệu. Sự phát triển định hướng của các hạt nano giống hạt thành cấu trúc giống chuỗi hạt có thể đã đưa vào đặc điểm đồng nhất quan sát thấy. Số lớp phân tử urê xung quanh hạt nano HAP tính toán được với tham chiếu đến BET là 53, gợi ý sự có mặt của nanocomposit trong đó các hạt nano HAP được bao quanh bởi các phân tử urê được tạo liên kết H với nhau theo cách mở rộng thể hiện phân tử đa poly urê.

Các đặc tính giải phóng của nito

(a) Trong nước

Phương pháp:

Sau khi điều chỉnh hàm lượng nito trong mỗi ví dụ sau đây đến 20% khối lượng khô, chúng được sử dụng để đánh giá sự giải phóng của urê (N) trong nước:

(1) Urê

(2) Các hạt nano urê –HAP (dạng bột và dạng mảnh)

(3) Urê và HA (200 – 800 microns)

Các hạt nano HAP hấp phụ urê (5g, dạng bột), các hạt nano HAP urê (5 g, dạng mảnh), các hạt nano HAP - Urê (5 g, dạng bột), urê (2,15 g), tất cả bằng với 20 % nito theo khối lượng khô được sử dụng trong nghiên cứu về đặc tính giải phóng trong nước.

Mỗi mẫu trên đây được đặt trong bình có màng bán thấm. Các mẫu được cho cân bằng với nước (25 ml) trong một mặt của màng và khuếch tán qua màng bán thấm tới mặt khác; các mẫu được rút lại ở khoảng cách 1 giờ. Các mẫu được phân tích sử dụng FTIR và để xuất hiện của đỉnh urê trong mỗi mẫu: Các đỉnh được tiêu chuẩn hóa ứng với đỉnh tần số giãn dài O-H của nước không thay đổi và vùng dưới đỉnh được phân tích đỉnh tần số giãn dài N-C-N của urê. Fig.19 tóm tắt đặc tính giải phóng của urê cho các mẫu này.

Quy trình tương tự được thực hiện để nghiên cứu đặc tính giải phóng của dung dịch nước của hạt nanocomposit HAP-Urê được tạo với tỷ lệ HAP: Urê khác nhau (1:1 – 1:6). Fig.20 tóm tắt đặc tính giải phóng của urê của các mẫu này.

Với sự tham chiếu đến Fig.19, sự giải phóng nhanh của urê trong môi trường nước quan sát thấy với urê và composit được tạo từ các hạt macro hydroxyapatit. 75%

trong tổng số urê sử dụng được giải phóng trong 50 giờ đầu tiên trong khi sự giải phóng chậm thấy rõ và sự giải phóng chậm quan sát thấy với các mảnh hạt nano Urê-HAP và bột các hạt nano Urê-HAP. Trạng thái ổn định đạt được sau 50 giờ. Lượng urê giải phóng sau 120 giờ đối với mảnh urê-HA được ước lượng là khoảng 85% trong khi 90% urê được giải phóng trong cùng khoảng thời gian với bột hạt nano Urê-HAP. Cả hai loại nanocomposit dạng bột và dạng mảnh giải phóng gần 95- 98% urê bổ sung, gợi ý composit đồng nhất và ổn định hơn.

Đặc tính giải phóng trong nước quan sát thấy với nanocomposit HAP –urê được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp mẫu.

Tham chiếu tới Fig.20, hạt nanocomposit HAP-Urê với tỷ lệ 1:1 thể hiện sự giải phóng chậm nhất so với các dạng chế phẩm khác với hàm lượng urê cao hơn. Tuy nhiên, mẫu tương tự về tốc độ giải phóng urê được quan sát thấy với tất cả các chế phẩm với lượng urê khác nhau. Sự có mặt của lượng urê tăng có thể làm yếu sự tương tác tạo liên kết H giữa phân tử urê và hạt nano HAP. Ngoài ra, tốc độ giải phóng urê trong composit pha dung dịch là thấp hơn đáng kể so với tốc độ giải phóng của hạt nanocomposit thu được ở dạng mảnh rắn.

(b) Trong đất axit (độ pH 5,0)

Mẫu đất (400 g mỗi mẫu lấy ở độ cao 487,68m (1600 feet) ở nông trường chè; độ pH 5,0) được trộn với 1,8 g phân urê bán trên thị trường. Mẫu đất chứa phân urê được điền đầy vào cột thủy tinh. Tương tự, ba lượng bằng nhau của hạt nanocomposit Urê-HAP (N – 15,5%) có hàm lượng N bằng với urê, được lấy một cách riêng rẽ và điền đầy vào ba cột thủy tinh chứa ba mẫu đất (ba mẫu lặp). Sau đó, 180 ml được thêm vào tất cả bốn cột đến khi đạt được điểm bão hòa nước đất, và duy trì hàm lượng nước gần như không đổi trong suốt quá trình thử nghiệm. Nước (100 ml) được thêm vào ở các khoảng cách 5 ngày trước khi rửa giải. Các dung dịch rửa giải (50 ml) được thu lại để phân tích nitơ. Sự phân tích nitơ được tiến hành theo phương pháp Kjeldhal (N).

Ở độ pH của đất là 5, sự giải phóng chậm của nitơ được thấy qua nanocomposit trên cơ sở hạt nano Urê-HAP và sự giải phóng dần dần có thể thấy một cách rõ ràng với sự tăng của hàm lượng nitơ tích lũy tới ngày thứ 80 theo cách giải phóng chậm, phù hợp với đặc tính giải phóng chậm điển hình được đại diện bởi sự giải phóng tích lũy với thời gian theo tài liệu. Tuy nhiên, chế phẩm urê có sự giải phóng gần 50% N trong 25 ngày

và sự giải phóng của nitơ dừng ở mức 70 % sau ngày thứ 50. Chỉ 60% urê được giải phóng thậm chí sau ngày thứ 80 và kết quả là khả năng sinh sản cao.

Thử nghiệm sinh khả dụng— Sử dụng lúa làm cây trồng

1 – Không phân bón

2 – Urê được khuyến nghị bởi Sở nông nghiệp (Department of Agriculture) – Sri Lanka

3 – 1/2 lượng urê như được khuyến nghị bởi Sở nông nghiệp (Department of Agriculture) - Sri Lanka

4 – 1/2 lượng hạt nanocomposit Urê- HAP chứa N như được khuyến nghị bởi Sở nông nghiệp (Department of Agriculture) - Sri Lanka

Thử nghiệm trong chậu được thực hiện ở Viện nghiên cứu và phát triển lúa (Rice Research and Development Institute), Sri Lanka, sử dụng lúa làm cây mẫu (xem các Fig. 22-28) chỉ ra sự tăng năng suất cây trồng (khối lượng tăng/g trên chậu) sử dụng 50% hàm lượng N (khi so sánh với mức khuyến nghị) là bằng hoặc tốt hơn 100% hàm lượng N trong phân bón thông thường. Một cách đáng kể, một lần xử lý cơ bản với hạt nanocomposit là đủ để đáp ứng nhu cầu nitơ của cây trong toàn bộ chu trình sống, so với việc dùng hai tuần một lần ngoài lần xử lý cơ bản khi hệ urê thông thường (khuyến nghị bởi sở nông nghiệp (Department of Agriculture), Sri Lanka).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm phân bón giải phóng chậm bao gồm các bước:

(a) chuẩn bị dịch phân tán chất dinh dưỡng đa lượng trong nước chứa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và nitơ;

(b) thêm axit phosphoric vào dịch phân tán chất dinh dưỡng đa lượng trong nước chứa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và nitơ này, trong đó:

chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ là urê, và

tỷ lệ của urê so với hydroxyapatit phosphat (khối lượng/khối lượng) là từ 1:1 đến 1:6.

2. Phương pháp sản xuất chế phẩm phân bón giải phóng chậm bao gồm các bước:

(a) chuẩn bị dịch phân tán chất dinh dưỡng đa lượng trong nước chứa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và nitơ;

(b) thêm axit phosphoric vào dịch phân tán chất dinh dưỡng đa lượng trong nước chứa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và nitơ này, trong đó:

chất dinh dưỡng đa lượng chứa nitơ là ure;

dịch phân tán trong nước được làm khô, và

tỷ lệ của urê so với hydroxyapatit phosphat (khối lượng/khối lượng) là từ 1:1 đến 1:6.

