

Trabajo de Fin de Grado en Química

Determinación de monoglicéridos en
biodiesel tipo ésteres metílicos de ácidos
grasos mediante cromatografía de capa
fina avanzada

Jorge Bintanel Cenis

Director: Luis Membrado Giner

Ponente: Francisco Javier Galbán Bernal

Departamento de Química analítica

Instituto de Carboquímica ICB-CSIC

Junio 2019



Índice

Resumen - Abstract.....	Páginas 4-5
1. Introducción.....	Página 6
1.1 BIODIESELES.....	Página 6
1.2 PROCEDENCIA.....	Páginas 6-7
1.3 VENTAJAS E INCONVENIENTES.....	Página 7
1.4 LEGISLACIÓN.....	Página 8
2. Objetivos.....	Página 9
3. Procedimiento experimental.....	Páginas 10-14
3.1 TÉCNICA HPTLC.....	Páginas 10-11
3.2 ETAPAS HPTLC.....	Páginas 12-14
4. Material y equipos.....	Páginas 15-18
4.1 MATERIAL.....	Páginas 15-17
4.2 EQUIPOS.....	Páginas 17-18
5. Trabajo experimental.....	Páginas 19-23
5.1 TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....	Página 19
5.2 RANGO DE CONCENTRACIONES.....	Páginas 19-20
5.3 ESTUDIO DE LA ELUCIÓN.....	Página 20
5.4 CONDICIONES DE DETECCIÓN.....	Páginas 21-23
5.5 RECTAS DE CALIBRADO	Páginas 23-24
5.6 MEZCLAS DE PATRONES.....	Página 25
5.7 MUESTRAS REALES.....	Página 25
6. Resultados y conclusiones.....	Páginas 26-28
6.1 MONOGLICÉRIDOS INSATURADOS. DETECCIÓN EN UV.....	Página 26
6.2 MONOGLICÉRIDOS TOTALES. DETECCIÓN EN FLUORESCENCIA.....	Página 27
6.3 CONCLUSIONES.....	Páginas 27-28

7. Bibliografía.....	Páginas 29-30
Anexos.....	Páginas 1-5

Resumen

Determinación de monoglicéridos en biodiesel tipo ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de capa fina avanzada

En la actualidad existe un gran interés por parte de la industria de los combustibles en los biodiseles. Estos biocombustibles tienen como principal ventaja su carácter respetuoso con el medio ambiente al tratarse de un material renovable y, por tanto, exento de emisiones en CO₂. En consecuencia los biodiseles tienen un interés dentro de las propuestas emergentes de economía circular y las políticas de lucha contra el cambio climático.

Las grasas naturales o recicladas de origen animal o vegetal son transesterificadas para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos, cuya composición es más homogénea y sus propiedades están mejor adecuadas para el uso como combustible. El problema son las impurezas que persisten tras este proceso como pueden ser, entre otros, los ácidos grasos libres o monoglicéridos que pueden atacar partes de los motores o alterar su funcionamiento.

El objetivo planteado en este trabajo es comprobar si es posible cuantificar los monoglicéridos contenidos en los FAMEs mediante la técnica HPTLC, que, a priori, parece adecuada para productos de esta naturaleza.

Se parte de unas muestras de FAMEs con un contenido desconocido en monoglicéridos obtenidas a partir de aceites de diferentes procedencias. Se separan los monoglicéridos del resto de componentes por HPTLC y posteriormente se detectan y se cuantifican tanto en ultravioleta (UV) como en fluorescencia para obtener el contenido en monoglicéridos insaturados y totales, respectivamente.

El hecho de que los ácidos grasos no muestren una gran actividad en UV en las condiciones propias de HPTLC y que los monoglicéridos sean una impureza no deseable que debe suponerse en baja concentración en los productos a analizar, obliga a tratar de optimizar el conjunto de variables de todo tipo que pueden tener influencia en la sensibilidad del método.

Abstract

Determination of monoglycerides in biodiesel type methyl esters of fatty acids by high performance thin layer chromatography

There is currently a great interest from the fuel industry in biodiesels. The main advantage of these biofuels is that they are environmentally friendly as they are a renewable material and therefore free of CO₂ emissions. Consequently, biodiesels have an interest in the emerging proposals of circular economy and policies to combat climate change.

Natural or recycled fats of animal or vegetable origin are transesterified to obtain methyl esters of fatty acids, whose composition is more homogeneous and their properties are better suited for use as fuel. The problem is the impurities that persist after this process, such as free fatty acids or monoglycerides that can attack parts of engines or alter a functioning.

The aim of this work is to check whether it is possible to quantify the monoglycerides contained in the FAMEs by means of the HPTLC technique, which, a priori, seems suitable for products of this nature.

Samples of FAMEs with an unknown monoglyceride content obtained from oils of different origins are used. The monoglycerides are separated from the rest of the components by HPTLC and then detected and quantified both in ultraviolet (UV) and fluorescence to obtain the content of unsaturated and total monoglycerides, respectively.

The fact that fatty acids don't show a high activity under HPTLC conditions and the monoglycerides are an impurity not desirable which have to be supposed in low concentrations in the products to analyse, forced to try to optimize the set of variables of all kinds that can have an influence on the sensitivity of the method.

