



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Determinación de alcanos en productos de petróleo
por HPTLC-Fluorescencia inducida

Determination of alkanes in petroleum products by
HPTLC-induced fluorescence

Autor/es

Rubén Tejel Puisac

Directores

Jesús Vela Rodrigo
Vicente Luis Cebolla Burillo

Instituto de Carboquímica
Departamento de Química Analítica
Curso 2018/2019

Índice

1. Resumen.....	1
2.-Introducción.....	3
2.1.-Los productos pesados de petróleo y las técnicas analíticas	3
2.2.-Desarrollo actual de HPTLC.....	3
2.3.-La determinación de Saturados por HPTLC-densitometría de FL.....	4
2.4.-El enfoque semicuantitativo.....	4
3.-Objetivos y planteamiento	5
4.-Parte experimental	5
4.1.- Materiales y productos químicos	5
4.2.- Instrumentación	6
4.3.- Muestras.....	7
4.3.1.- Valores de referencia de la muestra de aceite de base	7
4.3.2.- Preparación de las muestras y sus disoluciones	7
4.4.-Alcanos	8
4.4.1.-Preparación de sus disoluciones.....	8
5.-Resultados y discusión.....	9
5.1.- Estudio de las variables para la optimización de la separación y detección de los Saturados.....	9
5.1.1.- Estudio del tipo/concentración de fluoróforo para la detección de Saturados por fluorescencia inducida.....	9
5.1.2.- Comparación de sistemas de desarrollo HPTLC para la separación de las muestras que contienen Saturados.....	11
5.1.3.- Optimización de la secuencia de separación.....	13
5.2.- Desarrollo de métodos semicuantitativos	14
5.2.1.- Respuesta fluorescente de los alcanos en HPTLC-fluorescencia inducida por berberina.....	14
5.2.1.1.- Respuestas individuales y elección de patrón representativo.....	14
5.2.1.2.- Repetibilidad general.....	16
5.2.2.- Calibración por adición estándar.....	17
5.2.2.1.- Elección de cantidad de muestra.....	17
5.2.2.2.- Calibración de las muestras por adición estándar.....	17
5.2.3.- Calibración por patrón externo	20
5.2.4.- Comparación de la validez de los métodos de calibración, ventajas y limitaciones del análisis.....	21
6.-Conclusiones	23
7.-Bibliografía	23

1.-Resumen

En este trabajo se ha desarrollado un método semicuantitativo para la determinación de Saturados en cuatro productos de petróleo por la técnica HPTLC-densitometría por fluorescencia inducida.

Para ello, se optimizaron las condiciones de separación y detección de los Saturados. Se estudiaron cuatro diferentes secuencias de desarrollo y tres tecnologías de separación diferentes: cámara vertical, cámara horizontal y AMD. Se escogió AMD y la secuencia utilizada fue de 3 etapas basada en el desarrollo secuencial con THF 30mm, DCM/MeOH (80/20%) 50 mm y n-heptano 70mm. En cuanto a condiciones de detección, se estudiaron la respuesta de alcanos individuales usando dos inductores de fluorescencia (berberina y primulina) a dos concentraciones diferentes. Se escogió la berberina (120 mg/l) para la impregnación post-cromatográfica de las placas.

Se estudiaron las respuestas individuales de los alcanos en el sistema para elegir un patrón mezcla de alcanos para el calibrado de los Saturados en las muestras. Éste se realizó mediante los métodos de adición estándar y patrón externo. El patrón representativo escogido para el análisis semicuantitativo fue la mezcla de cinco alcanos entre C_{24} y C_{35} (n-octacosano, n-dotriacontano, 7-hexiloadecano, n-tritriacontano y n-pentatriacontano), que mostró unos parámetros analíticos correctos.

Se discutió la validez de los resultados obtenidos. En el caso del aceite de base, se compararon a dos valores de referencia obtenidos en dos laboratorios diferentes. La calibración por patrón externo permitió obtener unos resultados coherentes respecto del contenido en Saturados típico de estas muestras y coincidentes con los valores de referencia de los Saturados del aceite de base. Por su parte, la calibración por adición estándar presentó una sobreestimación del contenido en Saturados.

Abstract

In this work, a semiquantitative method was developed for the determination of Saturates in four petroleum products using HPTLC-densitometry by induced fluorescence technique.

For this purpose, the conditions of separation and detection of Saturates were optimized. Four different development sequences and three different separation technologies were studied: vertical chamber, horizontal chamber and Automated Multiple Development (AMD). AMD was chosen and a 3-step sequence was used, based on a sequential development with THF 30mm, DCM/MeOH (80/20%) 50 mm and then n-heptane 70mm. Concerning detection conditions, responses of individual alkanes were studied using two fluorescence probes (berberine and primuline) at two different concentrations. Berberine (120 mg/l) was chosen for post-chromatographic impregnation of the plates.

The individual responses of the alkanes in the system were studied in order to select a standard consisting of mixture of alkanes for calibrating Saturates in the samples. Calibration was carried out by both standard addition and external standard methods. The representative standard chosen for semi-quantitative analysis was the mixture of five alkanes between C_{24} and C_{35} (n-octacosane, n-dotriacontane, 7-hexyloctadecane, n-tritriacontane and n-pentatriacontane), which showed adequate analytical parameters.

The validity of the obtained results was discussed. In the case of the base oil, two reference values which were obtained in two different laboratories were compared. Calibration by external standard allowed coherent results regarding the typical Saturated content of these samples to be obtained. In particular, external standard result was in agreement with the reference values obtained for Saturates from the base oil. On the other hand, calibration by standard addition showed an overestimation of the content in Saturates.

2.-Introducción

2.1.-Los productos pesados de petróleo y las técnicas analíticas

Los productos pesados derivados de la conversión del petróleo son mezclas complejas de compuestos de alto peso molecular y polaridad, que incluyen hidrocarburos saturados, cicloaromáticos, compuestos policíclicos aromáticos y heterociclos relacionados y metales, entre otros. A medida que aumenta su punto de ebullición y su viscosidad, su análisis se hace cada vez más difícil hasta el punto de que tanto la separación molecular completa como la cuantificación de analitos diana individuales están excluidas en su control de calidad rutinario. Normalmente, en refinería, la relación entre la composición química de los productos y los parámetros de conversión de petróleo y su cinética suelen establecerse a través del análisis de grupos de hidrocarburos, también conocido como SARA, acrónimo de Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfaltenos^{1,2}. Los Saturados son, en general, alcanos, cicloalcanos y olefinas, aunque en este trabajo las muestras no presentaban olefinas.

La Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en columna permiten separaciones moleculares muy eficaces en diversas muestras dentro de un rango de punto de ebullición y polaridad, normalmente hasta el rango de gasolina. Sin embargo, en su aplicación a los productos de “fondo de barril”, dichas técnicas se revelan limitadas pues una gran parte de los productos a analizar quedan retenidos irreversiblemente dentro de las columnas. Para el análisis SARA, se ha empleado HPLC con fase estacionaria amino-silano y detección por refractometría diferencial (RI), sobre todo para el análisis de los Aromáticos. Sin embargo, esta técnica presenta problemas tales como baja sensibilidad y estabilización de la línea de base, así como el coleo de los picos³. Además, la determinación de los Saturados suele llevarse a cabo por diferencia, y no directamente, o bien gravimétricamente en columna abierta (norma ASTM D2007). Por su parte, las técnicas de Espectrometría de Masas se están aplicando directamente al análisis de clases de hidrocarburos, aunque su uso requiere sofisticados equipos que no están comúnmente disponibles para control de calidad^{4,5}.

2.2.-Desarrollo actual de HPTLC

En su estado actual de desarrollo, La Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC) está demostrando ser una técnica muy apropiada para el análisis de mezclas complejas que abarcan un amplio rango de polaridad.⁶ Actualmente, HPTLC es una técnica analítica modular, automatizada y controlada por ordenador en sus etapas básicas (aplicación de muestra, desarrollo cromatográfico y detección). Para cada una de estas etapas, existen varias opciones instrumentales con diferentes niveles de sofisticación dependiendo del problema analítico planteado. Así, se han desarrollado diferentes instrumentos para cada etapa⁷ que incluyen aplicadores automáticos de muestra por nebulización, cámaras de desarrollo cromatográfico automatizado con la posibilidad de separación en gradiente^{8,9}, densitómetros de barrido (UV y FL), sistemas de documentación electrónica, ensayos de bio-actividad¹⁰, y, sobre todo, un sistema de acoplamiento online de las bandas separadas sobre la placa cromatográfica a equipos comerciales de Espectrometría de Masas (MS)¹¹. Esto ha abierto la puerta a muchas posibilidades analíticas¹²⁻¹⁴.

Este desarrollo tecnológico permite poner en valor las propiedades intrínsecas que ha tenido esta técnica en sus versiones más clásicas y que son valoradas por los analistas que trabajan en

muestras complejas. En primer lugar, y a diferencia de las técnicas de columna, en HPTLC todos los componentes de una muestra son almacenados en la placa, incluso si no pueden ser desarrollados por la fase móvil. De aquí que pueden ser detectados y cuantificados sobre la placa. Además de ese papel de almacenamiento, es posible llevar a cabo múltiples acciones sobre una misma placa, tales como re-desarrollo con otros disolventes, re-detección UV y FL en otras condiciones, o derivatización usando diferentes reactivos para producir cromóforos o desarrollar fluorescencia. Es decir, existe la posibilidad de multidetección, que puede incluir como etapa final el acoplamiento a MS.

La modularidad de HPTLC involucra acciones manuales para transferir las placas de un módulo a otro. Ésto, lejos de ser una desventaja, confiere a la HPTLC un alto grado de flexibilidad que otras técnicas analíticas no poseen⁶. Además, tiene otras ventajas intrínsecas tales como: la aplicación en paralelo de muestras y patrones sobre la misma placa; la utilización de pequeños volúmenes de disolventes; y la posibilidad de obtener el cromatograma (densitograma) y también una imagen de la placa desarrollada.