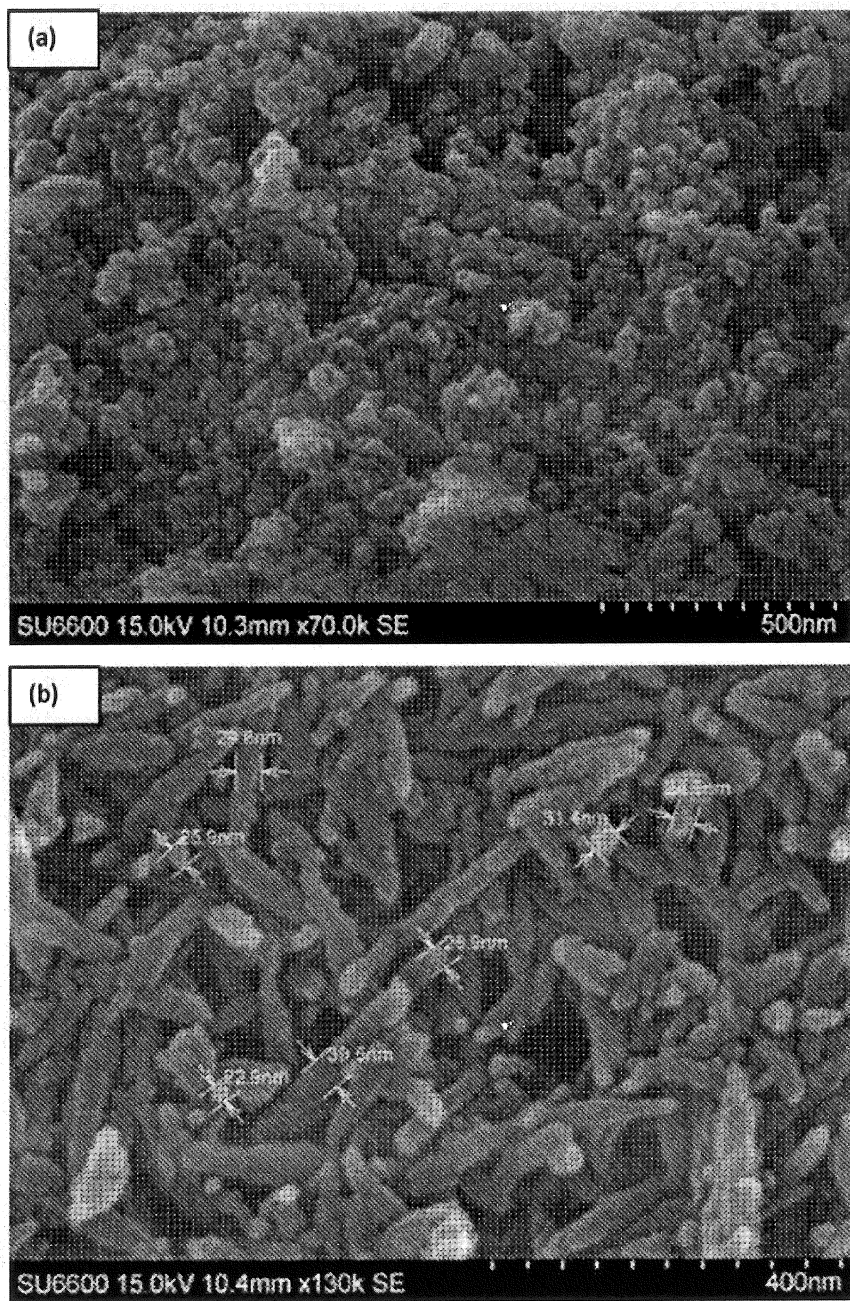


Fig.1

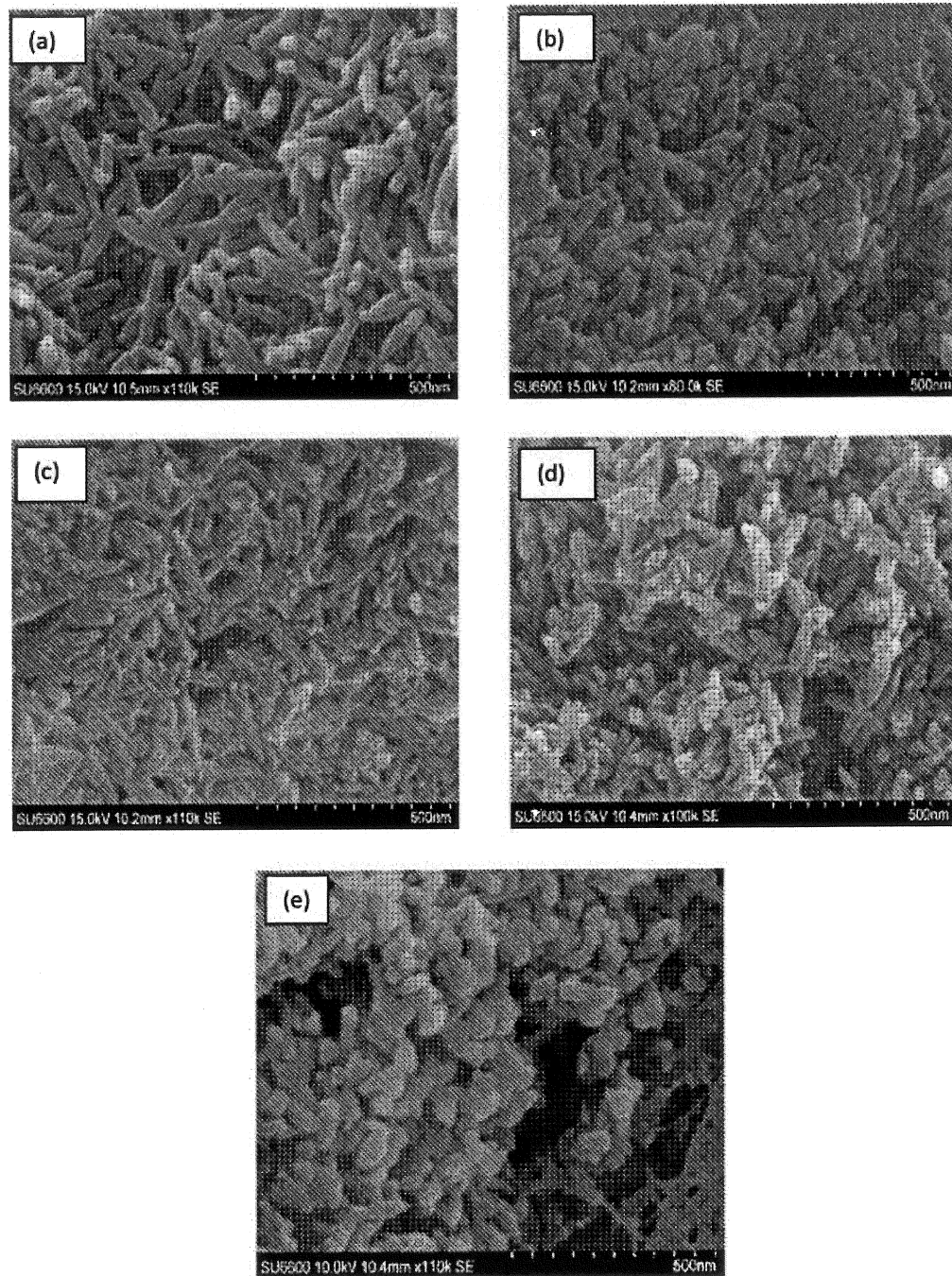


Fig.2

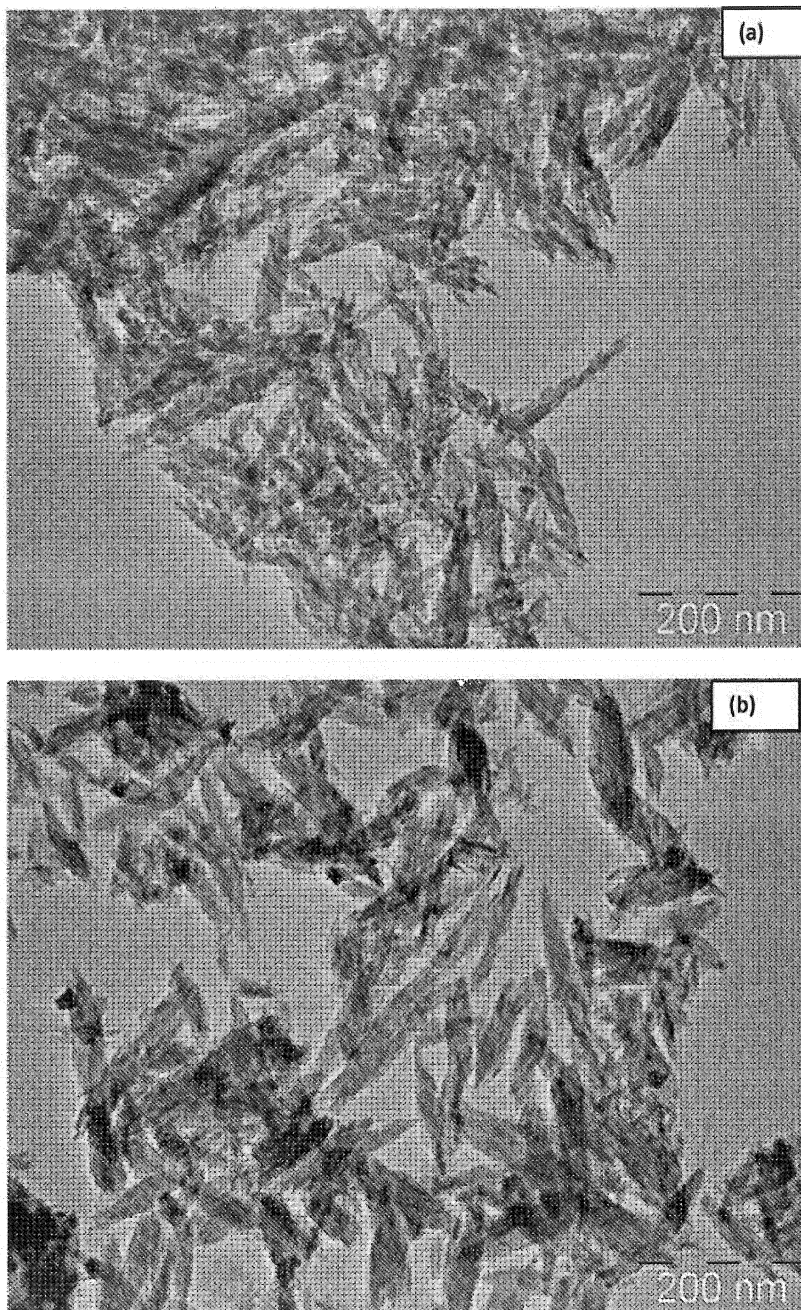


Fig.3

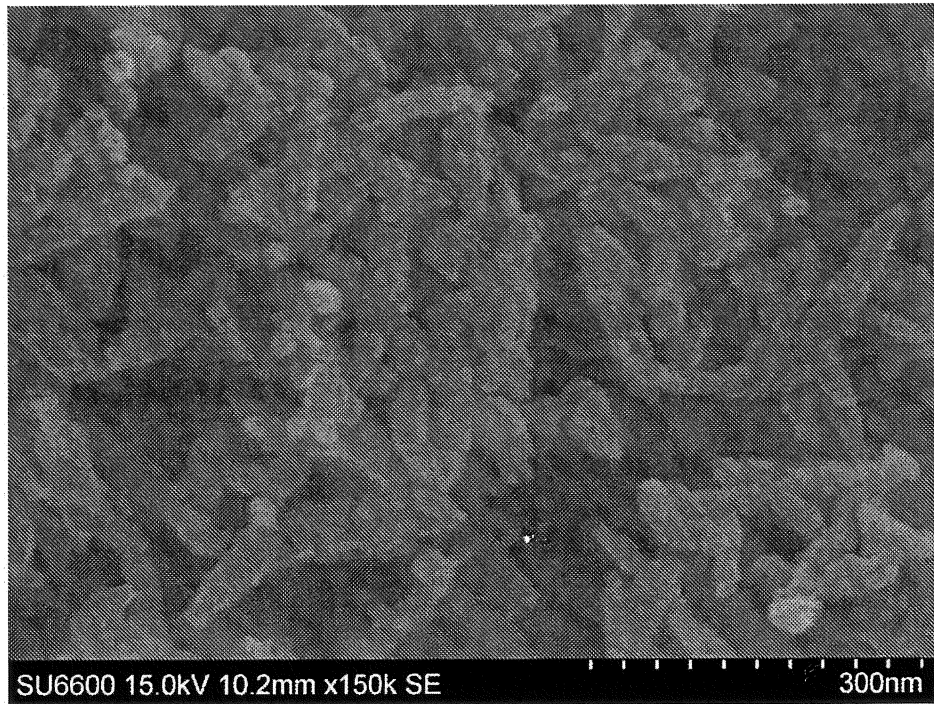