Introducción

1.1 BIODIÉSELES

Los biodiésoles se obtienen a partir de aceites vegetales y grasas animales, cuyos compuestos principales son los triacilgliceroles o triglicéridos (TAG). Químicamente, los TAG son ésteres de ácidos grasos (AG) con glicerina. Dentro de los TAG se dan distribuciones muy variadas de ácidos grasos. Los diferentes AG que forman parte de los TAG definen la composición en glicerina de las grasas animales o el aceite vegetal correspondiente. Debido a que los distintos tipos de AG tienen diferentes propiedades físicas y químicas, el perfil de AG determina las propiedades materiales correspondientes a un aceite vegetal o una grasa animal.

Con objeto de obtener propiedades más homogéneas y adecuadas para su posterior uso como combustible el aceite vegetal o la grasa animal se somete a una transesterificación. En esa reacción, el aceite vegetal o la grasa animal reacciona en presencia de un catalizador (generalmente una base) con un alcohol (generalmente metanol) para dar los alquil ésteres correspondientes (o, en el caso del metanol, los ésteres metílicos). En la figura 1 se muestra la reacción de transesterificación.

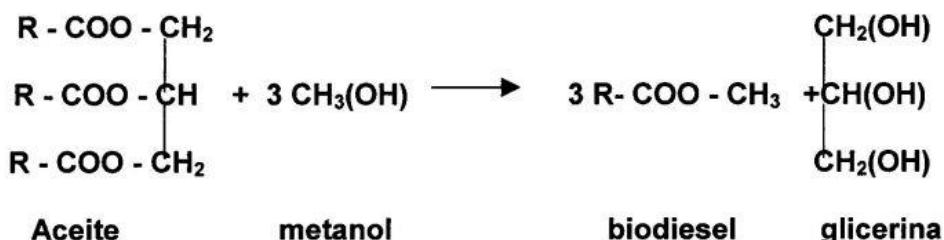


Figura 1: Reacción de transesterificación con MeOH

1.2 Procedencia

El biodiesel se puede obtener a partir de una gran variedad de materias primas. Estas materias primas incluyen los aceites vegetales más comunes (soja, semillas de algodón, cacahuete, colza/canola, girasol, cártamo, coco, palma) y grasas animales (principalmente sebo) así como aceites usados (aceites usados para freír por ejemplo).

El biodiesel es miscible con el diésel que proviene del petróleo, por lo que es habitual que se usen mezclas en lugar de biodiesel puro. Estas mezclas de diésoles se denotan con acrónimos como por ejemplo B20, que indica un contenido de 20% en biodiesel.

Debido al uso mayoritario del metanol en los procesos de transesterificación los productos resultantes de este proceso son llamados a menudo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en lugar de biodiesel. Aunque los demás alcoholes pueden por definición producir biodiesel, muchos de los estándares existentes en la actualidad se dirigen o establecen para la producción de ésteres metílicos.

1.3 Ventajas e inconvenientes

El biodiesel tiene varias ventajas en comparación con el petrodiesel, las cuales se exponen a continuación:

- Procede de un recurso renovable, reduciendo así la dependencia en la materia prima y preservando el petróleo.
- Es biodegradable
- Reducción de la mayoría de las emisiones de gases que producen efecto invernadero (con la excepción de los óxidos de nitrógeno, NO_x).
- Punto de inflamación más alto, lo que permite una manipulación y almacenamiento más seguros.
- Excelente lubricidad, un hecho que está ganando importancia con los diésel de bajo contenido de azufre, que la tienen muy reducida. Añadiendo biodiesel en bajas proporciones (1-2%) ésta se recupera.

En cuanto a los problemas asociados con el biodiésel se encuentran su precio más alto, el cual en muchos países se ve compensado por incentivos legislativos y/o subvenciones en forma de reducción de los impuestos, un ligero aumento de las emisiones de NO_x, ya comentado anteriormente, una peor estabilidad por riesgo de oxidación cuando se expone al aire y un peor comportamiento en frío ya que puede solidificar con mayor facilidad. El precio más alto también puede ser parcialmente compensado utilizando materias primas menos costosas, como por ejemplo aceites usados.

Los aceites vegetales y grasas animales necesitan una adecuación para que su viscosidad sea lo más cercana posible a la de los petrodiésel y esta es la principal razón por la cual se lleva a cabo la transesterificación. La alta viscosidad de los aceites y grasas no transesterificados conduce a problemas de funcionamiento en el motor diésel existiendo incluso riesgo de corrosión con algunos compuestos, o de depósitos en diversas partes del motor. Aunque hay motores y quemadores que pueden utilizar aceites no transesterificados, la gran mayoría de los motores requiere el uso de biodiesel. ^{[1][2]}

Los problemas derivados de las impurezas encontradas en los biodiesel hacen que sea necesaria una alta pureza en éstos, es decir, que el contenido de impurezas en FAMEs debe ser lo más bajo posible para que el motor sea capaz de funcionar de forma correcta. ^{[3][4]}

1.4 Legislación

En cuanto al ámbito legislativo la Norma Europea UNE EN 14214:2013 establece que la máxima concentración permitida de monoglicéridos en biodiesels es de 0,7% en peso. Esta normativa ha obligado a desarrollar procesos para asegurar la calidad del biodiesel así como sus mezclas con combustibles de origen fósil. ^[2] ^[15]

Objetivos

Objetivos

Para cumplir con las exigencias correspondientes a este trabajo de fin de grado se plantea una determinación de monoglicéridos en biodiesel tipo ésteres metílicos, para lo cual utilizamos HPTLC como técnica de separación seguida de detecciones tanto en UV como en fluorescencia.