2.3.-La determinación de Saturados por HPTLC-densitometría de FL

Los hidrocarburos saturados no muestran espectro UV en las condiciones habituales de trabajo analítico. Sin embargo, el grupo de investigación del ICB-CSIC demostró que ciertos fluoróforos de tipo alcaloide, como el catión berberina y la primulina, experimentan incrementos en su emisión fluorescente en presencia de hidrocarburos saturados y, en general, moléculas con largas cadenas hidrocarbonadas. Esto ocurre sin apreciables cambios en la longitud de onda de emisión. Así, en una placa cromatográfica impregnada con estos fluoróforos (pre o post-cromatográficamente), es posible medir los aumentos de fluorescencia producidos por los hidrocarburos saturados respecto de su línea de base¹⁵⁻¹⁹.

Se demostró que la fluorescencia es generada por interacciones electrostáticas débiles, de tipo ión-dipolo inducido entre el fluoróforo y el alcano^{15,16}. De este modo, el alcano crea un microentorno apolar que aísla al fluoróforo e impide desexcitaciones no-radiativas. La respuesta fluorescente depende de la masa del alcano aplicado y de su longitud de cadena.

Estrictamente hablando, la impregnación con estos fluoróforos no es un procedimiento de derivatización pues solamente están involucradas interacciones no-covalentes¹⁷.

En este trabajo se aborda la determinación del grupo de Saturados de productos pesados de petróleo que cubren diferentes tipos de productos que se obtienen en refinería: bitumen, producto de refino (por hidrogenación catalítica), aceite de base para lubricantes, y gasoil de vacío. Dichos productos, con muy diferentes propiedades físico-químicas, tienen diferentes cortes de hidrocarburos saturados y proporciones en su composición. Se utilizará para su detección el método descrito de impregnación post-cromatográfica de las placas con los compuestos inductores de fluorescencia.

2.4.-El enfoque semicuantitativo

La cuantificación suele estar basada en la disponibilidad de los analitos como patrones de calibración. Sin embargo, en el caso de muestras complejas, es demasiado costoso o directamente inviable disponer de patrones para todos los posibles compuestos desconocidos²⁰.

El enfoque semicuantitativo tiene sentido para compuestos desconocidos agrupados en clases. Está basado en la idea de que un analito desconocido puede ser cuantificado usando como patrón

un compuesto diferente, aunque conocido^{20,21}. Para un sistema de detección dado, el Factor de Respuesta (RF) de un compuesto depende de la estructura química. Así, la magnitud del error en la estimación será directamente proporcional a la diferencia entre el RF del patrón y el analito. Sin embargo, un error mayor es preferible a no tener datos, cosa que suele suceder con los compuestos desconocidos en determinados análisis (por ejemplo, el lipidoma).

La cromatografía en sílica gel (ya sea en modo HPLC o HPTLC) permite separar muestras muy complejas en clases homogéneas de compuestos agrupados por familias químicas. Este hecho no es muy infrecuente en Química Analítica. Así, por ejemplo, los lípidos pueden ser separados en clases de acuerdo con su grupo polar de cabeza, incluyendo cada clase especies que sólo difieren en la longitud de sus cadenas de ácidos grasos²². Otro ejemplo son las cloroparafinas en productos alimenticios, en los que las especies desconocidas muestran diferentes longitudes de cadena alquílica y número de átomos de cloro por molécula²³. Finalmente, en este caso los productos de la conversión del petróleo se suelen separar en clases SARA, como ya se ha comentado.

3.-Objetivos y planteamiento

El objetivo principal de este trabajo es analizar el contenido en Saturados de un grupo de cuatro productos pesados de petróleo que ejemplifican la variedad encontrada en una refinería (un bitumen, un producto de refino, un aceite de base, y un gasoil de vacío).

Para ello, se pretenden optimizar las condiciones de separación y detección de los Saturados. Se estudiarán diferentes secuencias de desarrollo y tres tecnologías de separación diferentes: cámara vertical con cubetas, cámara horizontal y AMD (desarrollo múltiple automatizado para separación en gradiente). En cuanto a condiciones de detección, se estudiarán la respuesta de alcanos individuales usando dos inductores de fluorescencia (berberina y primulina) a dos concentraciones diferentes.

Asimismo, se elegirá un patrón mezcla de alcanos de diferentes longitudes de cadena para el calibrado de los Saturados en las muestras, que se realizará mediante los métodos de adición estándar y patrón externo. Se discutirá la validez de la elección y los resultados obtenidos. En uno de los casos, se compararán a dos valores de referencia obtenidos en dos laboratorios diferentes.

4.-Parte experimental

4.1.- Materiales y productos químicos

-Placas de HPTLC, gel de sílice (20 x 10 cm para AMD y placas de 10 x 10 cm para desarrollo horizontal, tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula 6 µm, espesor de capa 0,20 mm), de Merck (Darmstadt, Alemania).

-En la tabla 1 se muestran los disolventes utilizados para la fase móvil y para la disolución de alcanos, muestras y fluoróforos.

Disolvente	Marca	Composición	Nº CAS
Tetrahidrofurano(THF)	Panreac	99,9%	109-99-9
Diclorometano(DCM)	Panreac	99,8% estabilizado con 0,2% de etanol PS	75-09-2
n-heptano	Panreac	99,0%	142-82-5
Metanol(MeOH)	Panreac	99,8%	67-56-1

Tabla 1. Disolventes utilizados en la parte experimental

-Fluoróforos para impregnación de placas HPTLC: hemi-sulfato de berberina (Sigma-Aldrich; CAS 633-66-9) y primulina (contenido en fluoróforo: 50%; Sigma-Aldrich; CAS 8064-60-6).

-Otros materiales: Vasos de precipitados, matraces de 100 ml, vasos Erlenmeyer de 250 ml, pipetas de 5 ml y 1 ml, micropipetas 10-100 μ L, puntas de micropipetas, pipetas Pasteur, viales, baño de ultrasonidos y espátula.

4.2.- Instrumentación

Los experimentos HPTLC sobre placas de sílica gel se han llevado a cabo utilizando la siguiente instrumentación (CAMAG, Müttenz, Suiza):

Aplicador automático de muestra por nebulización (ATS4): permite aplicar las muestras en forma de bandas de tamaño y forma variable (rectángulos, mm), con densidad constante debido a la deposición por nebulización y en las coordenadas deseadas en la placa. La función “overspotting” permite incrementar la sensibilidad y dopar las bandas mediante aplicaciones sucesivas sobre la misma banda. En este trabajo la longitud aplicada en las bandas fue de 4 mm.

Sistemas de desarrollo HPTLC. Los siguientes sistemas han sido utilizados:

- Cámara de elución vertical con cubetas tradicionales

Cubeta tradicional manual con la placa en posición vertical. La fase móvil se deposita en la parte inferior de la cámara y el movimiento se produce por capilaridad, retirando la placa en el momento en que la fase móvil llega a la distancia que hemos marcado.

- Cámara de elución horizontal

Esta cámara proporciona una alta eficacia en la separación ya que el flujo del disolvente no va en contra de la fuerza de la gravedad. La fase móvil, colocada en dos reservorios (de 2-3 mL cada uno), se pone en contacto con la placa (moviendo una pieza de vidrio), la cual lleva la sílica gel hacia abajo. El consumo es mínimo ya que el volumen libre alrededor de la placa es mínimo. Una vez la fase móvil haya recorrido la placa hasta la distancia fijada, se saca de la cámara y se deja secar.

- Cámara de Desarrollo múltiple automatizado(AMD)

AMD2 es una cámara automatizada que opera en etapas de desarrollo sucesivas (de varios mm cada una), las cuales se llevan a cabo variando la polaridad de la fase móvil en combinación con un incremento de la distancia de migración. La composición de la fase móvil es diferente en cada etapa y puede ser ajustada variando las proporciones de hasta cinco disolventes. La combinación

de: desarrollo incremental, gradiente por etapas y la posibilidad de refocalizar las bandas (mediante repetición de las etapas), proporciona picos estrechos y eficientes separaciones de modo altamente reproducible ($\pm 0,45$ mm).

Detección por densitometría UV y de fluorescencia. Se ha llevado a cabo mediante el escáner TLC3. En modo UV, las placas fueron barridas a diferentes longitudes de onda (190 nm, 254 nm). Las placas se impregnaron post-cromatográficamente usando el dispositivo de Inmersión Camag III, mediante disoluciones de berberina (60 y 120 mg/l) o primulina (0,02 y 0,04 % m/v) en MeOH. En el modo de fluorescencia, las placas fueron barridas a $\lambda_{exc}=365$ nm y la detección a $\lambda > 400$ nm, con un tamaño de haz de 4 x 0,2 mm.

Otros equipos utilizados: balanza analítica de precisión $\pm 0,01$ mg y estufa de secado.



Figura 1. Se muestra de izquierda a derecha los siguientes instrumentos explicados anteriormente: AT4, cubetas tradicionales, cámara de elución horizontal y AMD.

4.3.- Muestras

Fueron proporcionadas por TOTAL Raffinage & Marketing, Paris, Francia. Las muestras (libres de olefinas) fueron las siguientes: Gasoil de vacío (VGO) 28783-119581, Producto de Refino C-20841-79003, Bitumen N1478 y Aceite de base 27494-111835.

4.3.1.- Valores de referencia de la muestra de aceite de base

- Se dispone de dos valores de referencia obtenidos por las técnicas siguientes: 1) HPLC en columna de fase amino y detección diferencial por índice de refracción, realizado en el centro de investigación de TOTAL en Gonfreville (Francia). Porcentaje en Saturados: 80,6 % en peso. 2) Aislamiento de los Saturados mediante TLC preparativa (en capa de 1 mm de espesor), desarrollo con n-heptano, raspado de la banda separada, eliminación de disolvente en rotavapor y obtención del porcentaje de Saturados por pesada (76,6 % en peso).

4.3.2.- Preparación de las muestras y sus disoluciones

VGO y Aceite de base fueron calentados durante 30 minutos a 80°C en una estufa de secado para aportar fluidez y homogeneizar la toma de muestra. Por su parte, el bitumen y el producto de refino fueron calentados a 150°C durante el mismo tiempo, debido a su elevada viscosidad. De

este modo se pudo realizar la pesada de 5 mg mediante una micropipeta y posterior disolución en 5 ml de THF. Obteniendo una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. La concentración real obtenida para cada muestra se recoge en la tabla 2.