Fig.4

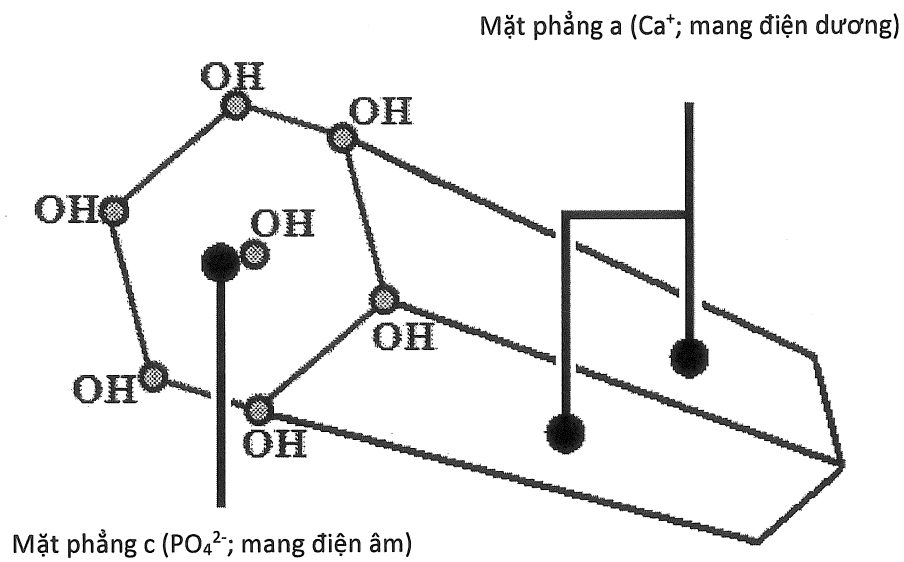


Fig.5

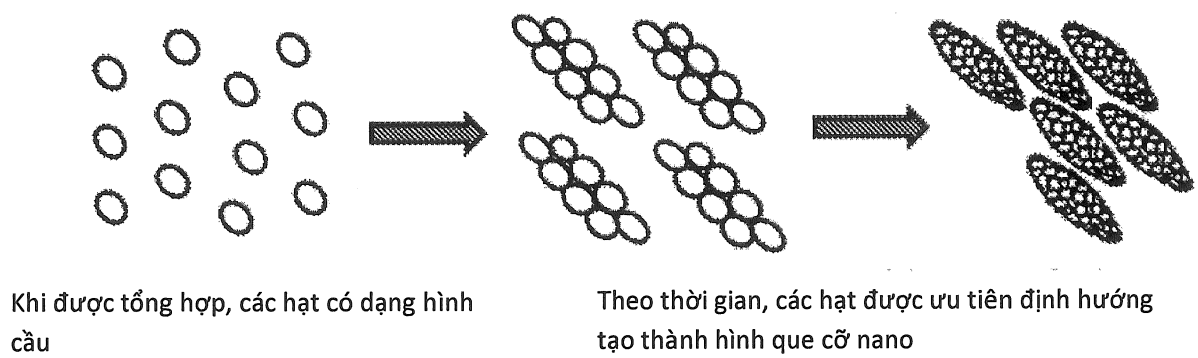


Fig.6

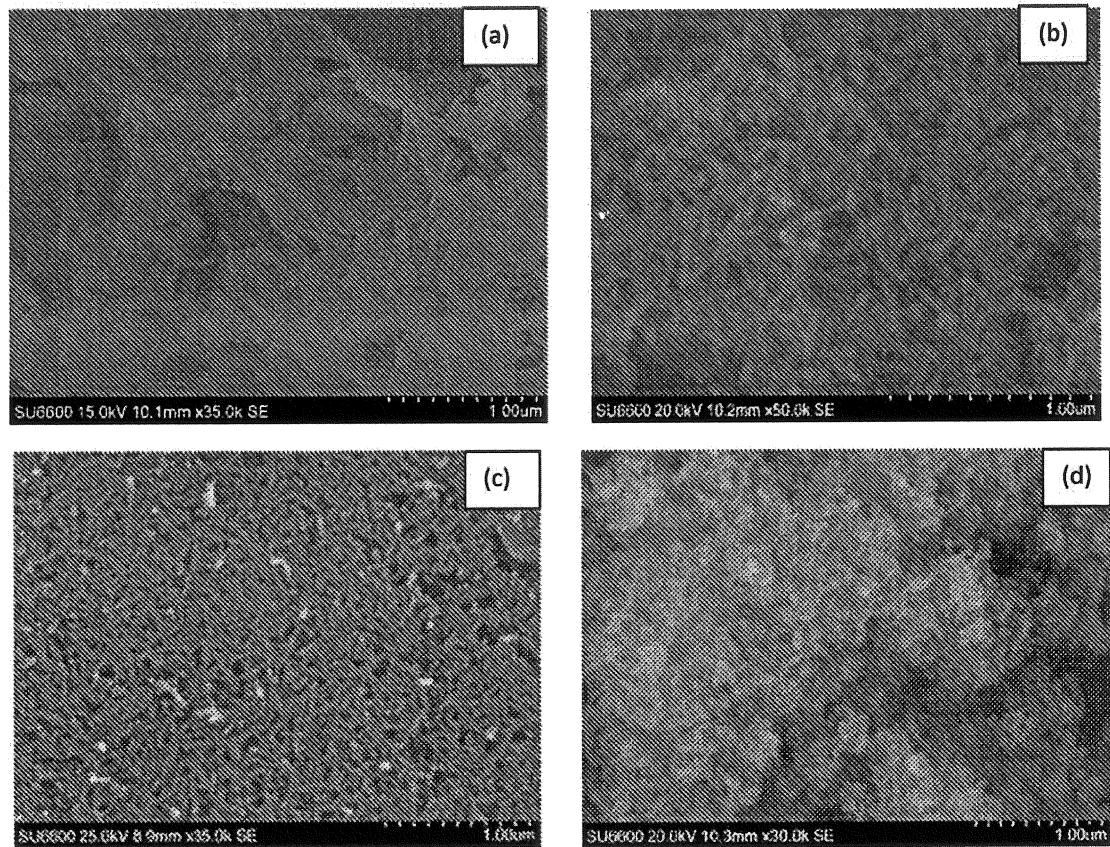


Fig.7