Los objetivos son los expuestos a continuación:

- Realizar la revisión de la bibliografía correspondiente al tema a tratar, en este caso la determinación por cromatografía de capa fina de monoglicéridos y el uso en detección de fluorescencia inducida.
- Programar los diferentes experimentos adecuándolos a las cuestiones y problemas que necesitemos resolver, optimizando también todos los parámetros de la técnica analítica para obtener unos resultados óptimos.
- Correcto manejo y optimización del material y equipos que se disponen en el laboratorio (ATS 4, AMD 2 y TLC Scanner)
- Emplear herramientas y aplicaciones estadísticas para una correcta gestión de los datos obtenidos durante el proceso de experimentación.
- Realizar las fases características de un control de calidad de los datos procesados (estudios de recta de calibrado, repetibilidad, screening...)
- Analizar las muestras y hacer una determinación cuantitativa de los analitos de interés

Con la consecución de los objetivos citados se ponen en práctica y se demuestran los conocimientos adquiridos durante la titulación, englobando aspectos teóricos y prácticos.

Procedimiento experimental

3.1 Técnica: HPTLC

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica cromatográfica clásica de separación por adsorción o reparto en la que la fase estacionaria se fija en un soporte bidimensional (placa) que suele ser de cristal, aluminio, plástico, etc. El adsorbente (fase estacionaria) más frecuente es el SiO_2 aunque hay una gran variedad de fases como pueden ser la alúmina (Al_2O_3), celulosa o poliamidas.

La HPTLC es una evolución de la cromatografía de capa fina original que se origina como consecuencia de la aparición reciente de nuevos soportes mejorados e instrumentación automatizada. La TLC venía a ser una técnica de análisis en el laboratorio empleada para controles rutinarios, como por ejemplo el seguimiento y confirmación del desarrollo de una reacción, que con el paso del tiempo fue siendo sustituida por otras técnicas analíticamente más potentes. Las importantes mejoras y desarrollos recientes hacen que la moderna HPTLC recupere ciertas posibilidades analíticas, por ejemplo en el caso de muestras muy polares. ^[7]
 [14]

Tabla 1. Comparación HPTLC vs. TLC

Característica	HPTLC	TLC
Tamaño de partícula	5-6 μm	10-12 μm
Espesor de la capa	200 μm	250 μm
Distancia de migración	30-60 mm	100-150 mm
Tiempo de separación	3-20 min	20-200 min
Número de muestras por placa	Menos de 30 (60 si se hacen doble)	Menos de 10
Volumen de muestra	0.1-0.5 μl	1-5 μl
Límites de detección UV	100-500 pg	1-5 ng
Límites de detección fluorescencia	5-10 pg	50-100 pg

Esta técnica permite separar los compuestos de interés dentro de una muestra para posteriormente realizar un análisis cuantitativo del contenido de esos compuestos. La HPTLC

es una técnica con diferentes niveles de sofisticación y estructura modular, lo que permite su adaptación al problema analítico planteada.

En nuestro caso tratamos con la determinación de monoglicéridos en biodieselos. Esta medida la llevamos a cabo utilizando diferentes opciones en cuanto a la detección se refiere. La principal cuestión que tenemos que abordar es la falta de respuesta que proporcionan los monoglicéridos saturados en UV, por lo que determinamos solamente el contenido de monoglicéridos insaturados en las muestras por medio de esta detección. ^[13]

Los monoglicéridos totales (saturados e insaturados) contenidos en las muestras se van a cuantificar por medio de la detección en fluorescencia. Dentro de la fluorescencia tenemos que distinguir entre la fluorescencia nativa, donde una serie de compuestos emiten de forma natural, y la fluorescencia inducida, donde utilizamos unos fluoróforos que se acoplan a los compuestos para generar esa emisión. Ese último caso es el que vamos a utilizar en este trabajo.

Para poder realizar las determinaciones en fluorescencia comenzamos acoplando a los compuestos de interés (monoglicéridos saturados) los fluoróforos con los que contamos (primulina y berberina). Según la teoría cuántica clásica la intensidad de la emisión depende del rendimiento cuántico dado por la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k}$$

Donde Γ es la tasa de emisión del fluoróforo y k representa la suma de todas las contribuciones de desactivación no radiactivas. La cadena de ácidos grasos de los monoglicéridos aporta un entorno apolar que dificulta los mecanismos de relajación alternativos y favorecen la emisión de fluorescencia. ^[8-10]

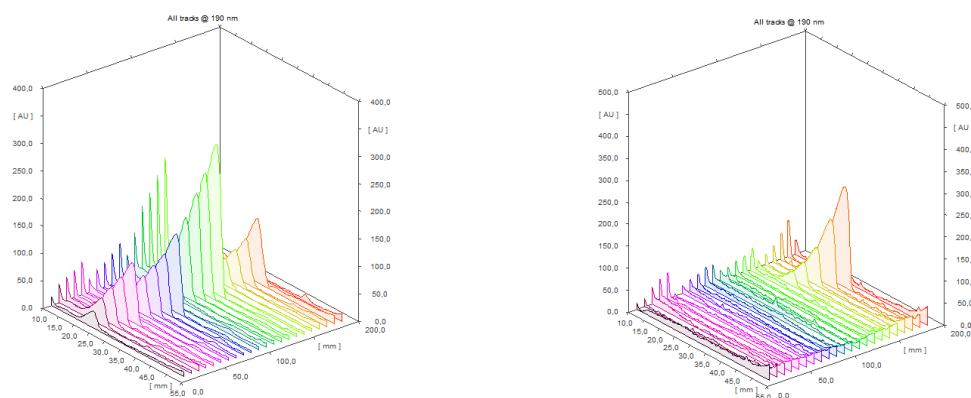


Figura 2. Cromatogramas en UV. 1: Barrido de concentraciones de patrones C16:1, C18:1, C18:2, C22:1; 2: Barrido de concentraciones patrones C14:0, C16:0, C18:0 y C16:1 (único que genera señal)