Muestras	Concentración(mg/ml)
Producto de refino	1,19
Bitumen	1,20
Aceite de base	1,11
Gasoil de vacío(VGO)	1,21

Tabla 2. Concentraciones de las muestras

4.4.-Alcanos

Los alcanos utilizados fueron los siguientes: n-hexadecano ($C_{16}H_{34}$), n-octadecano ($C_{18}H_{38}$), n-tetracosano ($C_{24}H_{50}$), 7-hexiloctadecano ($C_{24}H_{50}$), n-octacosano ($C_{28}H_{58}$), n-dotriacontano ($C_{32}H_{66}$), n-tritriacontano ($C_{33}H_{68}$), n-pentatriacontano ($C_{35}H_{72}$) y n-hexatriacontano($C_{36}H_{74}$).

4.4.1.-Preparación de sus disoluciones

-Estudio individual de alcanos en HPTLC-densitometría. Se pesó 5 mg del correspondiente alcano y se disolvió en 5 ml de THF en un vial para conseguir una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. Cuando fue necesario, se aplicó ultrasonidos para la disolución de los alcanos. Para el desarrollo del método cuantitativo se decidió disolver los alcanos alternativamente en n-heptano puesto que algunos alcanos largos presentaron ciertos problemas de disolución en THF. La concentración real obtenidas para cada alcano se recogen en la tabla 3.

Alcanos	Concentración(mg/ml)
n-hexadecano	1,18
n-octadecano	1,28
n-tetracontano	1,01
n-octacosano	1,15
n-dotriacontano	1,16
n-tritriacontano	1,15
n-pentatriacontano	1,04
n-hexatriacontano	1,03
7-hexiloctadecano	0,98

Tabla 3. Concentraciones de los alcanos

-Mezcla de alcanos como patrón representativo de los Saturados de las muestras. Según los resultados de respuesta de los alcanos individuales obtenidos en el apartado 4, se preparó una mezcla de alcanos elegidos para actuar como patrón representativo. Para ello, se añadió 1 ml de cada alcano elegido en un vial, utilizando una pipeta, para obtener un volumen total de 5 ml. La concentración real obtenida para la mezcla fue de 1,10 mg/mL.

-La disolución individual de n-octadecano se utiliza como referencia interna para corregir la señal fluorescente entre placas diferentes.

5.-Resultados y discusión

5.1.- Estudio de las variables para la optimización de la separación y detección de los Saturados

El protocolo de aplicación de muestra mostrado en la figura 2 se utilizó para el estudio previo de las variables. Allí se muestra un esquema gráfico con las muestras aplicadas y pistas con blanco en la placa, el volumen aplicado en cada caso y sus correspondientes coordenadas.

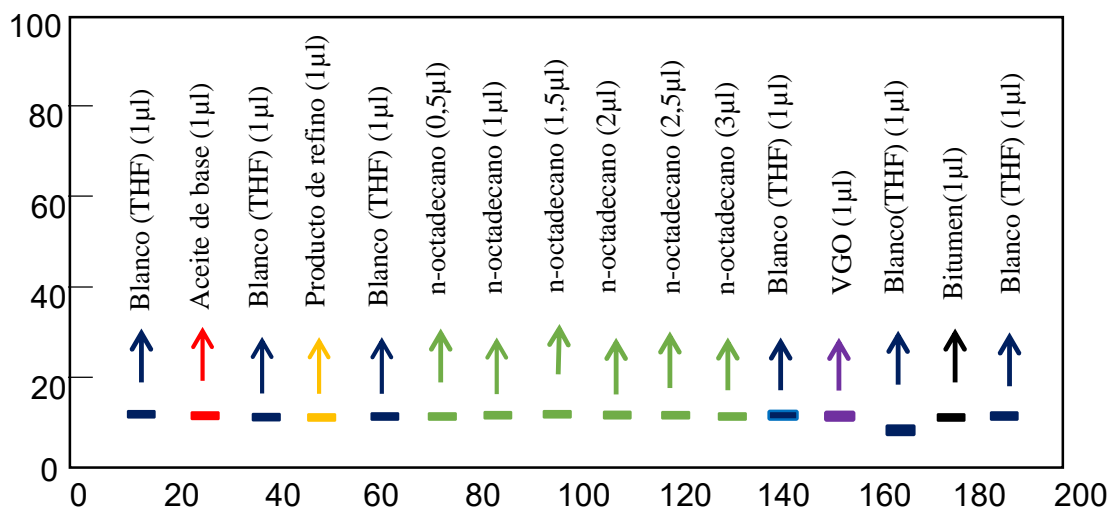


Figura 2. Protocolo de aplicación de muestra para la optimización. La longitud de banda aplicada fue de 4 mm.

5.1.1.- Estudio del tipo/concentración de fluoróforo para la detección de Saturados por fluorescencia inducida

Tras la aplicación de las muestras del apartado anterior en placa HPTLC, se realizaron impregnaciones post-cromatográficas de placas HPTLC con las disoluciones de los fluoróforos descritas en la parte Experimental: berberina en MeOH (60 y 120 mg/L), y primulina en MeOH (0,02% y 0,04% m/v).

Para la detección se usó densitometría UV y de fluorescencia. Primero, se registraron los cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda (190 nm y 254 nm), utilizando las lámparas de deuterio y wolframio. Posteriormente, y tras impregnar las placas, se utilizó el modo de fluorescencia para la detección de picos por excitación a 365 nm, utilizando la lámpara de mercurio. La emisión fue recogida mediante un filtro, a partir de 400 nm.

Previamente, el desarrollo cromatográfico de la placa se había realizado en este caso con una cámara de elución vertical con cubetas tradicionales utilizando una secuencia de tres etapas basada en: 1) desarrollo con THF hasta 30 mm, luego DCM hasta 50mm y, finalmente n-heptano hasta 70mm. El desarrollo fue de fase móvil más polar a menos polar.

Como resultados, en ultravioleta no se observó ninguna señal de emisión en las dos longitudes de onda utilizadas, lo cual concuerda con resultados previos obtenidos por el grupo, ya que los alcanos no tienen respuesta en UV en el rango habitual de trabajo analítico. Los alcanos y los Saturados correspondientes a las muestras de petróleo mostraron picos de fluorescencia intensos respecto de la señal fluorescente nativa de berberina o primulina impregnadas en la placa. Este hecho se muestra en la figura 3.

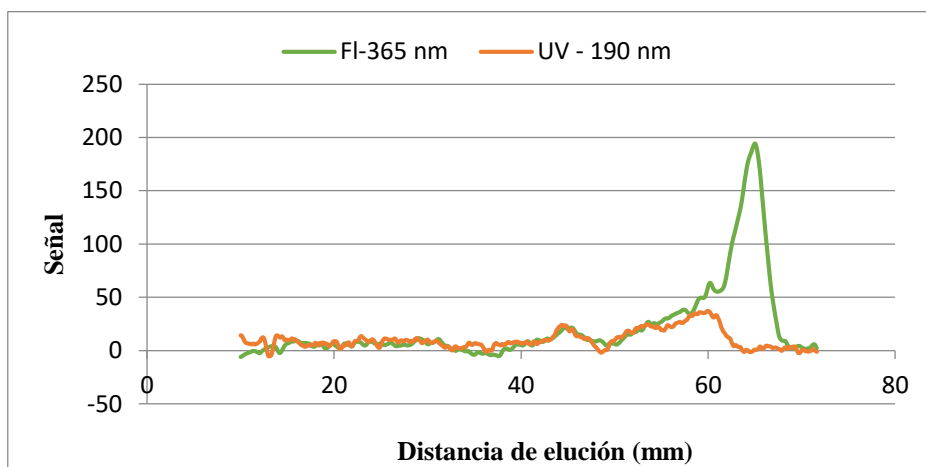


Figura 3. Cromatogramas de la muestra VGO con detección por densitometría UV (190nm) y fluorescencia (365 nm) inducida por berberina.

Se calcularon las intensidades de fluorescencia en forma de áreas, con sustracción del blanco para cada una de ellas. Seguidamente se representaron las rectas de calibrado del alcano n-octadecano para cada placa, representando la intensidad de fluorescencia(áreas) frente a la masa aplicada. Se obtuvieron los siguientes resultados:

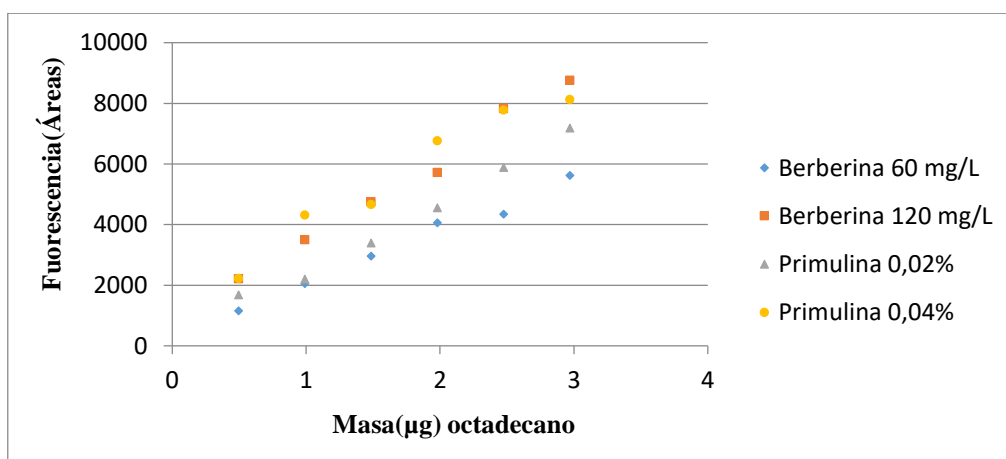


Figura 4. Intensidad de fluorescencia (áreas) frente la masa(µg) de octadecano obtenidas para cada una de las condiciones post-impregnaciones y detección de las placas.