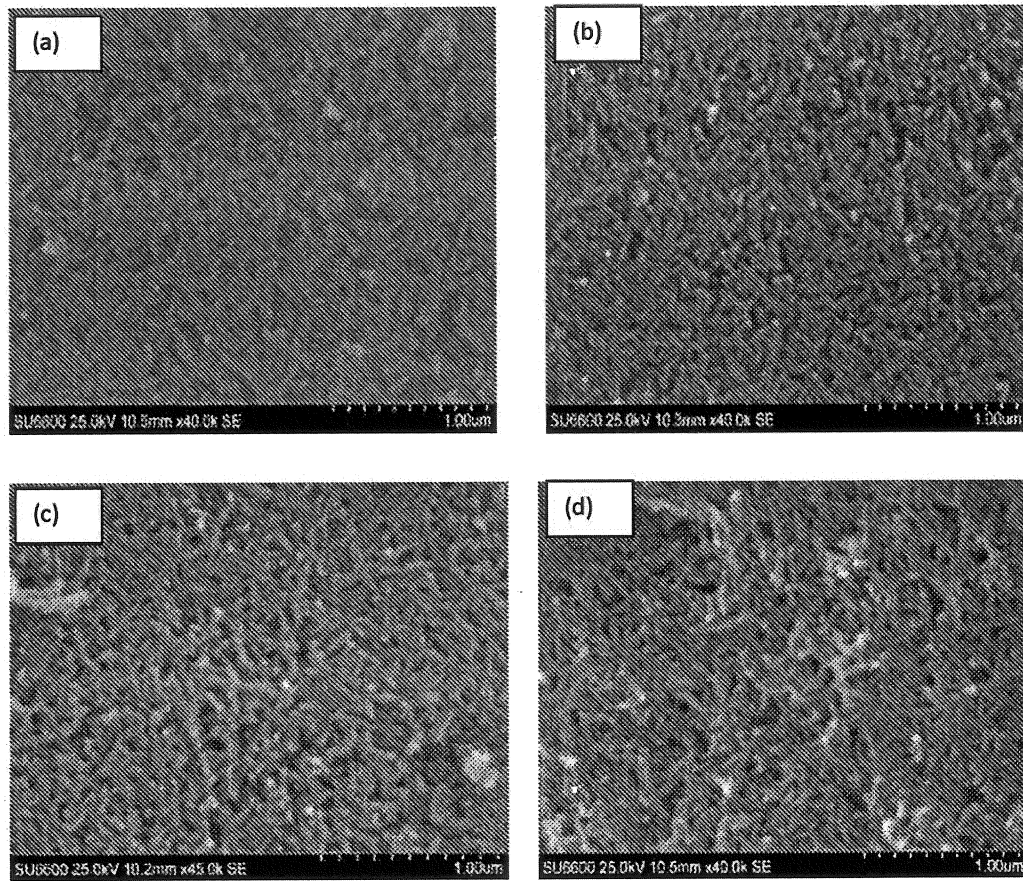


Fig.8

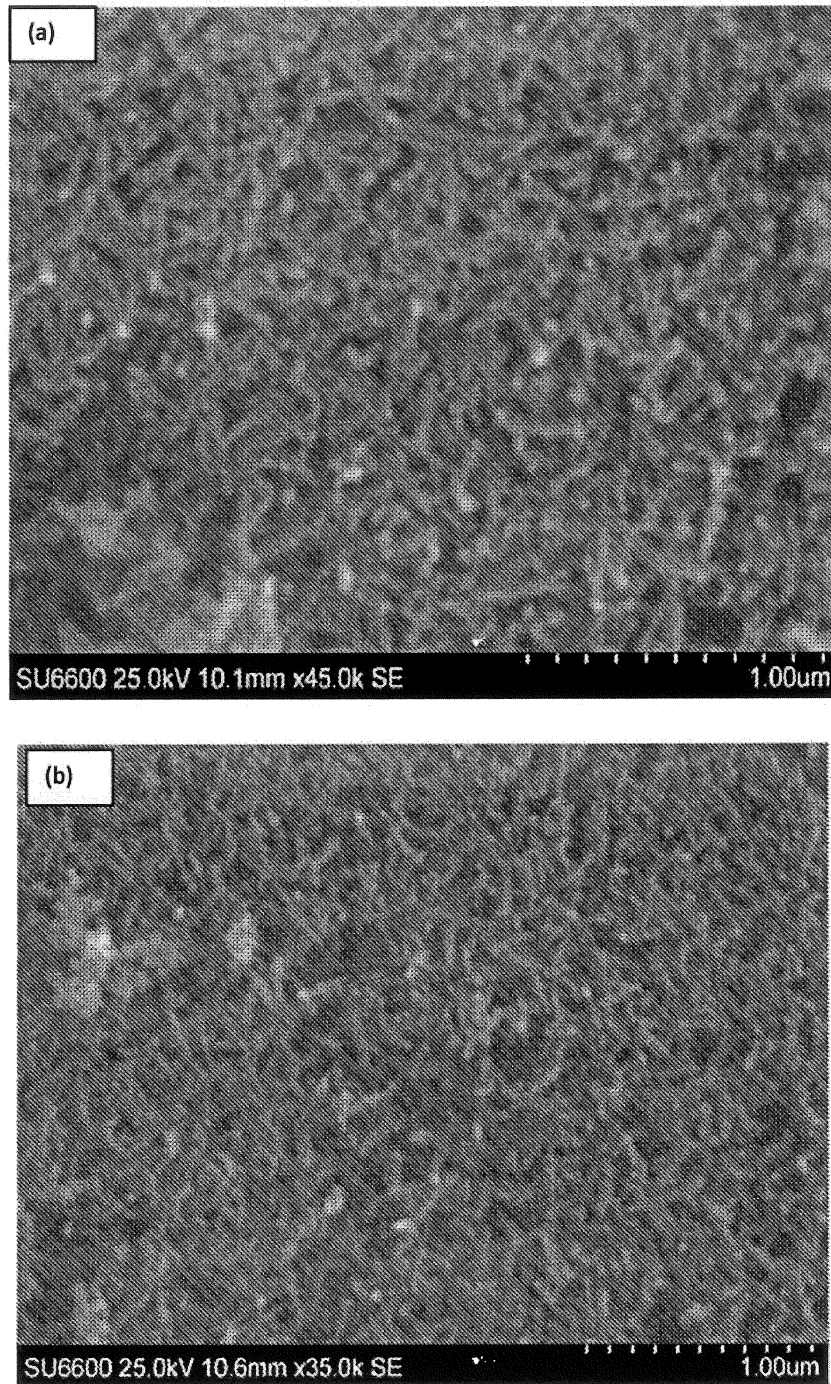


Fig.9

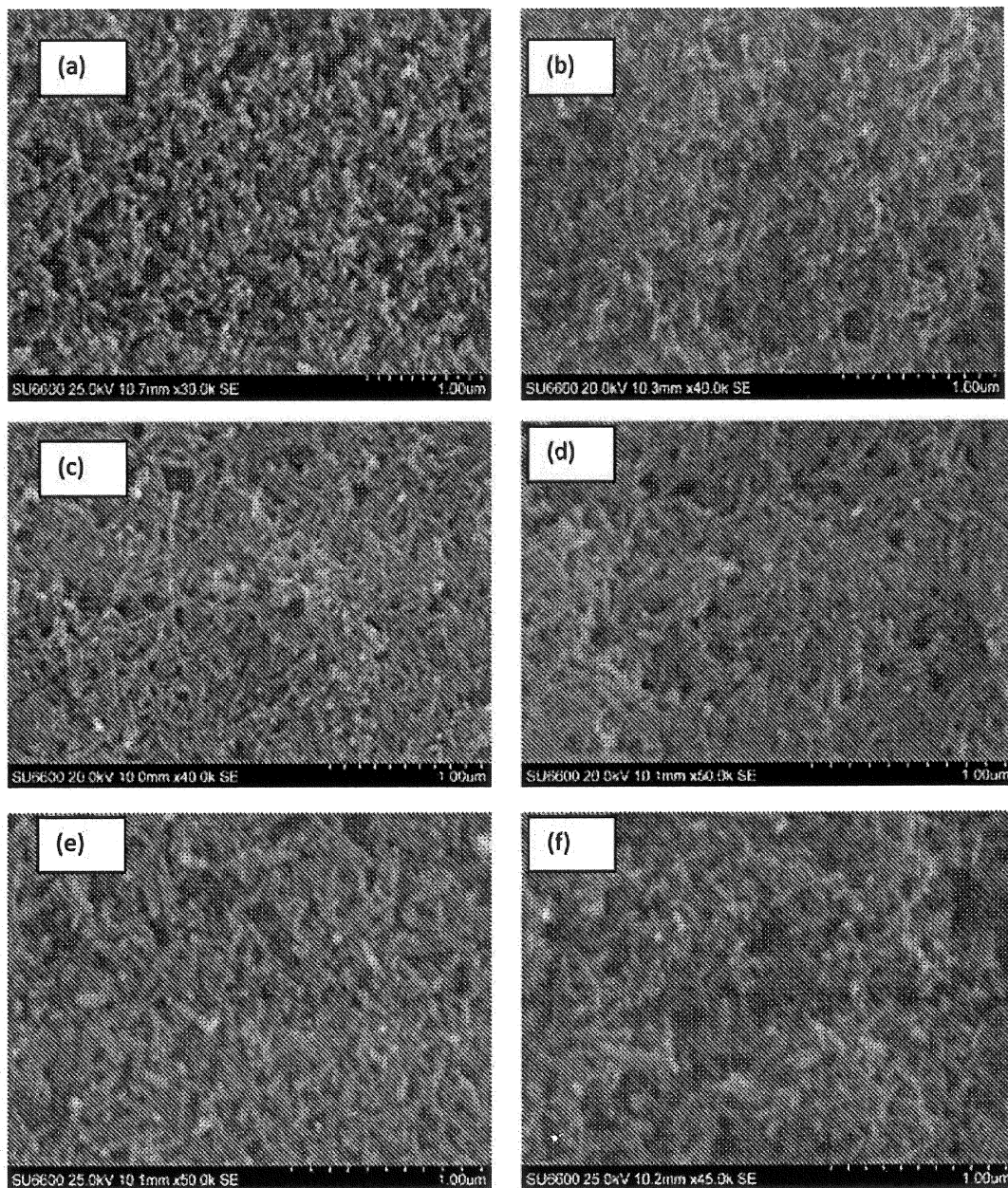


Fig.10

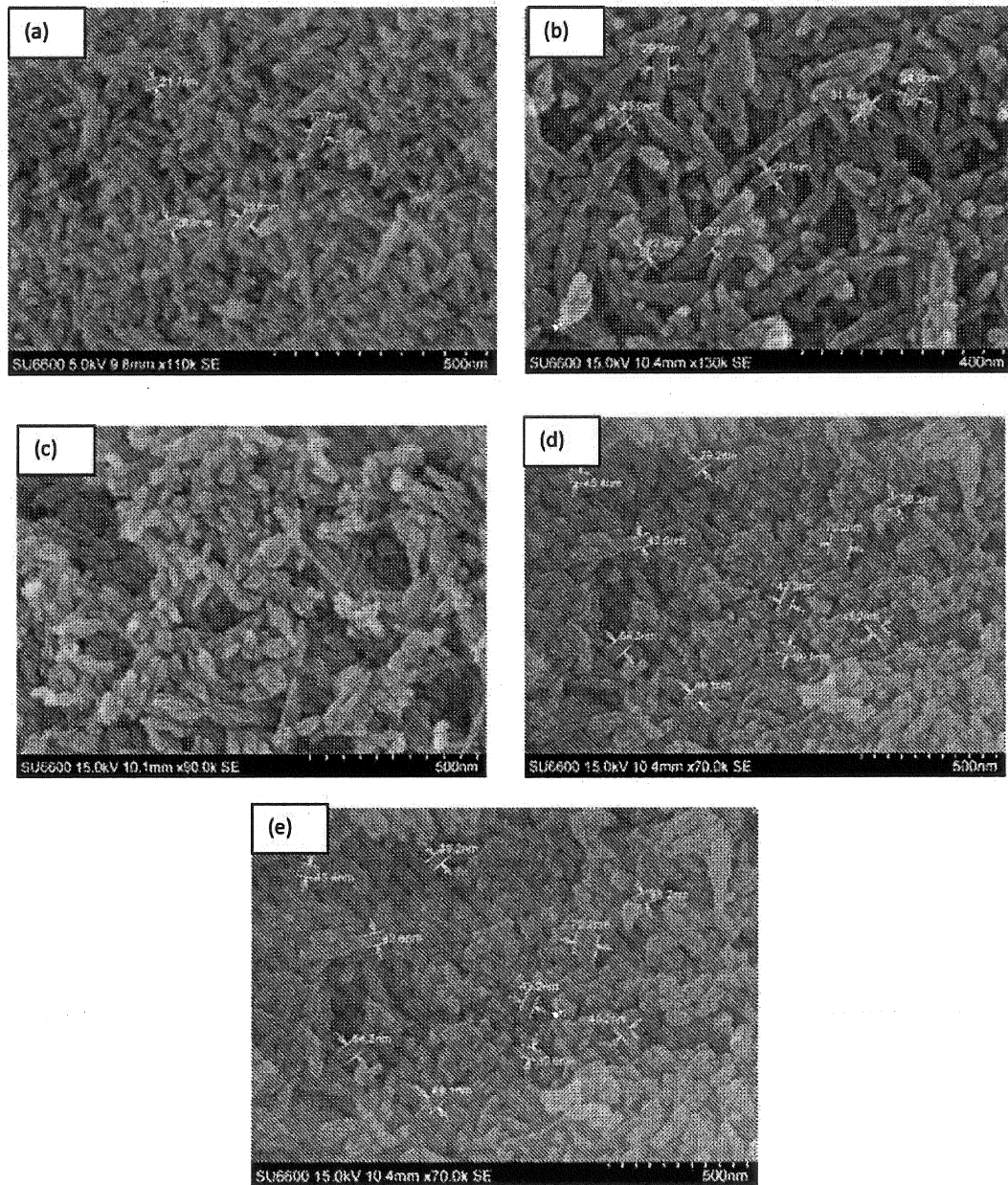


Fig.11