3.2 Etapas HPTLC

Vienen definidas por las operaciones que hay que realizar en la placa de capa fina para completar una separación cromatográfica. Son sucesivamente la colocación de la muestra, su elución para la separación de sus componentes y, finalmente, su detección y cuantificación. Cada una de ellas se realiza en un aparato diferente.

3.2.1 Inyección de muestra

La inyección de muestra es la primera etapa de la técnica y se realiza en nuestro caso por medio del CAMAG ATS 4. La reproducibilidad de los diferentes experimentos depende en gran medida de que la deposición de las muestras sea precisa y reproducible, por lo que resulta conveniente cierto grado de automatización.

La HPTLC tiene un gran número de ventajas mencionadas anteriormente con respecto a la TLC. En este apartado destaca el número de pinchazos que pueden distribuirse en cada placa y la posibilidad de variar las diferentes condiciones de inyección (tamaño de jeringa, volumen a inyectar, posición de la inyección, forma del pinchazo, etc.)

La muestra se deposita normalmente en la placa mediante la nebulización con un gas inerte (N_2) de una disolución en un disolvente volátil. De este modo el disolvente se elimina en el proceso dejando tan solo una cierta cantidad de muestra normalmente en forma de banda de una anchura y una altura determinada. Es también posible aplicarla en forma de puntos, aunque en la actualidad no se emplea demasiado. El CAMAG ATS 4 como veremos más adelante, ofrece también la posibilidad de proyectar una disolución para cubrir un área determinada.

El resultado de la etapa de inyección de muestra en una placa estándar de 20 x 10 cm será una serie de bandas del orden de 20 aproximadamente y un tamaño alrededor de 3-4 mm de ancho por 0,5-1 mm de alto dispuestas a 1 cm aproximadamente de cada uno de los lados de la placa.

Otra posibilidad que es preciso citar en el caso del ATS 4 es la de inyectar varias muestras en distintas cantidades y en la misma posición, denominada “overspotting”. De este modo es posible realizar directamente mezclas de componentes en la placa a partir de las disoluciones de sus compuestos puros.

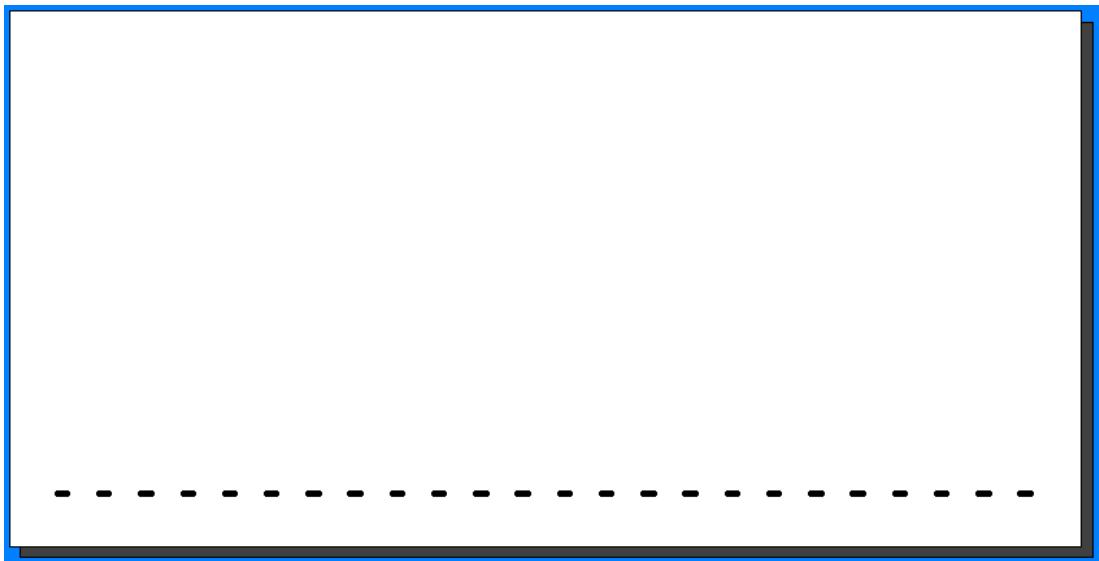


Figura 3. Placa inyectada mediante el ATS 4.

3.2.2 Desarrollo cromatográfico o elución

La segunda fase correspondiente a la técnica HPTLC es el desarrollo cromatográfico o elución. La placa se eluye con una serie adecuada de disolventes de distintas polaridades en orden a separar los distintos componentes de las muestras.

En la actualidad hay diferentes tipos de cámaras de elución donde se lleva a cabo el desarrollo cromatográfico, destacando los dos diseños más utilizados, el desarrollo vertical y el horizontal.