Berberina	60 mg/L	Pendiente	1752,5	Cámara de elución vertical
		O. Origen	324,05	
		Coef. Correlación	0,9932	
	120 mg/L	Pendiente	2696,7	
		O. Origen	786,11	
		Coef. Correlación	0,9950	
Primulina	0,02%	Pendiente	2292,3	
		O. Origen	174,71	
		Coef. Correlación	0,9935	
	0,04%	Pendiente	2423,7	
		O. Origen	1440,3	
		Coef. Correlación	0,9771	

Tabla 4. Parámetros de las rectas de calibrado del n-octadecano obtenidas para cada una de las condiciones de detección estudiadas.

A la vista de los resultados se decidió elegir la berberina con concentración 120 mg/L como nuestro inductor de fluorescencia óptimo ya que es la que presentaba mayor pendiente y por lo tanto mayor sensibilidad.

5.1.2.- Comparación de sistemas de desarrollo HPTLC para la separación de las muestras que contienen Saturados

Se realizó un estudio comparativo entre los diferentes sistemas de elución en HPTLC descritos en Experimental: una cámara tradicional de elución vertical, una cámara de elución horizontal, y un sistema automatizado AMD2.

Se compararon las siguientes condiciones de desarrollo cromatográfico: THF hasta 30 mm, luego DCM hasta 50 mm y, finalmente n-heptano 70 mm. El resto de las condiciones de análisis fueron las mismas que en el apartado 1, si bien se utilizaron los diferentes sistemas de elución. Asimismo, se usaron las condiciones de impregnación que resultaron óptimas para la detección de los alcanos (berberina, a 120 mg/L).

Los tres sistemas de elución permitieron la separación adecuada de los Saturados respecto de los demás componentes de las muestras de los productos de petróleo, como se observa en la figura 5.

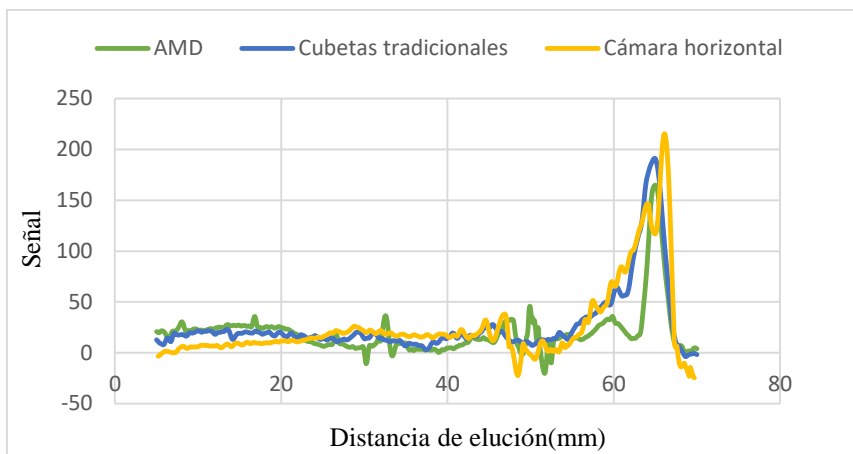


Figura 5. Cromatogramas de la muestra VGO con detección por fluorescencia inducida por berberina, obtenido para cada uno de los sistemas de desarrollo.

A igualdad de resultados respecto de los Saturados, se eligió finalmente el sistema AMD por sus ventajas adicionales a la hora de separar los compuestos aromáticos y polares de las muestras. Aunque no es el objetivo de este trabajo, se muestra una separación completa por AMD de un producto de refino en la figura 6.

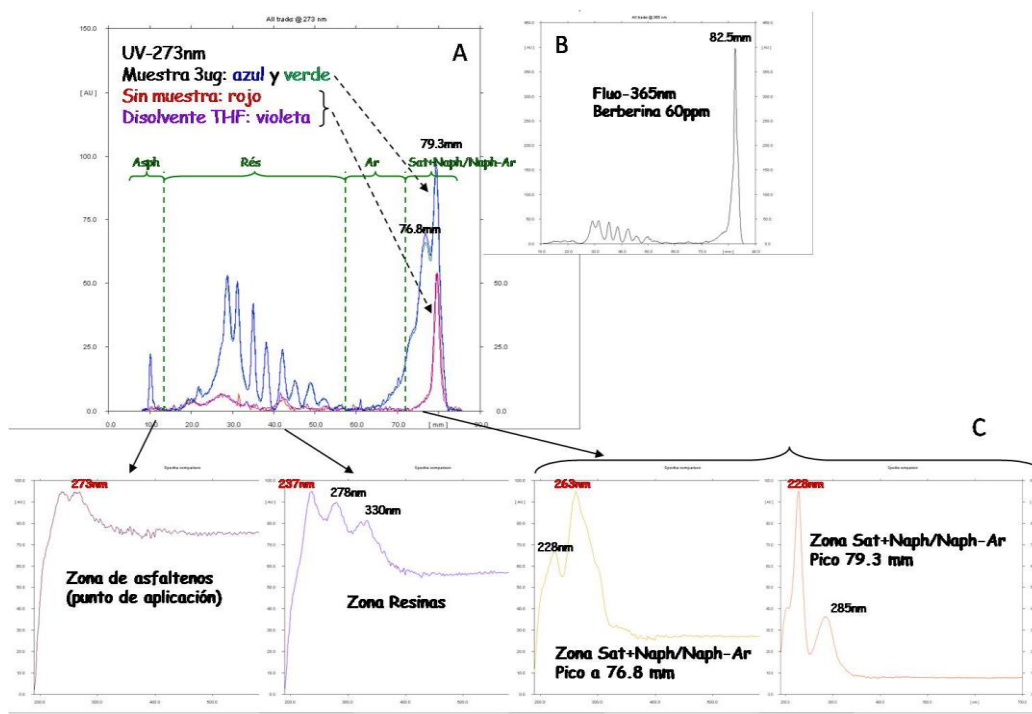


Figura 6. Separación cromatográfica por HPTLC usando AMD de un producto de refino de petróleo. En la parte izquierda (A) se observa la detección por densitometría UV de las distintas familias (asfaltenos, resinas, aromáticos y mezclas de naftenos/saturados y naftenos/aromáticos (76,8 y 79,3 mm). En la parte derecha (B) se observa la detección de compuestos saturados (82,5 mm) por fluorescencia inducida. Abajo (C), los espectros de absorción molecular UV correspondientes a cada una de las zonas señaladas en la parte (A) y obtenidos directamente desde las bandas separadas en la placa.

El sistema AMD es adecuado para muestras que comprenden un amplio rango de polaridad y permite mejorar la separación de las bandas mediante la modificación de la composición del

gradiente en la zona de migración escogida. Parece una interesante alternativa para obtener separaciones en muestras muy complejas.

5.1.3.- Optimización de la secuencia de separación

Una vez elegido el sistema AMD, se estudiaron cuatro secuencias diferentes a fin de elegir la más conveniente para la separación y determinación de Saturados en las muestras. El resto de las condiciones analíticas permanece constante:

- Secuencia directa con: 1) n-heptano 70mm, 2) DCM 50mm y 3) THF 30 mm,
- Secuencia inversa con: 1) THF 30mm, 2) DCM 50mm y 3) n-heptano 70mm
- Secuencia inversa con: 1) THF 20mm, 2) DCM 40mm y 3) n-heptano 60mm.
- Secuencia en gradiente (THF/DCM/n-Heptano) en 8 etapas (8 mm/etapa) sobre una distancia final de migración de 80 mm, representado en la figura 7.

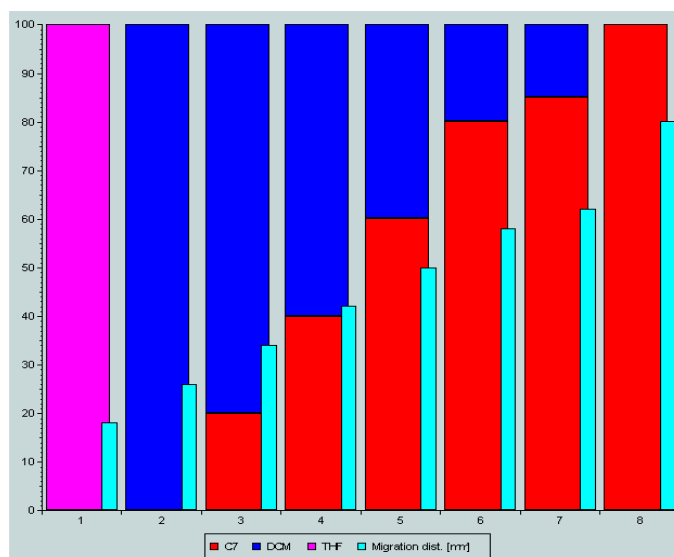


Figura 7. Secuencia AMD en gradiente. En ordenadas, se representa la distancia de migración(mm) y en abscisas, el número de etapa. La barra morada representa al THF, la azul oscuro al DCM y la roja al n-heptano. La barrita azul clara representa la distancia de migración(mm) de cada etapa.

La secuencia inversa va desde una fase móvil más polar a otra menos polar con migración creciente. Cada etapa comienza desde el origen, así que los sucesivos disolventes de cada etapa pasan por encima de la muestra. La secuencia directa va desde una fase móvil apolar a otra más polar, empezando a distancias largas de migración y con migraciones cada vez más cortas.

Todas las secuencias permitieron separar los Saturados de una forma correcta, como se muestra en la figura 8.