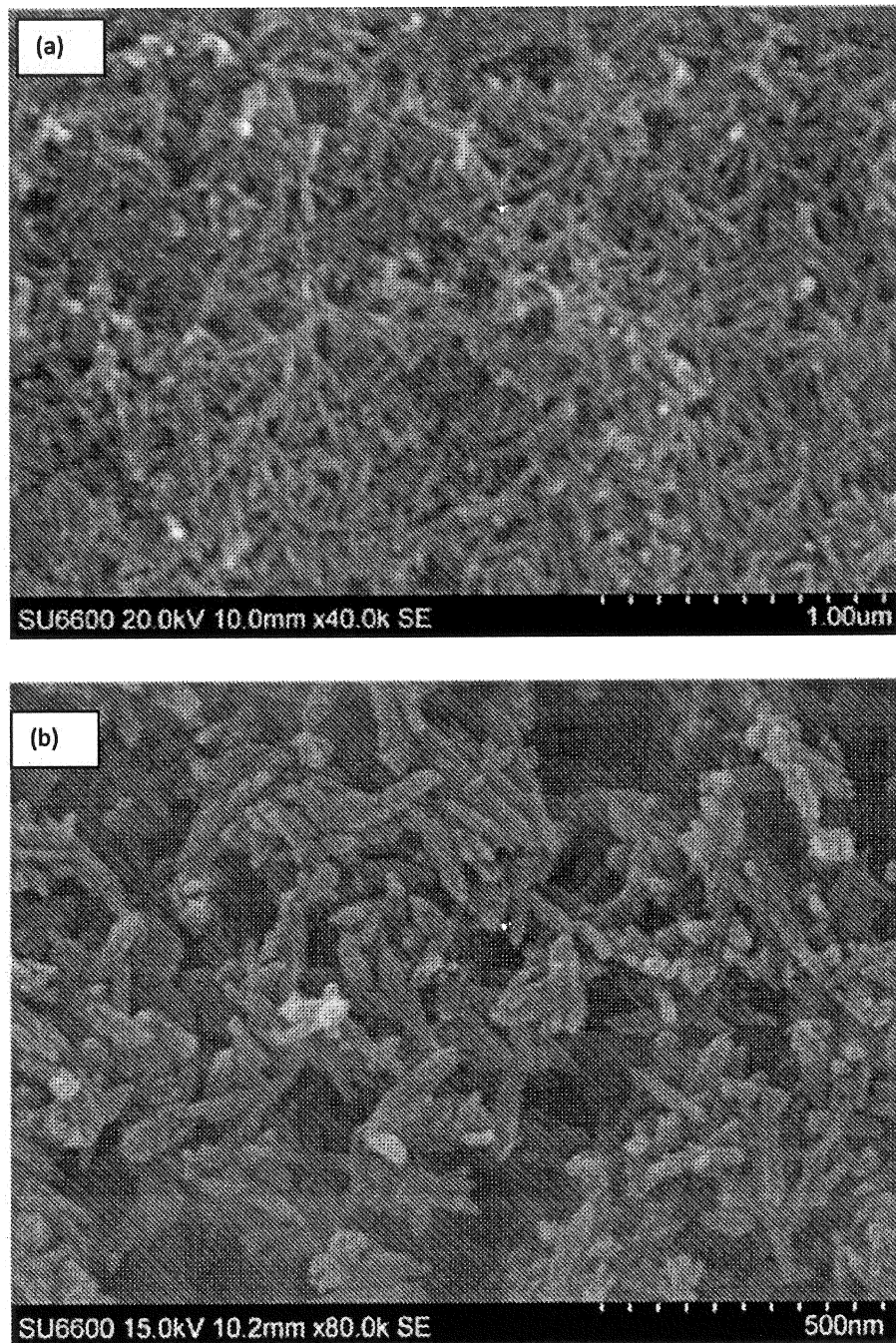


Fig.12

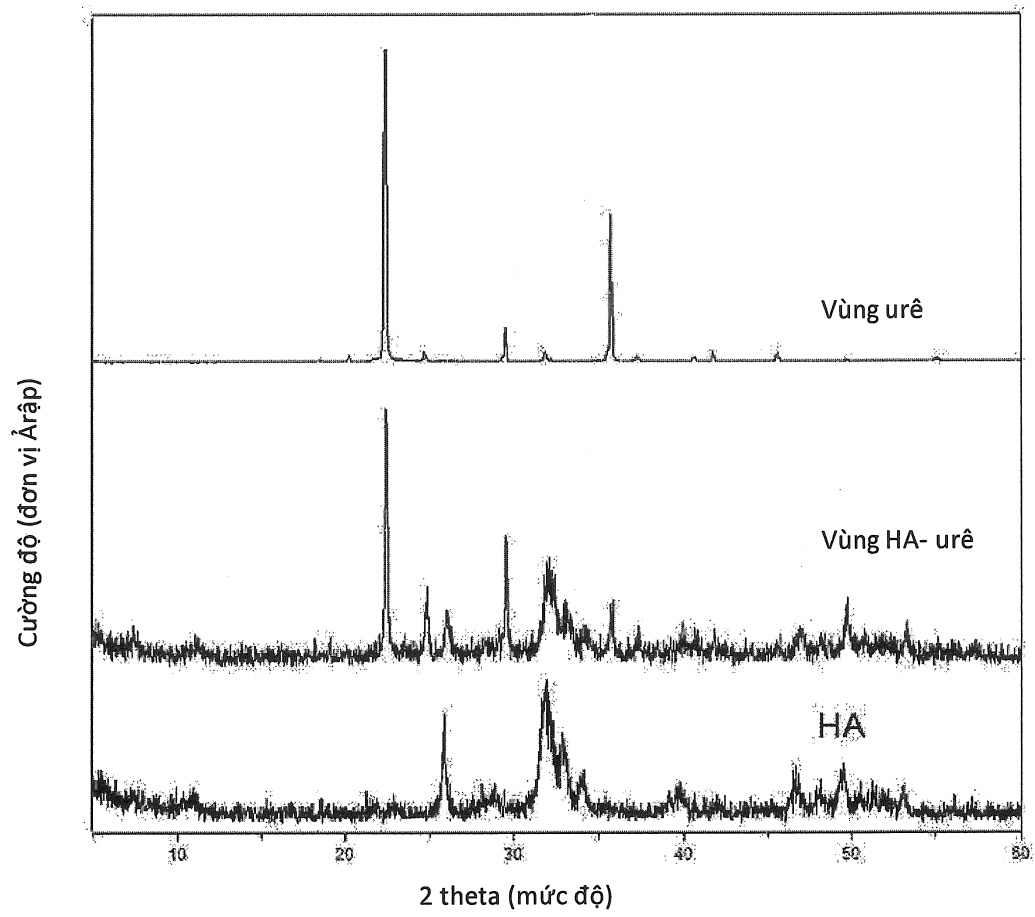


Fig.13

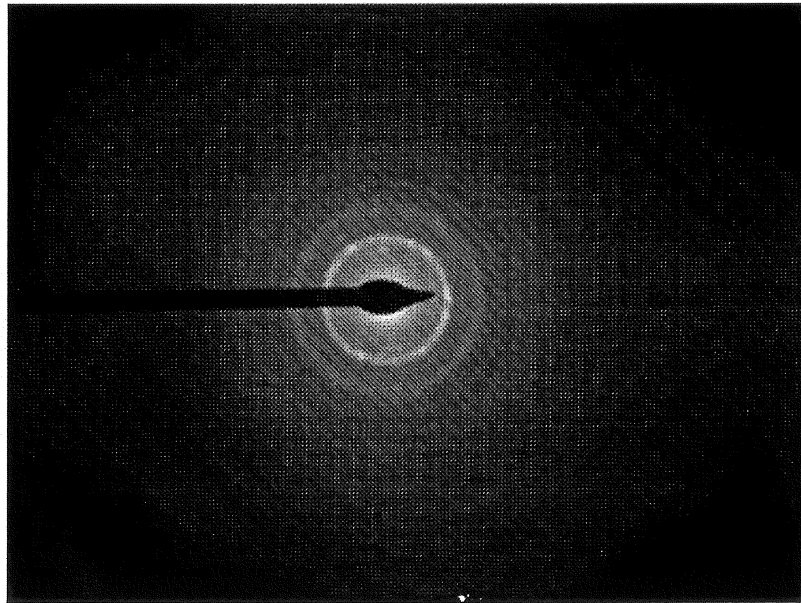
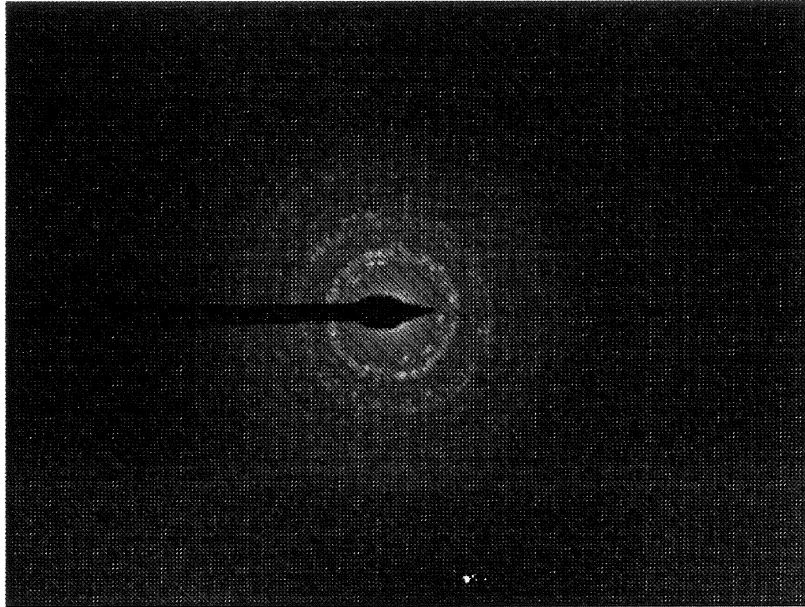