Dentro del desarrollo vertical nos encontramos con las cámaras de elución tradicionales de fondo plano o de doble fondo, y de cámaras con distintos grados de automatización. En el caso del AMD (Automatic Multiple Development) es posible programar la elución y emplear como eluyente mezclas de composición variable de hasta 5 disolventes. Permite también la programación de métodos completos de elución con secado al vacío de la placa entre etapas. La automatización aumenta no solo las posibilidades de la etapa sino también su reproducibilidad.

3.2.3 Detección

Es la última etapa que se lleva a cabo en esta técnica y el principal objetivo es obtener unos cromatogramas que representen todo lo que se ha llevado a cabo anteriormente en las etapas

de inyección y desarrollo. Por medio del procesamiento de los datos generados en el cromatograma obtenemos una determinación de los compuestos de interés, en nuestro caso los monoglicéridos.

La detección, inicialmente la visualización o generación de compuestos coloreados por derivatización, ha pasado a consistir en el barrido óptico en UV-visible o fluorescencia a lo largo de la dirección de elución de un perfil de absorción o emisión para cada una de las pistas en una longitud de onda dada. De este modo se construye por densitometría un registro de picos para cada componente separado que puede ser integrado de forma análoga a los cromatogramas de gases o HPLC, con la única diferencia de que, en este caso, es posible barrerlos a distintas longitudes de onda u obtener espectros si es necesario, pues dichos componentes permanecen en la placa de forma indefinida y esta puede ser barrida en distintas condiciones. Es posible asimismo, con una interfase apropiada, extraer los productos en una posición para llevarlos a otras técnicas, por ejemplo, espectrometría de masas.

Los compuestos coloreados pueden ser detectados a simple vista pero los incoloros tienen que ser detectados por medio de la radiación UV con lámparas de W y D₂ si estos compuestos son capaces de producir absorción detectable en UV. Si no son capaces hay que llevar a cabo la detección en fluorescencia con fluoróforos que inducen la emisión. En nuestro caso hacemos las detecciones en UV a 190 nm y en fluorescencia a 365 nm. Mediante la detección UV podemos cuantificar los monoglicéridos insaturados pero no los saturados. Para estos últimos necesitamos acoplarles un fluoróforo y posteriormente detectar la fluorescencia. Con lo cual a 190 nm detectamos concentraciones de monoglicéridos insaturados y a 365nm concentración de monoglicéridos totales.

Material y equipos

4.1 Material

4.1.1 Patrones monoglicéridos:

Como se ha comentado anteriormente, mediante la técnica HPTLC se pueden detectar monoglicéridos insaturados por medio de detección en UV y totales en fluorescencia. Consecuentemente para este trabajo utilizamos una variedad de patrones que cumplen un rango de características útiles para la posterior determinación de las muestras. Estos siete patrones son tanto saturados como insaturados y dentro de cada grupo tenemos diferentes longitudes de cadena de los ácidos grasos, un factor que, de acuerdo a otros trabajos, influye en la intensidad de la señal.

Tabla 2. Patrones suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)

Nomenclatura monoglicéridos	Abreviación
SC-216123, 1-myristoyl-rac-glycerol	C14:0
SC-206201, 1-palmitoyl-rac-glycerol	C16:0
SC-206210, 1-stearoyl-rac-glycerol	C18:0
SC-213369, 1-monopalmitoyl-rac-glycerol	C16:1
SC-201999, 1-oleoyl-rac-glycerol	C18:1
SC-216118, 1-linoleoyl-rac-glycerol	C18:2
SC-213281, 1-(cis-13)-docosenoyl-rac-glycerol	C22:1

4.1.2 Muestras reales de biodiesels:

Estas muestras fueron proporcionadas en su momento por la compañía Total (Francia) para llevar a cabo unos estudios anteriores realizados en el propio ICB.

Tabla 3. Muestras reales de biodiesel

Código	Composición y procedencia
409-4744	FAME 100% de aceite de fritura
409-4745	FAME mezcla 50/50 de esteres metílicos de grasa animal y de aceite de fritura
410-108	FAME mezcla 30/70 de soja y colza
410-111	FAME 100% colza con BHT (antioxidante sintético)
410-113	FAME mezcla 20/80 de soja y colza
410-115	FAME 100% de aceite de fritura (procedencia distinta 409-4744)

4.1.3 Disolventes:

Los disolventes que se muestran a continuación se utilizan tanto como fase móvil dentro de la etapa de desarrollo (MTBE, DCM y C7) como disolventes de las propios patrones o muestras para adecuar sus propiedades materiales en la etapa de inyección (MeOH y DCM). El THF finalmente es utilizado tanto en tareas de limpieza como en la preparación de placas.

Tabla 4. Disolventes

Nombre	Casa comercial	Composición	No. CAS
Metanol (MeOH)	Panreac	99,9% para UHPLC	67-56-1
Diclorometano (DCM)	Panreac	99,8% + 0,2% de Etanol PS como estabilizante	75-09-2
Metil tert-butileter (MTBE)	Panreac	99,9% para UV, IR, HPLC	1634-04-4
n-Heptano (C7)	Panreac	99,0% para UV, IR, HPLC	142-82-5
Tetrahidrofurano (THF)	Panreac	99,9% para UV, IR, HPLC, GPC	109-99-9

4.1.4 Placas para la separación por HPTLC:

Las placas elegidas para la realización de este trabajo son placas de gel de sílice sobre vidrio, 100 × 200 mm; 3-10 µm tamaño de partícula; 60 Å tamaño de poro; capa de 0,2 mm de grosor de Merck (Darmstadt, Alemania). Las placas se limpiaron antes de su uso por difusión con tetrahidrofurano (THF) en una cámara convencional de desarrollo horizontal seguida de secado a vacío a 60º C en estufa.