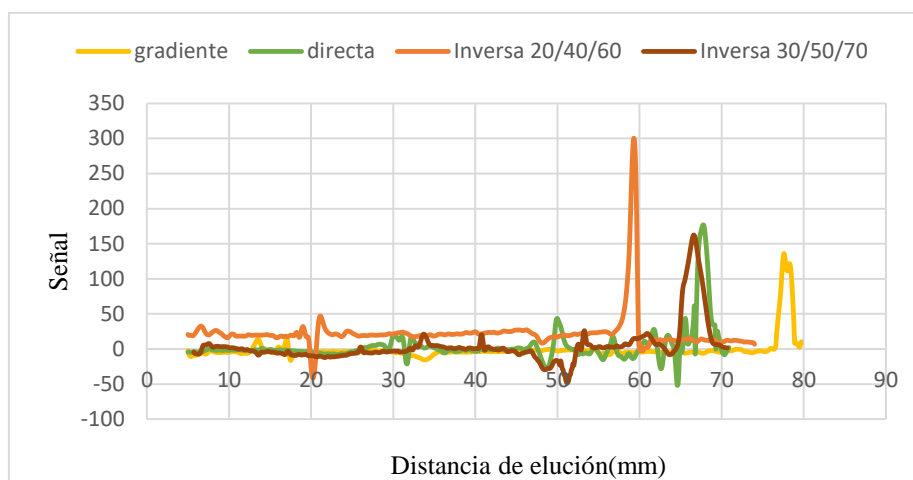


Figura 8. Cromatograma con detección por fluorescencia inducida por berberina de la muestra VGO, obtenido para cada una de las secuencias de separación utilizadas.

Como el objetivo en este trabajo eran únicamente los Saturados, se excluyó la secuencia en gradiente debido al alto tiempo de análisis comparada con las otras. Por otro lado, se eligió la secuencia inversa (THF 30mm, DCM 50mm y n-heptano 70mm) ya que el primer desarrollo con disolvente polar (THF) puede ayudar a la disolución-elución en el caso de muestras especialmente viscosas (p. ej., ciertos bitúmenes).

5.2.- Desarrollo de métodos semicuantitativos

5.2.1.- Respuesta fluorescente de los alcanos en HPTLC-fluorescencia inducida por berberina

5.2.1.1.- Respuestas individuales y elección de patrón representativo

Antes del estudio se decidió cambiar el disolvente DCM en el protocolo de desarrollo con el AMD ya que se habían observado interrupciones en la elución y daños en la placa de silica gel. Esto pudo ser debido a la presencia de trazas de agua en la botella, que provocaban la formación de HCl que atacaba al gel de sílice. El cambio de DCM por la mezcla DCM/MeOH (80/20%) resolvió el problema técnico, sin variación significativa de los resultados cromatográficos.

El objetivo de este apartado era estudiar las respuestas de los alcanos en el sistema HPTLC-fluorescencia inducida por berberina para escoger el alcano o la mezcla de alcanos más representativa, y así utilizarlo como patrón de calibración para el análisis de Saturados en las muestras.

Se utilizaron dos placas para estudiar las respuestas individuales de los alcanos. En cada una se aplicó 18 bandas con una distancia de 10 mm entre ellas. Entre las dos se aplicaron los distintos alcanos que se disponían, aplicando n-octadecano a las dos ya que es nuestra referencia interna para corregir la señal entre placas distintas. Los volúmenes de aplicación para cada alcano fueron 1, 2 y 3 μL . Además, se aplicó n-heptano, ya que se utilizó como blanco en este caso.

El desarrollo cromatográfico se realizó con el sistema AMD, utilizando una secuencia de 3 etapas basado en THF 30mm, DCM/MeOH (80/20%) 50 mm y n-heptano 70mm. Las demás condiciones fueron las mismas que en análisis anteriores.

Se calcularon los factores de respuesta de cada uno los alcanos y después se calculó el promedio, la desviación estándar y el %RSD del conjunto de alcanos, obteniendo los siguientes resultados:

Alcanos	Factores de respuesta	Nº Carbonos
n-hexadecano	823,4	C ₁₆
n-octadecano	2637,6	C ₁₈
n-tetracosano	1133,8	C ₂₄
7-hexiloctadecano	2044,2	C ₂₄
n-octacosano	1848,6	C ₂₈
n-dotriacontano	2316,9	C ₃₂
n-tritriacontano	2139,9	C ₃₃
n-pentatriacontano	2175,2	C ₃₅
n-hexatriacontano	1535,8	C ₃₆

Tabla 5. Factores de respuesta para cada alcano

Promedio	1850,6	Todos
Desv. Estandar	584,3	
% RSD	31,6	

Tabla 6. Resultados del conjunto de alcanos

Observando los resultados se decidió eliminar los alcanos que presentaban factores de respuesta muy distintos con respecto a la media de todos los alcanos, en este caso el n-hexadecano, n-octadecano, n-tetracosano y n-hexatriacontano. Se mejoró considerablemente la desviación estándar y el RSD utilizando una mezcla de los alcanos entre C₂₄ y C₃₅ (7-hexiloctadecano, n-octacosano, n-dotriacontano, n-tritriacontano y n-pentatriacontano). Estos resultados se muestran en la tabla 7.

Promedio	2105,0	De C ₂₄ a C ₃₅
Desv. Estandar	173,6	
% RSD	8,2	

Tabla 7. Resultados para conjunto de alcanos entre C₂₄ y C₃₅

Con esto se llegó a la conclusión que había cinco alcanos con un factor de respuesta similar, que se encontraban en un rango de longitud de cadena razonable para los productos. Estos alcanos podían formar una mezcla que fuera representativa para usarla como patrón de calibración, y así poder determinar los Saturados de los diferentes productos de petróleo.

Después se realizó una comprobación de la respuesta que tenía esta mezcla de alcanos y así poder utilizarla como patrón. Para ello, se utilizó una placa en la que se aplicaban los cinco alcanos que tenían factores de respuesta similares (n-octacosano, n-dotriacontano, 7-hexiloctadecano, n-tritriacontano y n-pentatriacontano) en una misma banda. Para ello se utilizó la función “overspotting”, que permite las aplicaciones sucesivas de varios viales sobre la misma banda. Los volúmenes de aplicación para cada alcano fueron 0,1 µL; 0,2 µL; 0,3 µL; 0,4 µL y 0,5 µL. Este proceso se realizó por triplicado en una misma placa. El protocolo de aplicación se muestra en la figura 9.

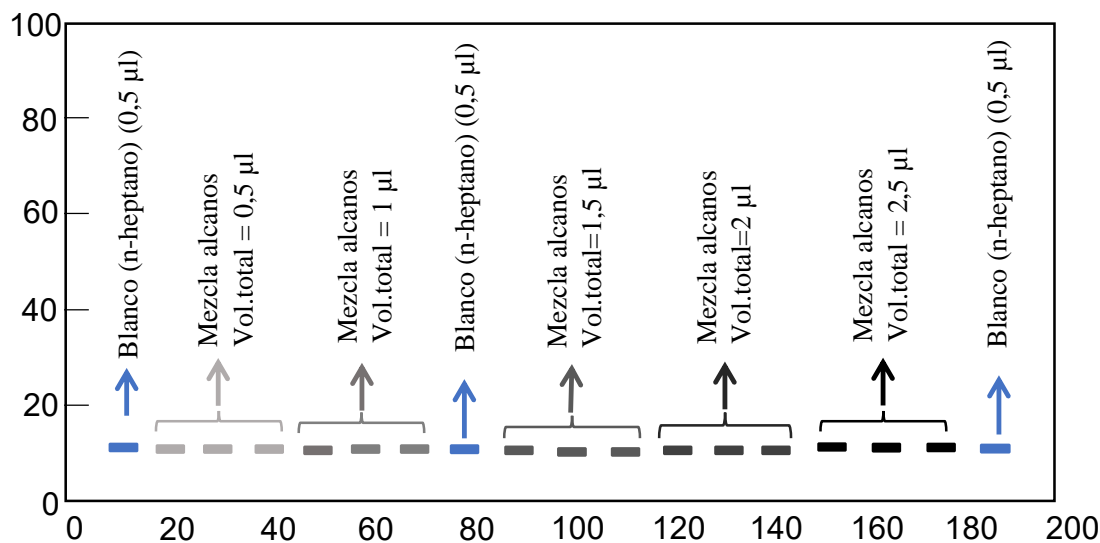
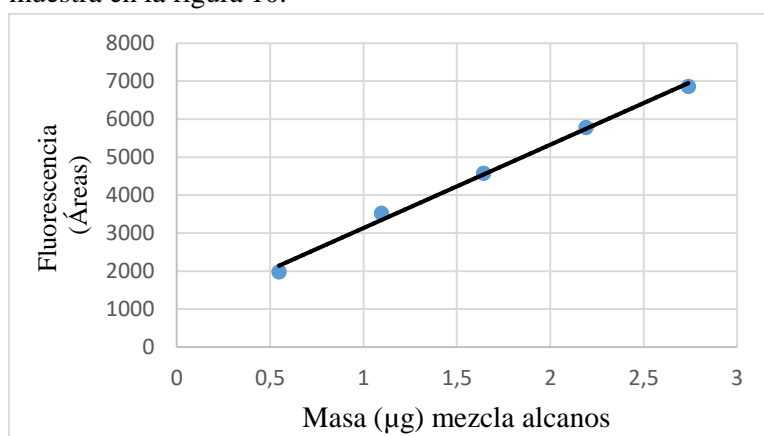


Figura 9. Protocolo de aplicación para la placa de comprobación de la mezcla de alcanos. El tamaño de banda aplicado ha sido de 4 mm.

Y con dicha mezcla de alcanos se realizó una calibración, obteniendo la recta de calibrado que se muestra en la figura 10.



Pendiente	2190,6
O. Origen	942,47
Coef. Correl	0,9953

Tabla 8. Parámetros de la recta

Figura 10. Recta de calibrado para la mezcla de alcanos

Como se muestra en la tabla 8, se obtuvo una recta de calibrado con un buen coeficiente de correlación. Por lo tanto, la mezcla de alcanos presentaba un buen rango lineal y se podía utilizar como patrón de calibración.

5.2.1.2.- Repetibilidad general

La mezcla patrón de alcanos seleccionada fue aplicada (1 µl) en 11 pistas de una placa, junto con el correspondiente blanco y la referencia interna. El Área promedio, la desviación estándar y el RSD obtenidos se muestran en la tabla 9, para n=11 (totalidad de las Areas aplicadas) y para n=9, eliminando las dos medidas correspondientes a las bandas aplicadas en los extremos de la placa, susceptibles de ser ligeramente diferentes debido a efectos de menisco en el desplazamiento del

frente de fase móvil. Se observa que en ambos casos (con y sin eliminación) la repetibilidad es aceptable usando esta técnica.