Fig.14

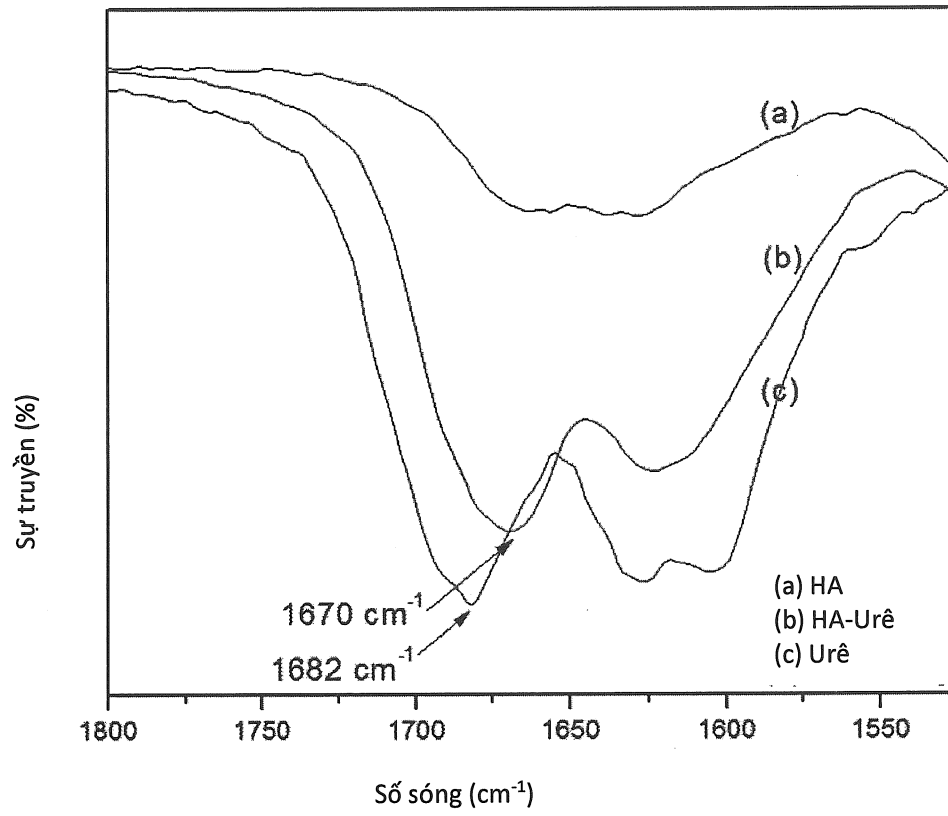


Fig.15

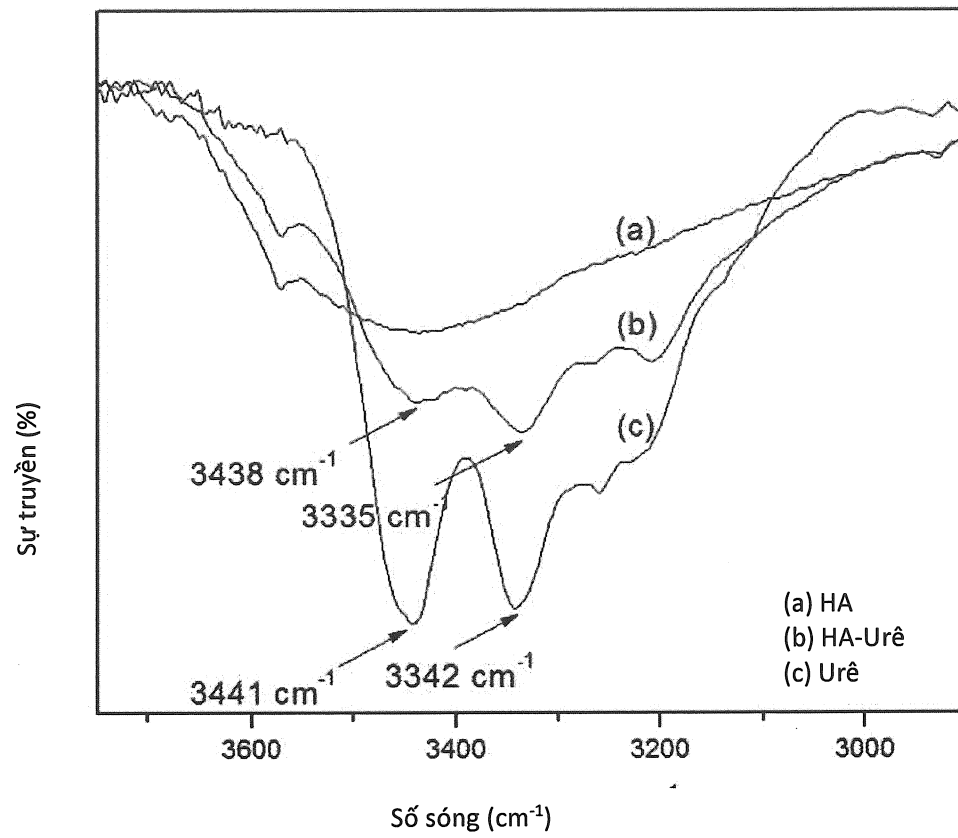


Fig.16

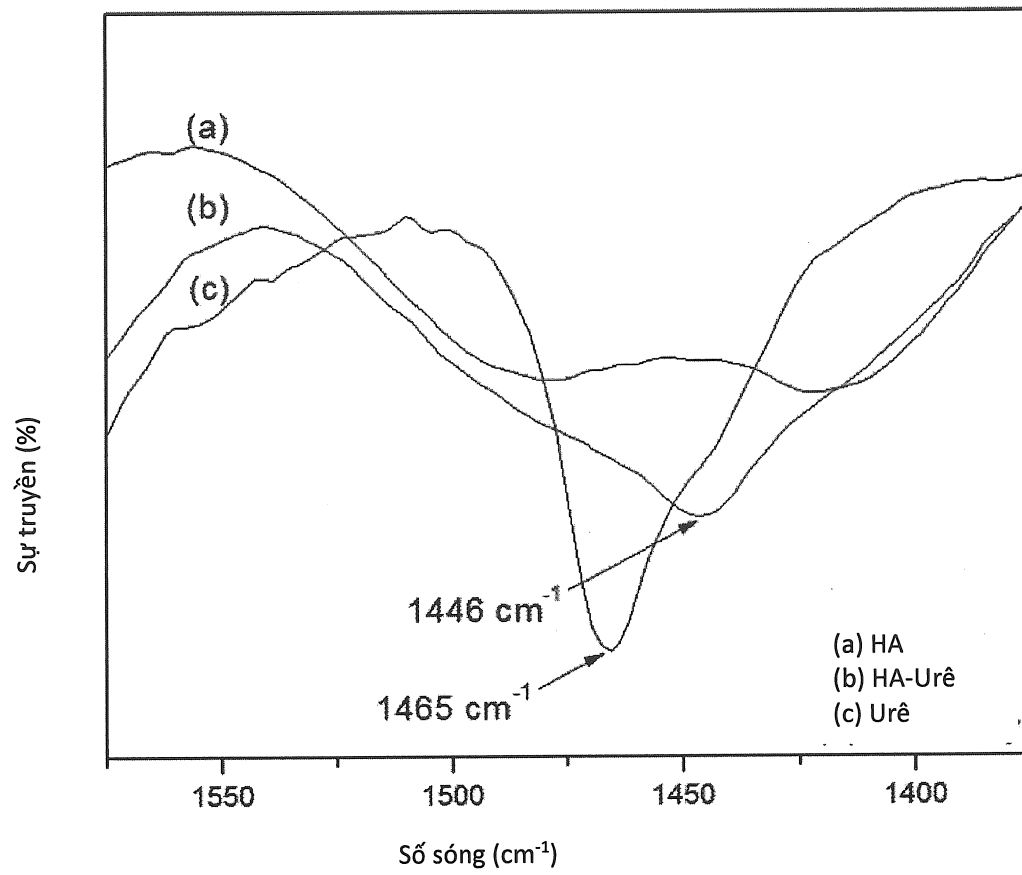


Fig.17

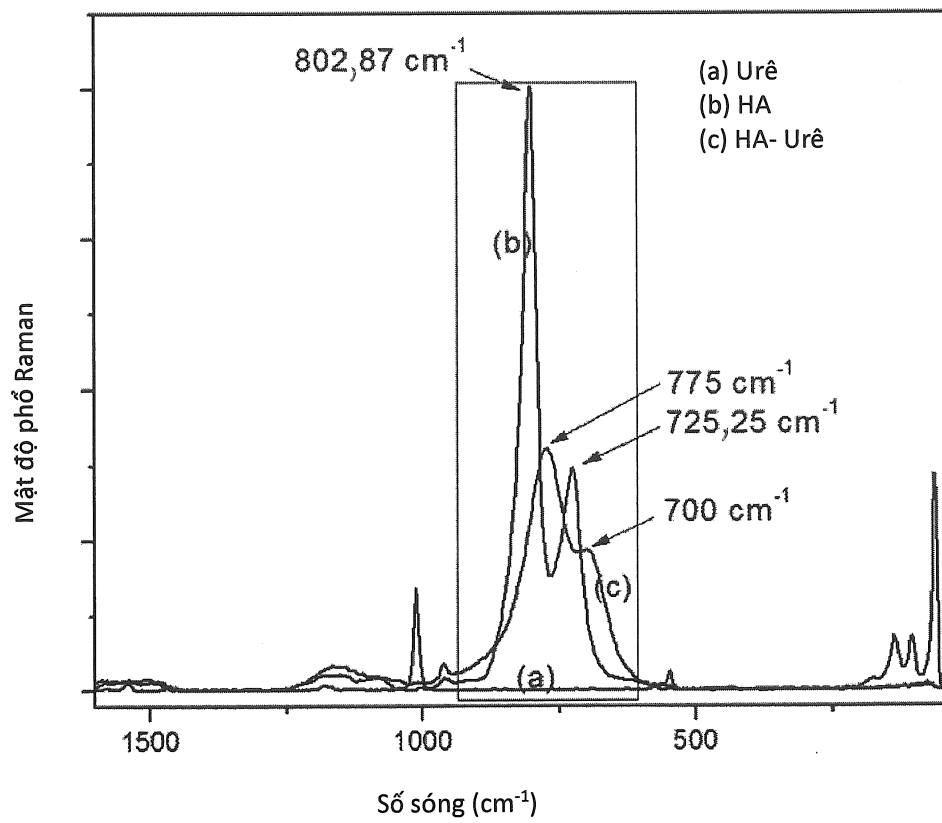


Fig.18

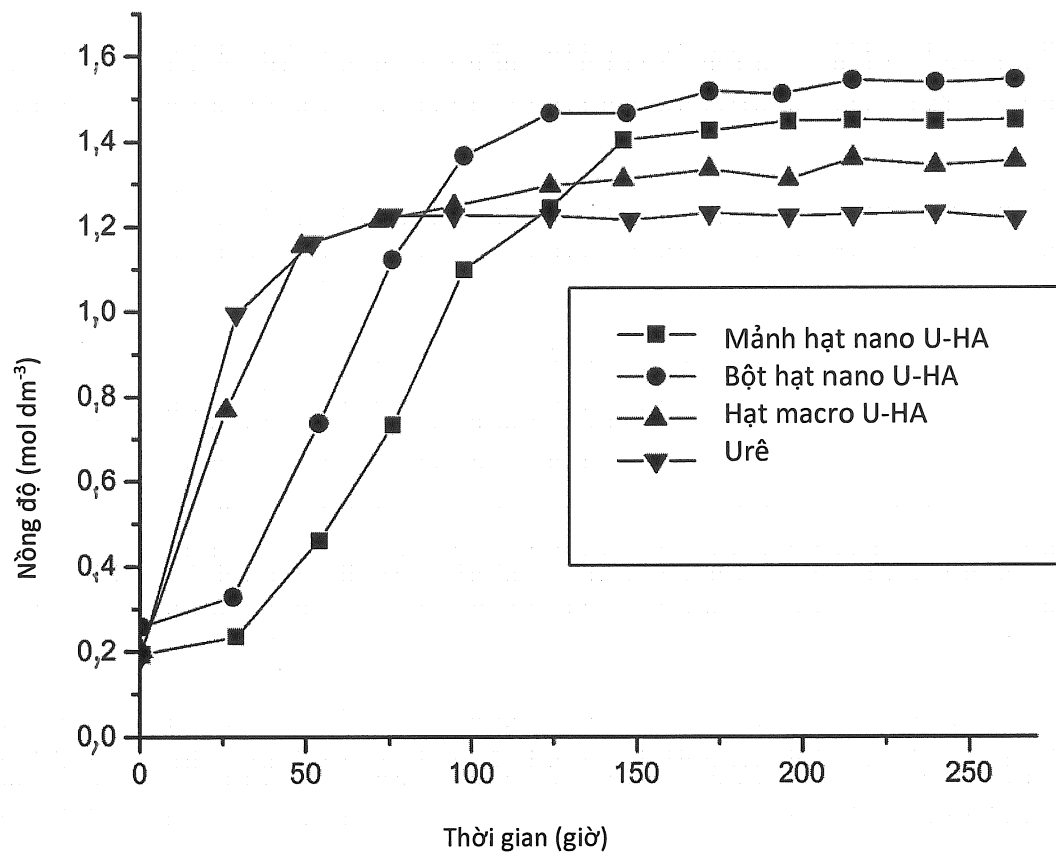