4.1.5 Fluoróforos:

Según trabajos y publicaciones anteriores, primulina y berberina son dos fluoróforos susceptibles de ser utilizados con monoglicéridos en FAMEs para inducir fluorescencia. Se estudiaron ambos y, de acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la primulina debido a su mayor sensibilidad con estos productos.

Primulina con procedencia Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Contenido del colorante 50%, No. CAS 8064-60-6.

Berberina (hemisultafo) con procedencia Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Concentración ≥ 95%, No. CAS 633-65-8.^[5]

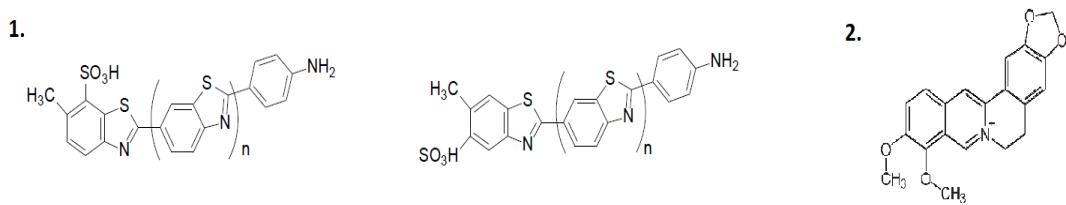


Figura 5. Estructuras químicas de la primulina (1) y de la berberina (2)

4.2 Equipos ^[6]

- 4.2.1 Automatic TLC Sampler (ATS4) (Camag, Müttenz, Suiza). El CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4) ofrece una aplicación de muestras totalmente automática para análisis cualitativos y cuantitativos, así como para separaciones preparativas. Es adecuado para el uso rutinario y especialmente para un alto rendimiento de muestras. La aplicación automática de la muestra es un factor clave para la productividad del laboratorio HPTLC y el CAMAG ATS 4 cumple con los requisitos de un instrumento que cumple con este propósito, es decir, precisión, robustez durante el uso rutinario y un manejo cómodo.
- 4.2.2 Automated Multiple Development (AMD2) (Camag, Müttenz, Suiza). Sólo el procedimiento AMD puede emplearse con éxito para la elución de gradiente reproducible con gel de sílice como fase estacionaria. Este equipo ofrece diferentes ventajas, tales como la posibilidad de realizar elución en gradiente, un factor de separación aumentado en 3 veces con respecto a HPTLC normal, una mejora de precisión y fiabilidad y desarrollos en menos de una hora.
- 4.2.3 TLC Scanner 3 (Camag, Müttenz, Switzerland). El CAMAG TLC Scanner 3 se utiliza para la evaluación densitométrica de objetos de los campos de la cromatografía planar y la electroforesis. El escáner está diseñado para manejar objetos de hasta 200 x 200 mm, también si es necesario, la detección se puede realizar en modo de reflexión o transmisión (opcional), por absorbancia o por fluorescencia. El escáner dispone de tres fuentes de luz, una lámpara de deuterio, una lámpara halógeno-wolframio y una lámpara de mercurio de alta presión. El rangopectral es de 190 a 800 nm.



Figura 6. ATS 4



Figura 7. AMD 2



Figura 8. TLC Scanner 3

Trabajo experimental

5.1 Toma de muestra y preparación de disoluciones

Para comenzar necesitamos saber cuáles son las posibilidades que nos ofrecen tanto la placa como la programación del ATS 4. Una vez conocidas, tenemos que hacer un diseño de cada placa que vamos a ejecutar sabiendo cuantas bandas vamos a utilizar así como su distribución para tener una buena optimización del espacio disponible y evitar problemas de difusión creados por las propiedades materiales de las disoluciones.

Los patrones (Tabla 1.) son pesados en una balanza analítica y posteriormente disueltos en una mezcla de MeOH/DCM 1:1. La concentración escogida para estas disoluciones es de 1 mg/ml teniendo como propósito un mejor manejo posterior de los factores de concentración.

Las muestras (biodieselos) provienen de diferente procedencia y cada una tiene un código diferenciatorio como marcan los estándares de control dentro de un laboratorio. Las muestras son diluidas en MeOH para adecuar la densidad de las disoluciones a la funcionalidad de la jeringa del ATS 4, es decir, para evitar obturaciones de la misma. Finalmente escogemos una dilución de 1:10, este factor de dilución habrá que tenerlo en cuenta en la determinación final.

Las disoluciones de los fluoróforos se realizan pesando en balanza analítica los mismos y disolviéndolos en MeOH. Las concentraciones de las principales disoluciones de primulina y berberina son del 0,04% y del 0,003% en peso respectivamente. Posteriormente en el apartado de optimización de condiciones se expone que también utilizamos disoluciones más diluidas en el caso de la primulina.

En la etapa de introducción de muestra y desarrollo cromatográfico cabe resaltar los problemas de difusión debidos a la poca polaridad de los productos, que son la parte mayoritaria de nuestras muestras.