	Todos(n=11)	n=9
Promedio	6578,6	6610,7
Desv. Est	444,1	262,9
% RSD	6,8	4,0

Tabla 9. Resultados del estudio de la repetibilidad para la mezcla de alcanos

5.2.2.- Calibración por adición estándar

5.2.2.1.- Elección de cantidad de muestra

Se realizó un estudio de las muestras para saber la cantidad que es necesario inyectar para una correcta calibración por adición estándar. En este caso nos interesa que la cantidad de muestra sea mínima para que el efecto matriz sea menor.

Para ello se utilizaron dos placas y en cada una se aplicaron dos muestras distintas, con los siguientes volúmenes de aplicación: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 μL . Además, en cada una de las placas se aplicó n-octadecano, ya que es nuestra referencia interna, y THF, el cual se utilizó como blanco.

En la tabla 10 se muestran los valores de fluorescencia, en forma de áreas, de cada muestra, que se calcularon sustrayendo el valor de área del blanco.

Volumen de inyección (μl)	Áreas Aceite de base	Áreas VGO	Áreas Producto de refino	Áreas Bitumen
0,5	2183,1	1909,9	1663,8	-1056,2
1	3317,5	4250,0	3407,2	-1114,0
1,5	5348,0	5543,4	5991,1	103,5
2	5762,8	7110,6	8381,2	725,4
2,5	7636,9	9201,0	10170,2	2633,3
3	8965,2	11040,6	11295,9	5285,1

Tabla 10. Intensidades de fluorescencia(áreas) para cada una de las muestras

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que las muestras aceite de base, VGO y producto de refino se pueden cuantificar correctamente con aplicación de 0,5 μl ; pero con la muestra bitumen no sucede lo mismo ya que da valores de áreas negativas para unos volúmenes aplicados de 0,5 y 1 μl ; y un valor pequeño para un volumen de 1,5 y 2 μl . Esto sucede porque, en el caso del bitumen, es conocido que el porcentaje de Saturados es menor que en los otros productos estudiados. Teniendo en cuenta esto, se estimó que el volumen de aplicación necesario para llevar a cabo una correcta calibración por adición de patrón sería 2,3 μl .

5.2.2.2.- Calibración de las muestras por adición estándar

Se llevó a cabo para la determinación del porcentaje de Saturados en cada muestra. En principio, este método debería corregir los errores producidos por el efecto matriz que existe debido a la

complejidad de las muestras derivadas de la conversión del petróleo. Sin embargo, en el caso de estas muestras de “fondo de barril” es conveniente comparar varios métodos de calibración. El patrón utilizado fue la mezcla de alcanos preparada anteriormente. Para ello se utilizó la función “overspotting”. Se llevó a cabo una aplicación secuencial de nuestro patrón mezcla de alcanos y la muestra en la misma banda. El protocolo de aplicación de cada placa se muestra en las figuras 11 y 12.

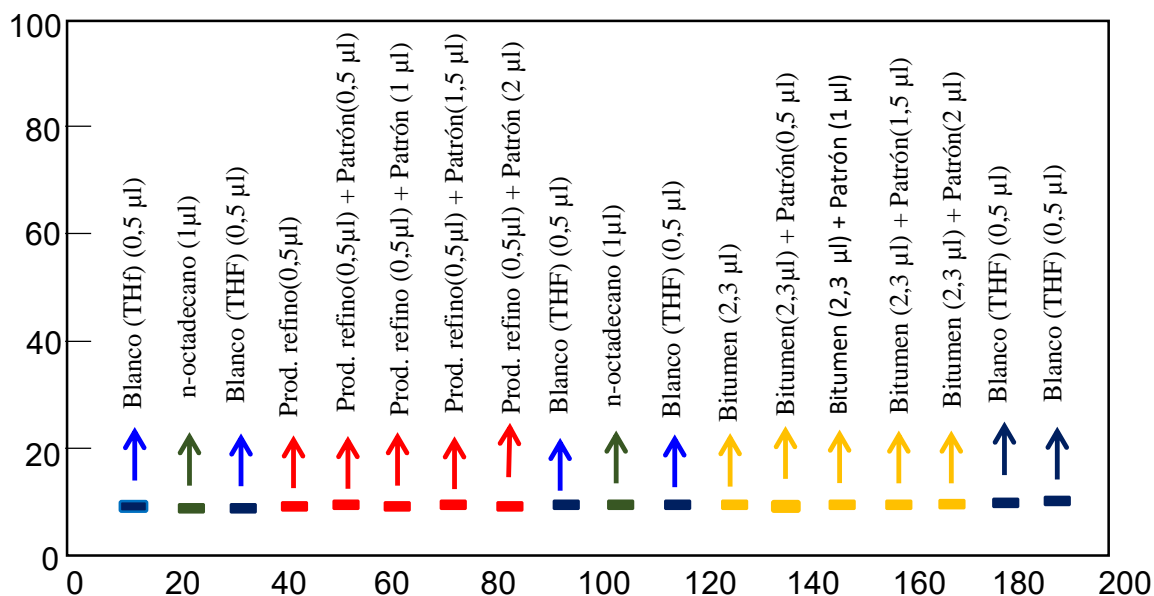


Figura 11. Protocolo de aplicación para la primera placa utilizada para la adición estándar. La longitud de banda aplicada fue de 4 mm.

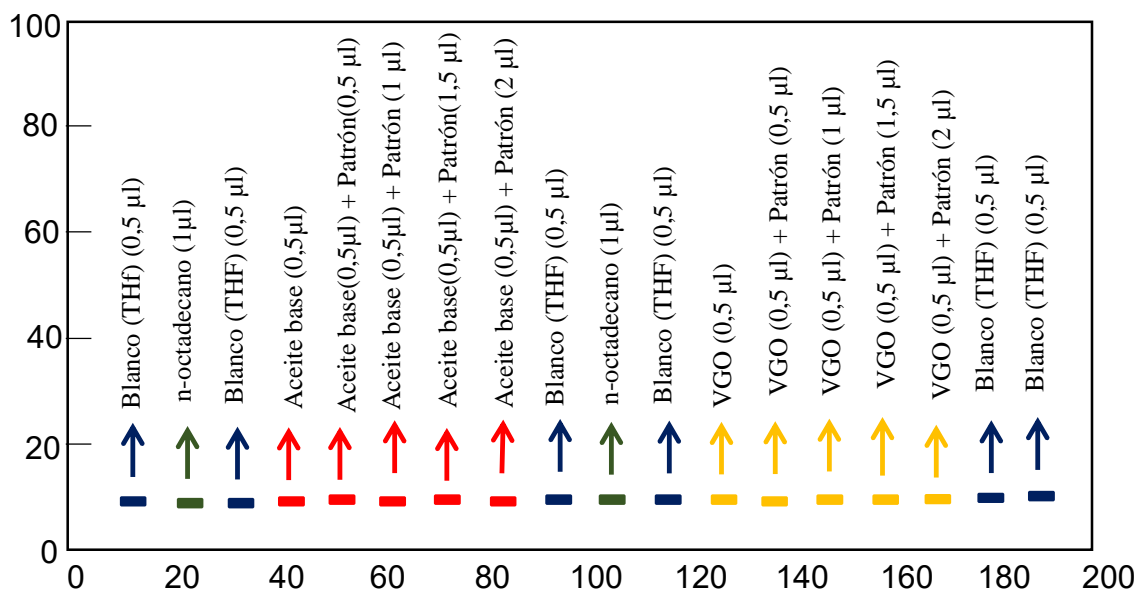


Figura 12. Protocolo de aplicación para la segunda placa utilizada para la adición estándar. La longitud de banda aplicada fue de 4 mm.

A continuación, se detallan las representaciones de las rectas para cada una de las muestras y su cuantificación por extrapolación, según el método de adición estándar. En todos los casos, se eliminó el último punto de la recta para conseguir un buen rango lineal.