Fig.19

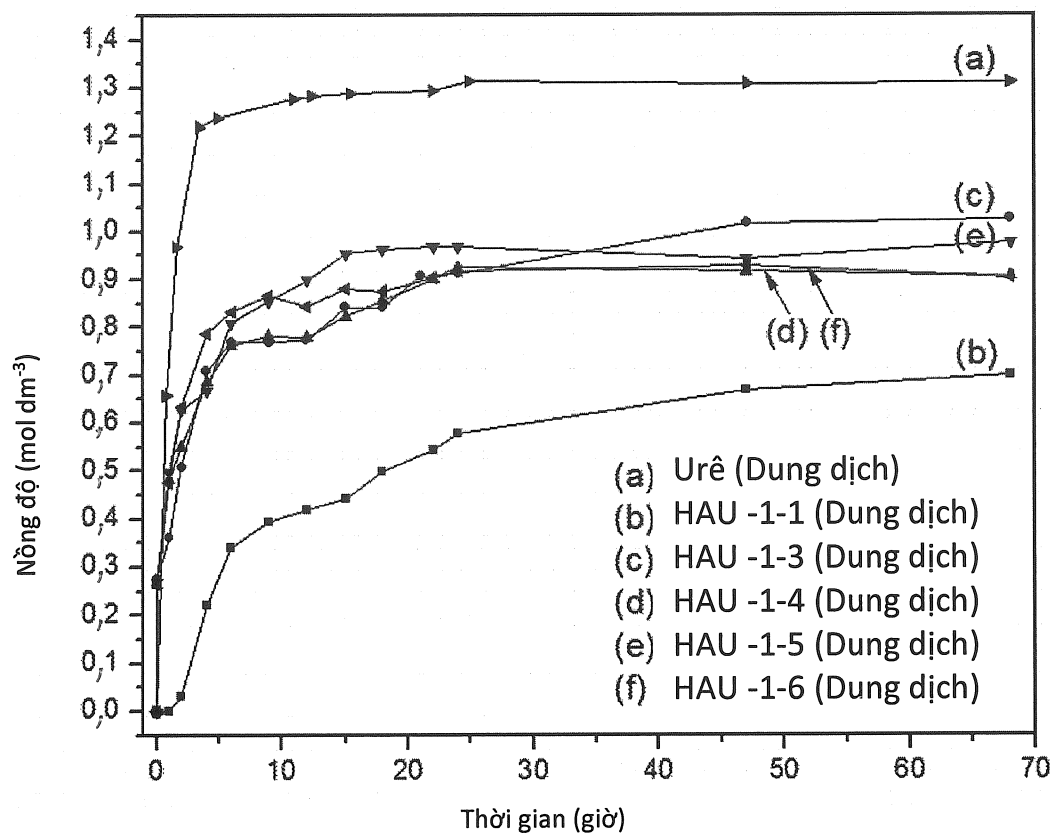


Fig.20

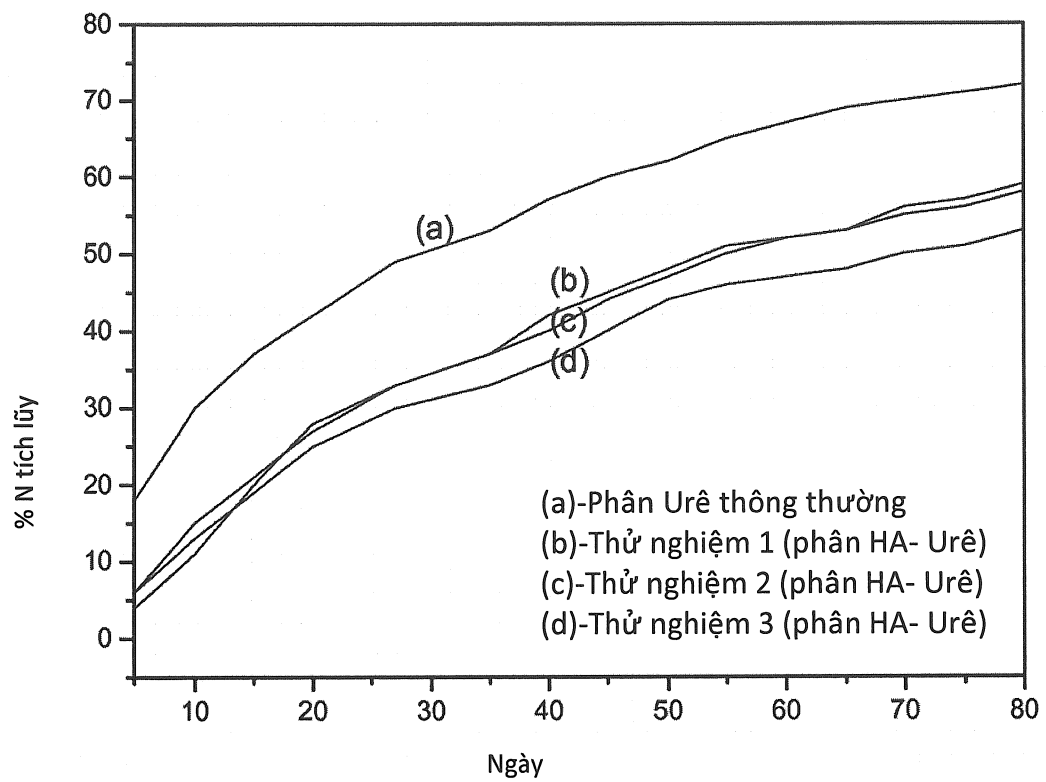


Fig.21

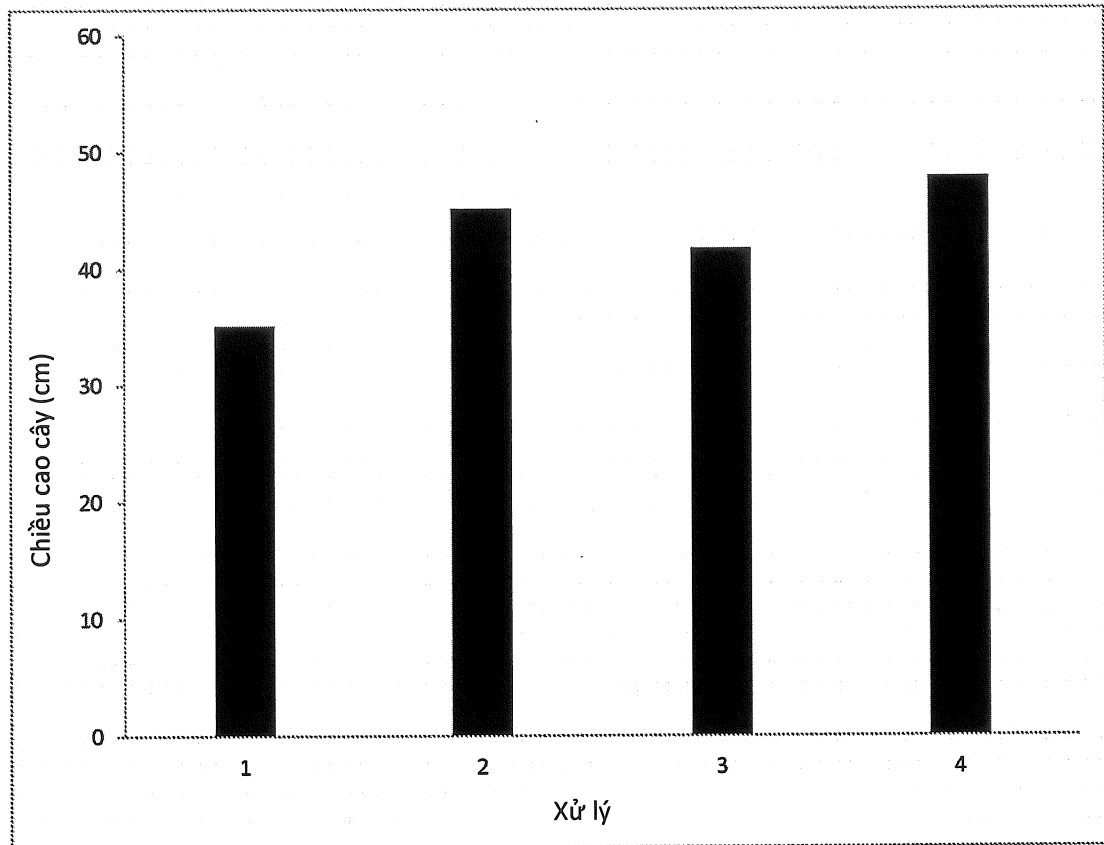


Fig.22

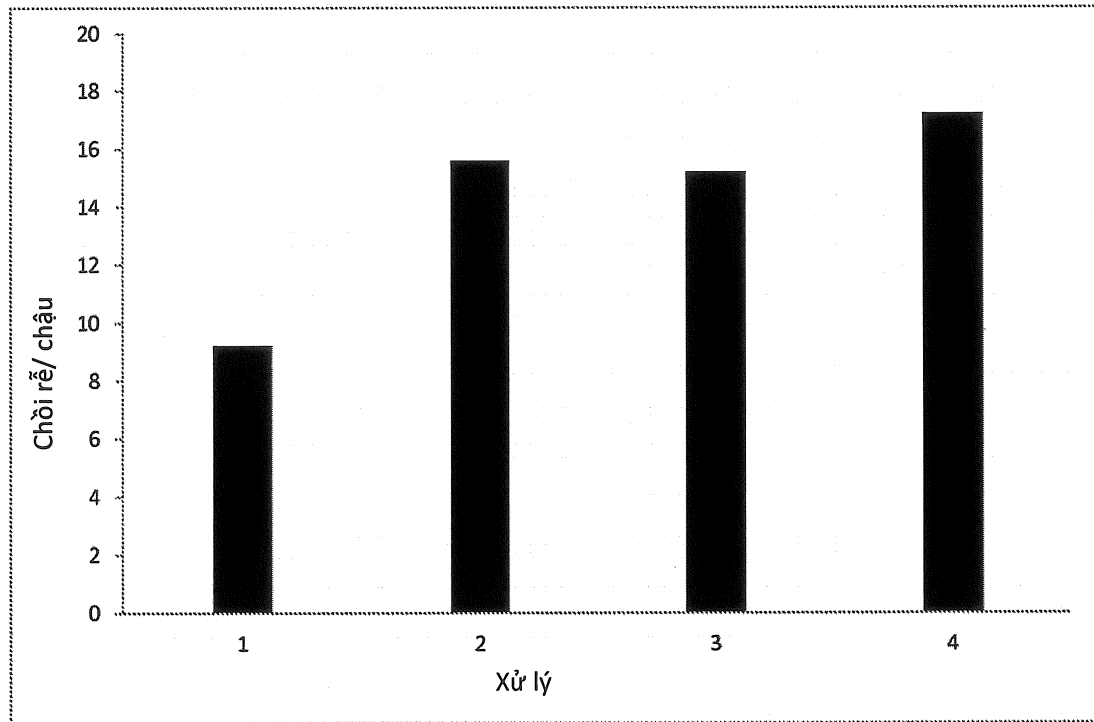


Fig.23