5.2 Rango de concentraciones

El objetivo fundamental de esta etapa es conocer el rango de concentraciones adecuado para trabajar debido a las limitaciones impuestas por el sistema de inyección que requiere concentraciones muy diluidas para evitar problemas de obturación o excesiva viscosidad. Es por eso que se ha trabajado con disoluciones muy diluidas. Dado que el disolvente se evapora en la fase de inyección no hay problemas en inyectar volúmenes elevados. Un problema residual que ha habido que evitar limitando la cantidad total de producto ha sido su difusión en la placa al ser muy apolares, motivo por el cual las bandas se deforman en caso de inyectar una cantidad excesiva.

En función de los volúmenes inyectados y de los parámetros variables en el TLC Scanner (como por ejemplo la sensibilidad o ganancia) obtenemos unos picos con los que podemos interpretar las concentraciones idóneas, es decir, que las señales generadas sean de un

tamaño adecuado sin llegar a saturar el cromatograma. Con los datos obtenidos dilucidamos que el rango de concentraciones de trabajo adecuado es de 1 a 5 μL de volumen inyectado en cuanto se refiere a patrones, es decir, una concentración de 1 a 5 μg de monoglicéridos.

5.3 Estudio de la elución. Separación de monoglicéridos

En esta etapa tratamos de optimizar la secuencia de elución para separar los monoglicéridos en nuestras muestras y con las concentraciones de trabajo comentadas en la etapa anterior. Un problema que hay que considerar es que tratamos de determinar un componente minoritario, con lo cual a priori la cantidad de muestra a inyectar va a ser elevada. Aislar en la medida de lo posible los monoglicéridos para evitar problemas de difusión resulta conveniente. En bibliografía se describe una secuencia de elución adecuada para este tipo de productos partiendo de la cual realizamos modificaciones con el fin indicado de aumentar la separación de los picos de monoglicéridos.

Finalmente la secuencia de elución empleada en nuestro caso consta de 3 fases, teniendo la primera de ellas una composición del 100% MTBE y una distancia de 40 mm, modificada a 60mm, la segunda fase se compone por una mezcla DCM/C7 80:20 con una distancia de 60 mm, modificada a 70 mm y finalmente la última etapa es otra mezcla de DCM/C7 pero con proporción 60:40 con una distancia de 90 mm en ambos casos.

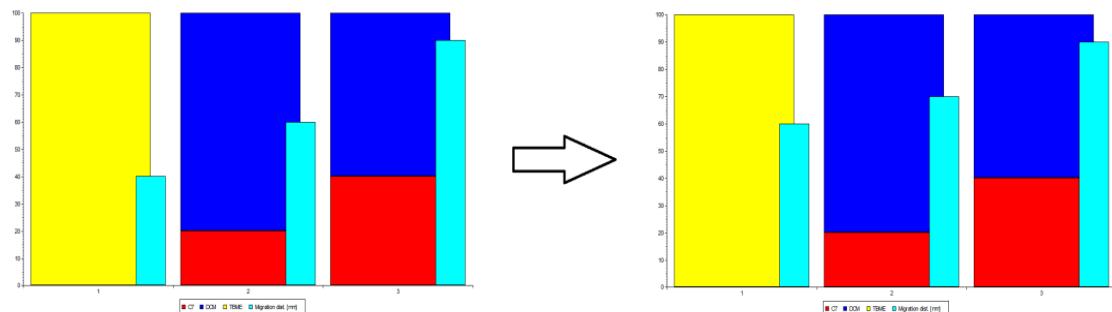


Figura 4. Elución original y elución modificada

5.4 *Condiciones de detección*

Es una etapa determinante ya que la optimización de todas las variables que tenemos posibilidad de programar radica en la utilidad, representatividad, reproducibilidad y coherencia de los resultados. Tenemos varios apartados en los que optimizamos las diferentes variables: Variables ópticas, dispositivo de inmersión e impregnación con el ATS 4.

5.4.1 Variables ópticas

De los múltiples parámetros que pueden ajustarse en el scanner varios de ellos van a influir en la intensidad de la señal. Aunque el aparato pueda ajustar la ganancia de forma automática, se ha preferido fijarla de forma manual a su máxima sensibilidad. Del mismo modo el tamaño de la ranura, y consecuentemente el tamaño de la banda en la placa se escogieron para obtener la mayor sensibilidad posible. Todo el resto de parámetros se optimizan buscando obtener un pico con el mayor detalle posible como por ejemplo las dimensiones de la ranura, el sistema óptico para optimizar el máximo, la velocidad de scaneo (medida en mm/s) y por último la distancia de toma de datos (medida en $\mu\text{m}/\text{dato}$). Estos dos últimos parámetros se relacionan con la resolución de los cromatogramas, es decir, cuanto mayor sea la velocidad y la distancia entre la toma de cada dato en la misma banda la resolución es menor (Anexo I).

Queda por determinar la longitud de onda en la que trabajar para determinar en la manera de lo posible los monoglicéridos insaturados. La experimentación realizada con compuestos modelos ha permitido comprobar que tan solo absorben en UV-vis los ésteres de ácidos grasos insaturados. Experimentos a diferentes longitudes de onda (190, 210, 230 y 254 nm) nos permiten obtener los resultados correspondientes, determinando que la longitud de onda óptima para este método es 190 nm en detección UV (Anexo II).