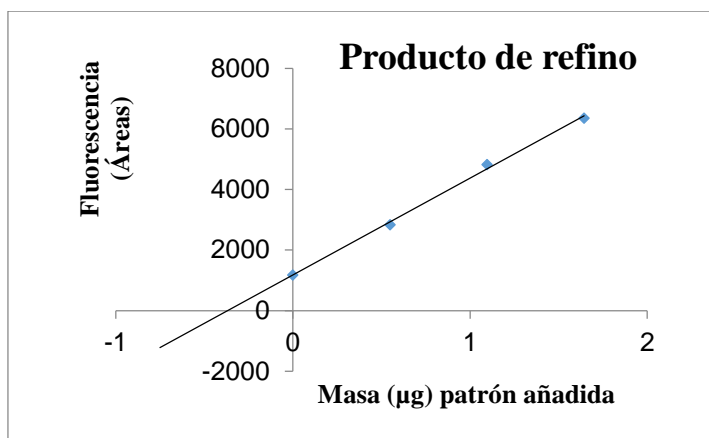


Figura 13. Recta de calibrado por adición estándar del producto de refino

Pendiente	3196,4
O. Origen	1174,3
Coef. Correl	0,9983

Tabla 11. Parámetros de la recta

Resultados

µg alcanos	0,367
µg totales	0,595
% Saturados	61,7

Tabla 12. Resultados obtenidos para el producto de refino

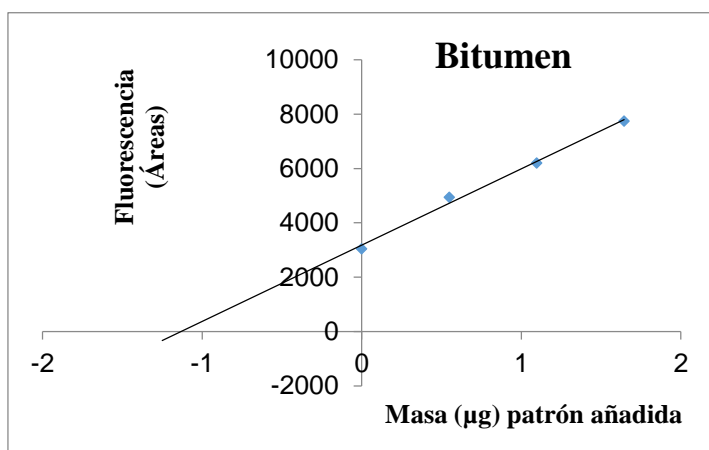


Figura 14. Recta de calibrado por adición estándar del bitumen

Pendiente	2839,1
O. Origen	3156,8
Coef. Correl	0,9947

Tabla 13. Parámetros de la recta

Resultados

µg alcanos	1,11
µg totales	2,77
% Saturados	40,2

Tabla 14. Resultados obtenidos para el bitumen

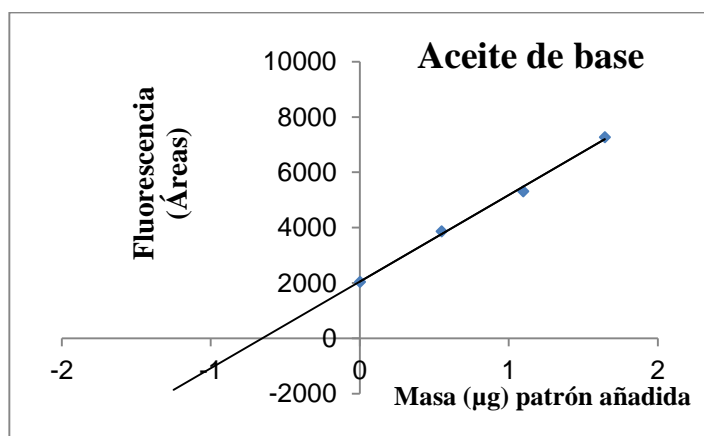


Figura 15. Recta de calibrado por adición estándar del aceite de base

Pendiente	3127,0
O. Origen	2050,5
Coef. Correl	0,9981

Tabla 15. Parámetros de la recta

Resultados

µg alcanos	0,656
µg totales	0,554
% Saturados	118

Tabla 16. Resultados obtenidos para el aceite de base

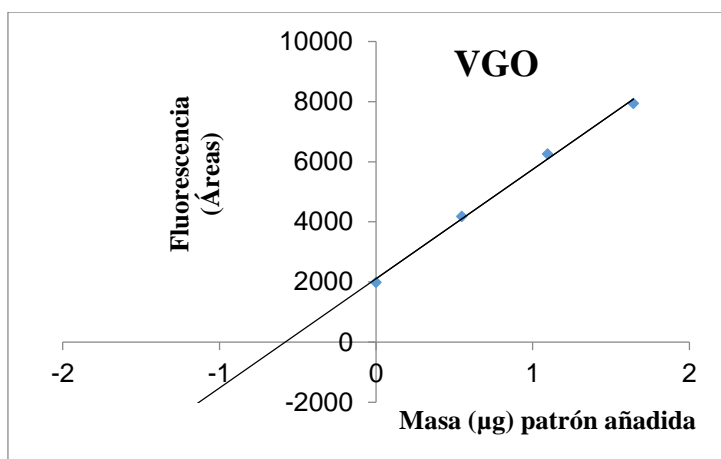


Figura 16. Recta de calibrado por adición estándar del VGO

Pendiente	3788,7
O. Origen	1981,2
Coef. Correl	0,9965

Tabla 17. Parámetros de la recta

Resultados

µg alcanos	0,523
µg totales	0,607
% Saturados	86,1

Tabla 18. Resultados obtenidos para el VGO

Estos resultados se discuten conjuntamente con los obtenidos mediante calibración con patrón externo en el apartado 4.2.4.

5.2.3.- Calibración por patrón externo

Se realizó una calibración por patrón externo para comparar los resultados con la adición estándar. En este método se construye una curva de calibrado con las diferentes concentraciones de un patrón y la concentración del analito en la muestra desconocida se determina por interpolación de la señal obtenida en la curva. En este caso, se ha usado como patrón externo la misma mezcla de alcanos usada previamente. Para ello se aplicaron 6 bandas de dicha mezcla patrón, con los siguientes volúmenes de aplicación: 0,2; 0,5; 0,7; 1,2; 1,7 y 2,3 µl. También se aplicaron las cuatro muestras con un volumen de aplicación de 0,5 µL; excepto para el bitumen que era necesario que fuera 2,3 µl para llevar a cabo una correcta calibración. De forma que el protocolo de aplicación se muestra en la figura 17.

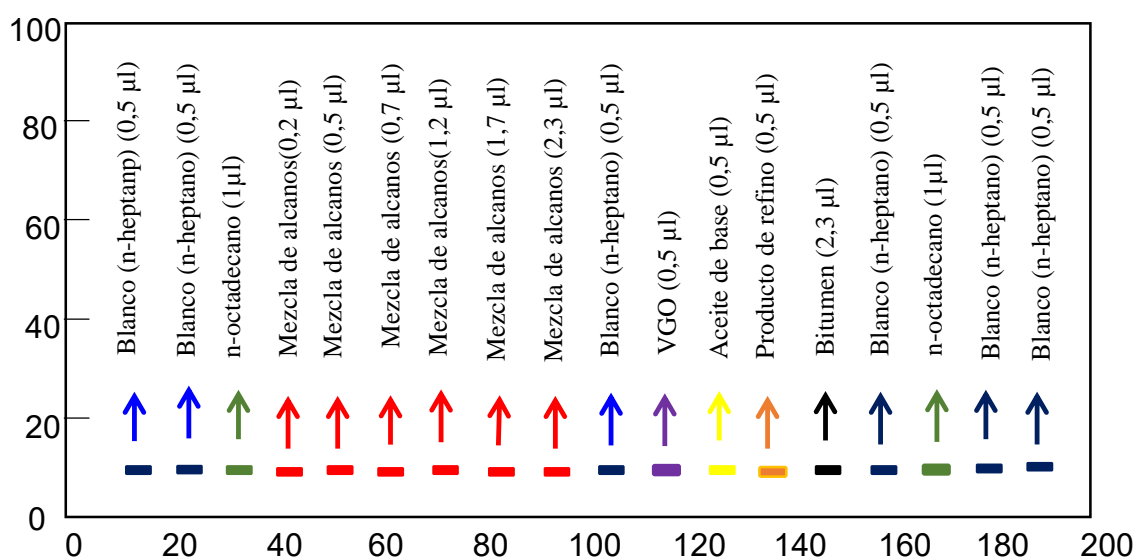
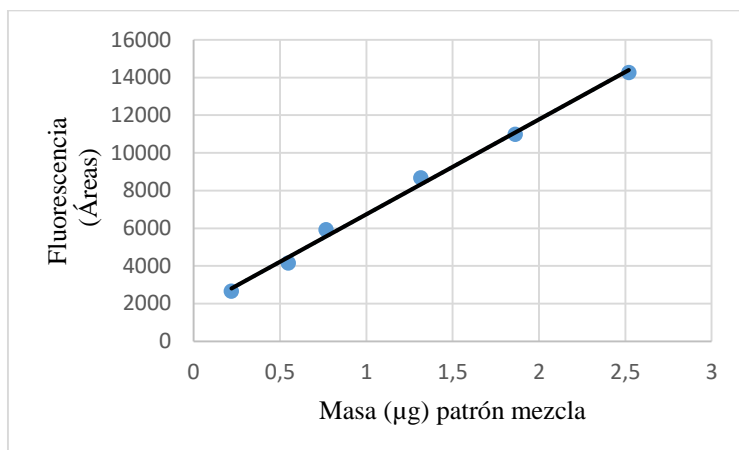


Figura 17. Protocolo de aplicación para la placa utilizada para el patrón externo. La longitud de banda aplicada fue de 4 mm.

La recta de calibrado obtenida para la mezcla de alcanos se muestra en la figura 18.



Pendiente	5026,5
O. Origen	1628,3
Coef. Correl	0,9959

Tabla 19. Parámetros de la recta de calibrado por patrón externo

Figura 18. Recta de calibrado por patrón externo.

Se calculó los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), multiplicando la relación entre la desviación estándar del blanco ($s_b=32,53$) y la pendiente por 3 y 10, respectivamente, obteniéndose un LD de 0,0194 µg y un LC de 0,0647 µg.

El rango lineal del método va desde 0,0647 µg hasta 2,53 µg.

La concentración del analito en la muestra se determinó por interpolación de la señal obtenida con la de los patrones, obteniendo los siguientes resultados:

Muestras	Fluorescencia (Áreas)	Masa(µg) alcanos	Masa total de producto (µg)	% Saturados
Producto de refino	3249,3	0,322	0,595	54,1
Bitumen	5009,3	0,673	2,77	24,3
Aceite de base	3821,5	0,436	0,554	78,7
VGO	3581,1	0,388	0,607	63,9

Tabla 20. Resultados obtenidos para la calibración por patrón externo.

5.2.4.- Comparación de la validez de los métodos de calibración, ventajas y limitaciones del análisis

En el control de calidad de combustibles pesados se pueden utilizar métodos que proporcionan:

-Información comparativa, cuando los experimentos son comparados bajo condiciones analíticas fijas.

-Cuantificación absoluto de analitos diana, si hay patrones disponibles (no suele ser el caso).

-Información semicuantitativa de analitos desconocidos, eligiendo adecuadamente un patrón. Este ha sido el enfoque adoptado en este trabajo para evaluar la determinación de Saturados presentes en diferentes proporciones en una gama de productos representativos de la conversión de petróleo

en refinería. Así, se eligió como patrón una mezcla de cinco alcanos, entre C₂₄ y C₃₅ (7-hexiloctadecano, n-octacosano, n-dotriacontano, n-tritriacontano y n-pentatriacontano).