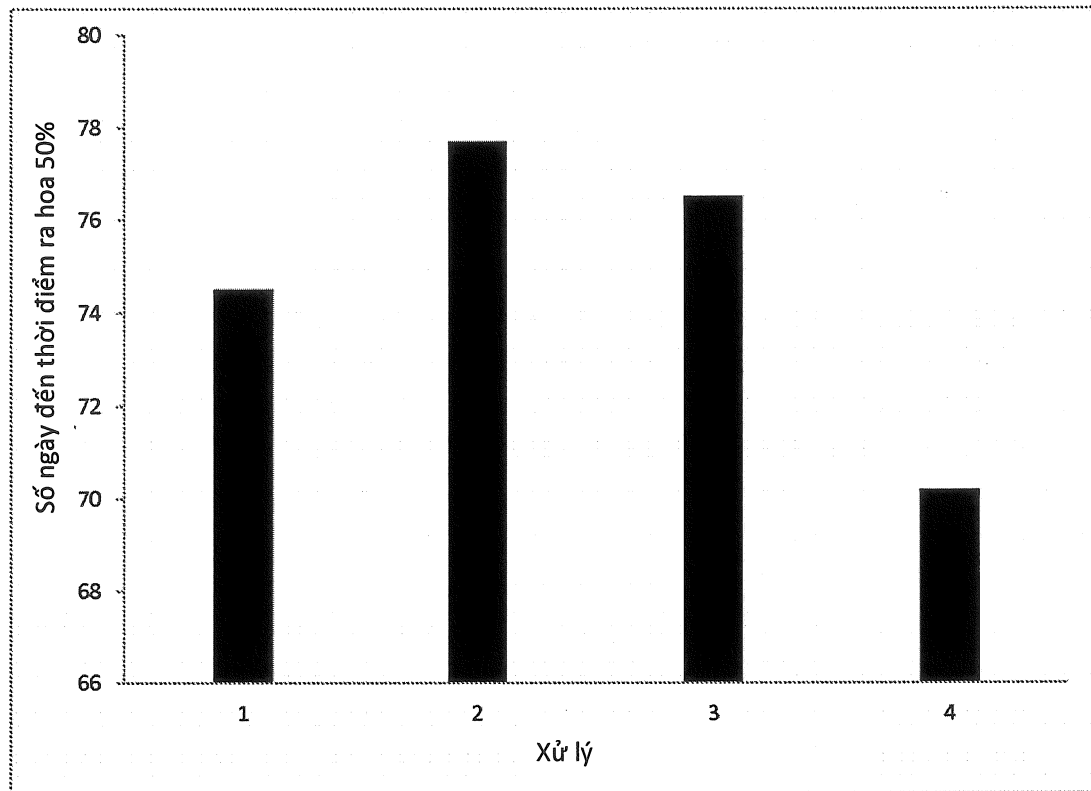


Fig.24

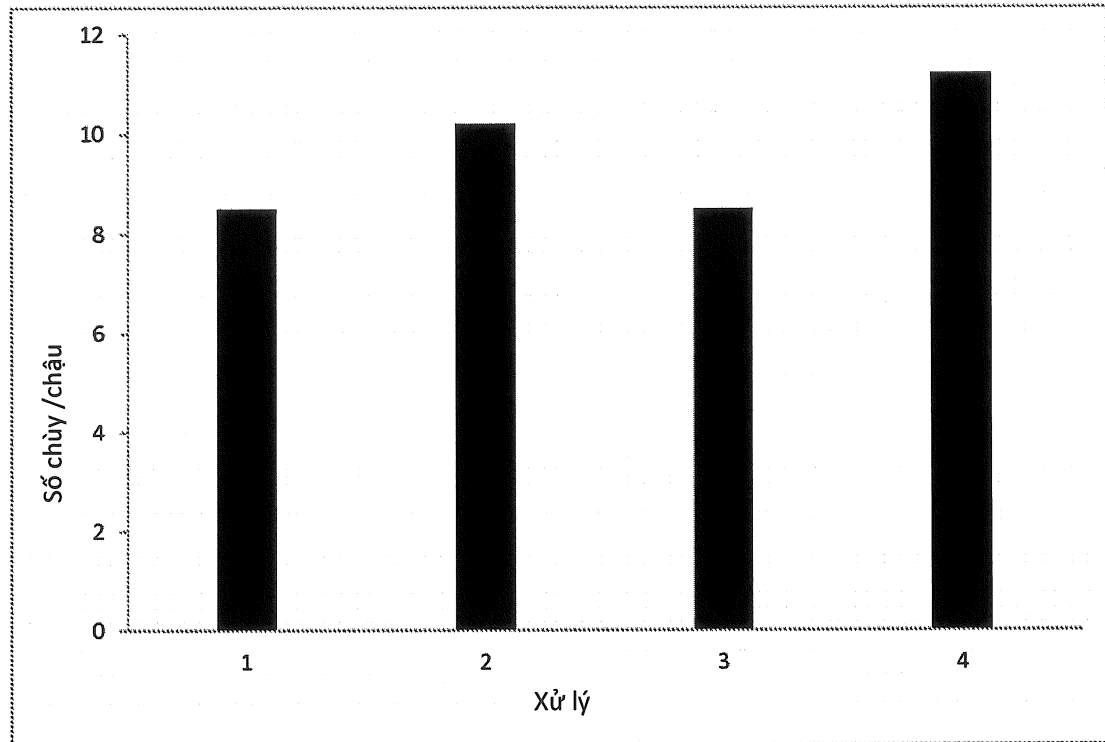


Fig.25

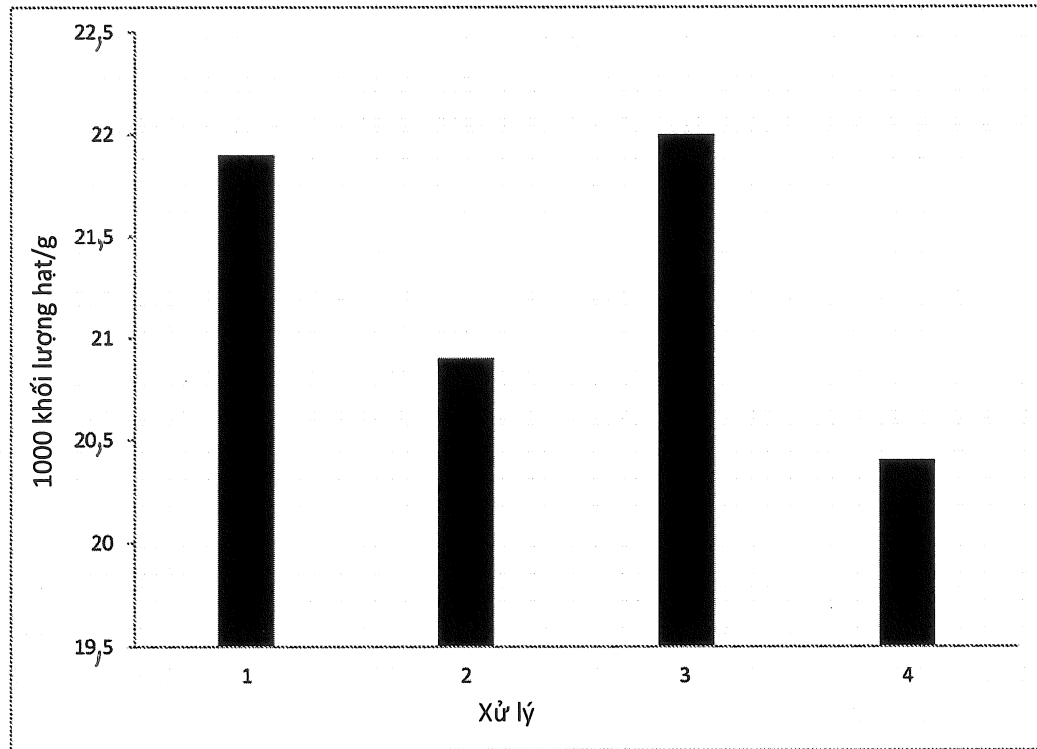


Fig.26

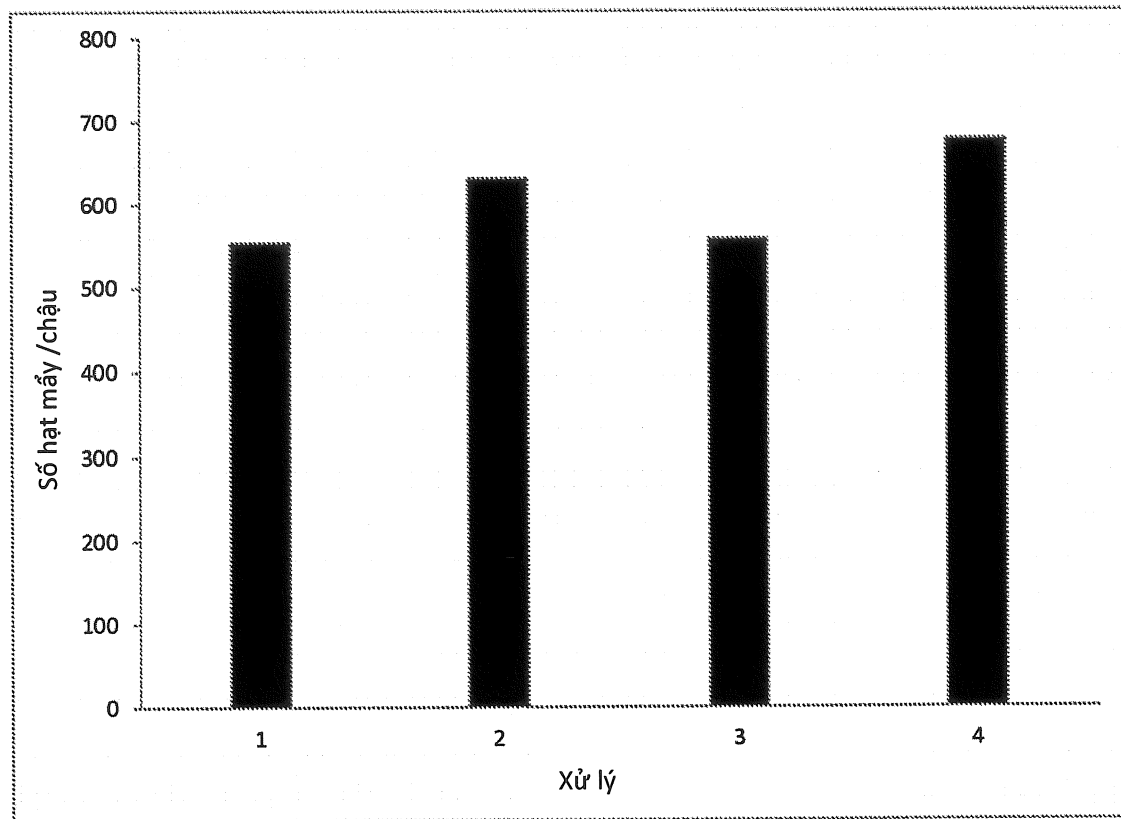


Fig.27

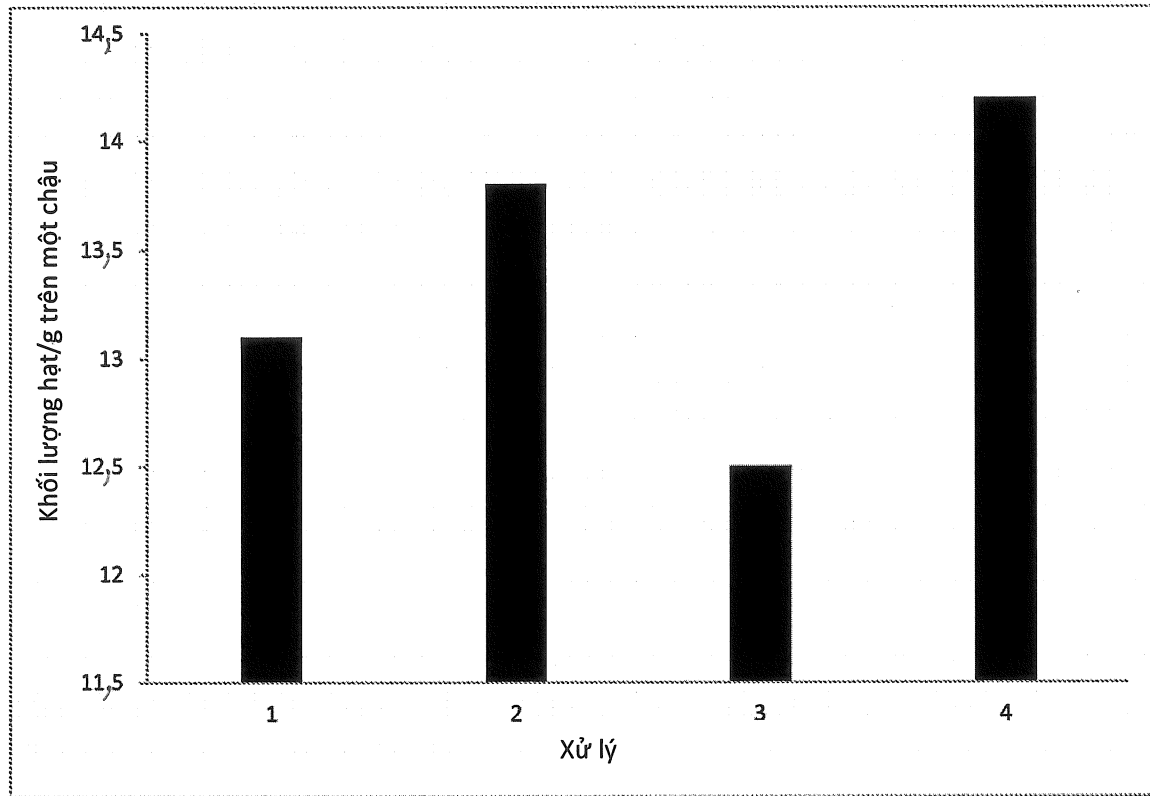


Fig.28