Dado que la respuesta fluorescente depende de la longitud de los alcanos y de su proporción en el producto, no se puede pretender que un mismo patrón sea completamente válido para todos los productos. Es conocido que, de entre los productos estudiados, los bitúmenes presentan la menor proporción de alcanos (con menores longitudes en promedio) y los aceites de base contienen mayoritariamente alcanos largos.

Habría que considerar la elección de una mezcla de alcanos en función del conjunto de muestras que estemos analizando. En este caso (bitumen, VGO, producto de refino y aceite de base), el patrón mezcla de cinco alcanos entre C₂₄ y C₃₅ ha mostrado unos parámetros analíticos correctos con un buen %RSD.

En este trabajo se han comparado resultados obtenidos por los métodos de calibración por patrón externo y adición estándar, así como con el resultado de referencia para el aceite de base (obtenido usando otras técnicas diferentes en dos laboratorios distintos). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21 y 22.

	Patrón externo	Adición estándar
Muestras	% Saturados	% Saturados
Producto de refino	54,1	61,7
Bitumen	24,3	40,2
Aceite de base	78,7	118
VGO	63,9	86,1

Tabla 21. Resultados obtenidos para los dos métodos de calibración

Adición de patrón	Patrón externo	Valores de referencia
% Saturados	% Saturados	% Saturados
Aceite de base	Aceite de base	Aceite de base
118	78,7	76,6 - 80,6

Tabla 22. Resultados obtenidos y valores de referencia para el aceite de base

En primer lugar, los dos resultados de referencia (coincidentes entre sí) para los Saturados del aceite de base son prácticamente idénticos a los obtenidos usando la calibración como patrón externo. La calibración por adición estándar muestra una sobreestimación del valor de los Saturados para este producto. Es bastante probable que los Saturados para los demás productos estén también sobrestimados usando la adición estándar. Aunque este modo de calibración suele ser recomendado para muestras en matrices complejas, hay que decir que la determinación por extrapolación es también muy sensible a ligeras variaciones de la pendiente, lo cual quizás ha podido ocurrir en este caso. Además, es un método indicado principalmente para determinar compuestos minoritarios. En este caso, y al igual que en el caso del Aceite de base, los Saturados para los productos VGO, producto de refino y bitumen, obtenidos mediante patrón externo, están en rangos de valores usuales en productos de este tipo y suelen ser mayores de 10% en peso.

6.-Conclusiones

La aplicación de HPTLC-densitometría usando fluorescencia inducida para la determinación de la composición en Saturados de cuatro productos pesados de refinería (bitumen, producto de refino, aceite de base y gasoil de vacío) ha proporcionado las siguientes conclusiones:

-Aunque la separación de los Saturados se ha podido realizar adecuadamente con las tres tecnologías de separación utilizadas, se ha escogido AMD ya que, además de los Saturados permite adicionalmente una separación más eficaz de la zona Aromáticos-Resinas-Asfaltenos. La secuencia AMD utilizada ha sido de 3 etapas basado en el desarrollo secuencial con THF 30mm, DCM/MeOH (80/20%) 50 mm y n-heptano 70mm.

-Las condiciones de detección de los Saturados por fluorescencia inducida elegidas han sido: impregnación post-cromatográfica de las placas con hemisulfato de berberina en metanol (120 mg/l), excitación a $\lambda = 365$ nm y emisión a partir de 400 nm.

-A la vista de las respuestas individuales de los alcanos en el sistema, el patrón representativo escogido para el análisis semicuantitativo ha sido la mezcla de cinco alcanos entre C₂₄ y C₃₅ (n-octacosano, n-dotriacontano, 7-hexiloctadecano, n-tritriacontano y n-pentatriacontano), que ha mostrado unos parámetros analíticos correctos con un buen %RSD.

-La calibración usando la mezcla patrón descrita como patrón externo ha permitido obtener unos resultados coherentes respecto del contenido en Saturados típico de estas muestras y coincidentes con los valores de referencia de los Saturados del aceite de base. Por su parte, la calibración por adición estándar conduce a una sobreestimación del contenido en Saturados.

-En general, HPTLC ha mostrado ser una técnica repetible y adecuada para el análisis de Saturados en productos de petróleo. Las posibles variaciones en los valores de fluorescencia pueden ser corregidos de una placa a otra usando una referencia interna que en este caso ha sido el n-octadecano.

7.-Bibliografía

1. Barman, B. N.; Cebolla, V. L.; Membrado, L. Chromatographic Techniques for Petroleum and Related Products, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2000, 30 (2-3), 75-120. <https://doi.org/10.1080/10408340091164199>
2. Cebolla, V.L., Membrado, L., Matt, M., Gálvez, E.M., Domingo, M.P. (2003). Thin-Layer Chromatography for hydrocarbon characterization in petroleum middle distillates, in Hsu, C.S. (ed.) *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, ch. 5. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9212-3_5
3. IP 391 standard. *Standard Methods for Analysis and Testing of petroleum and Related Products* 1992, Vol. 2. Institute of Petroleum, London 1992.

4. Yunju Cho, Jeong-Geol Na, Nam-Sun Nho, SungHong Kim, Sunghwan Kim. Application of Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes Crude Oil Fractionation for Detailed Chemical Characterization of Heavy Crude Oils by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Equipped with Atmospheric Pressure Photoionization. *Energy Fuels*, 2012, 26, 2558-2565. <https://doi.org/10.1021/ef201312m>
5. Marshall, A.G., Rodgers, R.P. *Petroleomics: Chemistry of the underworld*. PNAS 2008, 105(47), 18090-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805069105>
6. Reich, E.; Schibli, A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*, Thieme, New York, 2007.
7. Cebolla V.L.; Membrado L.; Jarne C.; and Garriga R. High-performance thin-layer chromatography. *Analytical Separation Science*, First Edition, vol 4 "Related Chromatographic Techniques". Publisher: Wiley-VCH, Berlin. Editors: Anderson J, Berthod A, Pino Estévez V, Stalcup A., 2015. Ch 1: p. 1093-1141. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep044>
8. Burger K, Dünnschich-Chromatographie DC-PMD. Mit gradienten-elution im vergleich zur säulenflüssigkeits-Chromatographie. *Fresenius Z Anal Chem* 1984, 318, 228–33. <https://doi.org/10.1007/BF00528586>
9. Membrado, L.; Cebolla, V.L.; Jarne, C.; Garriga, R.; Bernard-Savary, P.; Vela, J. Automated Multiple Development, in *Instrumental Thin-Layer Chromatography* (ed. by C.F. Poole), *Handbooks in Separation Science*, Elsevier Science Publishers (Major Reference Works), 2014, ISBN: 978-0-12-417223-4, ch 4, 73-105. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00004-2>
10. Marston, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 2676-2683. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>
11. Morlock G, Schwack W. Hyphenations in planar chromatography. *J Chromatogr A* 2010, 1217, 6600–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.058>
12. Jarne, C.; Savirón, M.; Lapieza, M. P.; Membrado, L.; Orduna, J.; Galbán, J.; Garriga, R.; Morlock, G.; Cebolla, V. L. High-Performance Thin-Layer Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Identifying Neutral Lipids and Sphingolipids in Complex Samples. *J. AOAC Int.* 2018, 101, 1993–2000. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0329>
13. María P. Lapieza, Colette Jungas, María Savirón, Carmen Jarne, Luis Membrado, Jesús Vela, Jesús Orduna, Rosa Garriga, Javier Galbán, Vicente L. Cebolla. HPTLC coupled to ESI-Tandem MS for identifying phospholipids associated to membrane proteins in photosynthetic purple bacteria. *Journal of Liquid Chromatography & Related Techniques* 2019, 42(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1561465>
14. Jarne, C., Cebolla, V.L., Membrado, L., Galbán, J., Savirón, M., Orduna, J., Garriga, R. Separation and profiling of monoglycerides in biodiesel using a hyphenated technique based on high-performance thin-layer chromatography. *Fuel* 2016, 177, 244–250.

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.03.011>

15. Cossío, F.P., Arrieta, A., Cebolla, V.L., Membrado, L., Domingo, M.P., Henrion, P., Vela, J. Enhancement of fluorescence in Thin-Layer Chromatography induced by the interaction between n-alkanes and an organic cation. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1759-1766.

<https://doi.org/10.1021/ac991302q>

16. Cossío, F.P., Arrieta, A., Cebolla, V.L., Membrado, L., Garriga, R., Vela, J., Domingo, M.P. Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. A Theoretical Explanation of this Phenomenon. *Org. Lett.* 2000, 2, 2311-2313.

<https://doi.org/10.1021/ol006075p>

17. Gálvez, E.M.; Matt, M.; Cebolla, V.L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F.P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M.H. (2006) General contribution of nonspecific interactions to fluorescence intensity enhancements. *Anal. Chem.* 2006, 78, 3699-3705.

<https://doi.org/10.1021/ac058045b>

18. Cebolla V.L.; Mateos E.; Garriga R.; Membrado L.; Cossío F.P.; Gálvez E.M.; et al. Changes in fluorescent emission induced by non-covalent interactions as a general detection procedure in thin-layer chromatography. *ChemPhysChem* 2012, 13, 291–9.

<http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100590>

19. Cebolla, V.L.; Jarne, C.; Domingo, M.P.; Domínguez, A.; Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Galbán, J.; Membrado, L.; Gálvez, E.M.; Cossío, F.P. Fluorescence Detection by Intensity Changes for High-Performance Thin-Layer Chromatography separation of lipids using Automated Multiple Development. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 2668-2675.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.033>

20. E.N. Pieke, J. Smedsgaard, K. Granby. Exploring the chemistry of complex samples by tentative identification and semiquantification: A food contact material case. *J. Mass Spectrom.* 2017, 53, 323-335. <https://doi.org/10.1002/jms.4052>

21. E.N. Pieke, K. Granby, X. Trier, J. Smedsgaard. A framework to estimate concentrations of potentially unknown substances by semi-quantification in liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2017, 975, 30-41.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.054>

22. Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30-41.

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>

23. Schinkel, L. New Analytical Methods for Investigating the Fate of Chlorinated Paraffins and Their Transformation Products. PhD Thesis, ETH Zürich, 2019. <https://doi.org/10.3929/ethz-b-000344250>