La siguiente etapa debe ser la determinación de las condiciones de impregnación en fluorescencia para detectar los monoglicéridos totales. En primer lugar, se realizaron experimentos para elegir entre primulina y berberina, que pusieron de manifiesto la mayor respuesta de la primera, con lo cual en lo sucesivo se trabajó solamente con ella. El siguiente paso era estudiar las condiciones de impregnación de la placa con primulina, para lo que se dispone de dos métodos alternativos: impregnación por inmersión e impregnación por proyección con el ATS 4.

5.4.2 Dispositivo de inmersión

Es el dispositivo que se utiliza para impregnar las placas con las disoluciones de los flouróforos, es un aparato sencillo que solo tiene dos variables, el tiempo de residencia dentro de la cubeta que puede variar entre 0 y 8 segundos y la velocidad con que se da la inmersión que tiene un rango de 1 a 5. Una vez impregnadas varias placas modificando estos dos parámetros concluimos que no tiene ningún efecto en la posterior detección, no se impregna más cantidad del fluoróforo aunque este más tiempo sumergida la placa.

Los inconvenientes del dispositivo de inmersión son que requiere cantidades elevadas de la disolución de primulina y que en los experimentos realizados se ha visto que ninguna de las

dos variables con las que cuenta el aparato modifican realmente el resultado de la impregnación. Otro inconveniente es que el frente de impregnación puede ser irregular debido a roces con las paredes de la cubeta, lo cual hace que los cromatogramas generados posteriormente puedan ser poco representativos.

En resumen, la impregnación por inmersión exige grandes cantidades de disolución y conlleva un riesgo elevado de error humano.

5.4.3 Proyección de primulina en el ATS 4

Puede reducirse de manera importante el riesgo de error humano y la cantidad de disolución necesaria para realizar la impregnación, a la vez que se dispone de una notable flexibilidad en los resultados finales usando para impregnar la placa el modo de inyección de áreas en el ATS 4. De este modo se coloca en cada pista cromatográfica una zona de primulina de anchura y altura determinadas que cuyas características son variables incluso entre una pista y la siguiente. Habrá que estudiar por tanto la concentración de la disolución de primulina y las características completas de la inyección por áreas.

La disolución original de primulina tiene una concentración de 0,04% de peso, que es la máxima concentración que podemos obtener debido a su baja solubilidad. Por tanto el rango de concentraciones de primulina en el que hacemos el estudio es de 0,04% al 0,00125% en peso. Obtenemos unos datos experimentales de los que extraemos que las mayores respuestas se dan a concentraciones del 0,02% y en 0,005%.

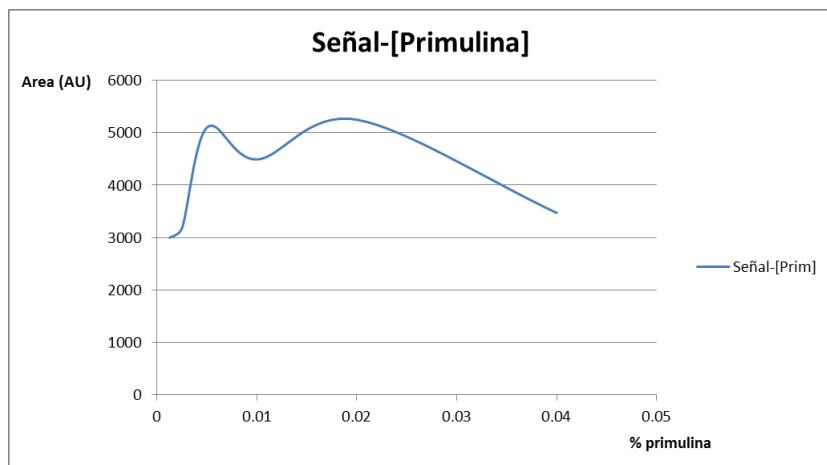


Figura 9. Señal vs. [Primulina]

Un problema inicial fue la falta de respuesta debida, al parecer, a que la primulina quedaba en la superficie sin introducirse en la dada la alta volatilidad del MeOH. Se resolvió añadiendo un 50% en volumen de etanol elegido por similitud estructural con el disolvente y su mayor punto de ebullición con el fin de que en alguna manera fuera capaz de mojar la e introducirse de alguna medida en ella. Esto permitió obtener las correspondientes señales en fluorescencia.

El principal problema que encontramos en este método de impregnación es la abundancia de ruido en la línea base, ya que no tenemos unos cromatogramas con una meseta totalmente

plana característica de la impregnación de primulina debido a la falta de homogeneidad en la distribución del área impregnada (Anexo III). Puede lograrse una mejora parcial recurriendo al overspotting, o más completa, inyectando cantidades elevadas de disoluciones muy diluidas, o con una combinación de ambas. El problema en este caso es el excesivo tiempo del que requiere la inyección de estas cantidades de disolución. La alternativa final que ha revelado tener un mejor compromiso ha sido la inyección sucesiva de disoluciones de concentración decreciente, de este modo en lugar de 10 μl de primulina al 0,04% se han inyectado 7 μl al 0,04%, 4 μl al 0,02% y 4 μl al 0,01% obteniendo de este modo prácticamente la misma señal que la obtenida inyectando 10 μl de primulina al 0,04% y la misma línea base que 40 μl al 0,01%. Aun así, este método debe ser mejorado ligeramente para alcanzar por fin los resultados obtenidos por impregnación por inmersión.

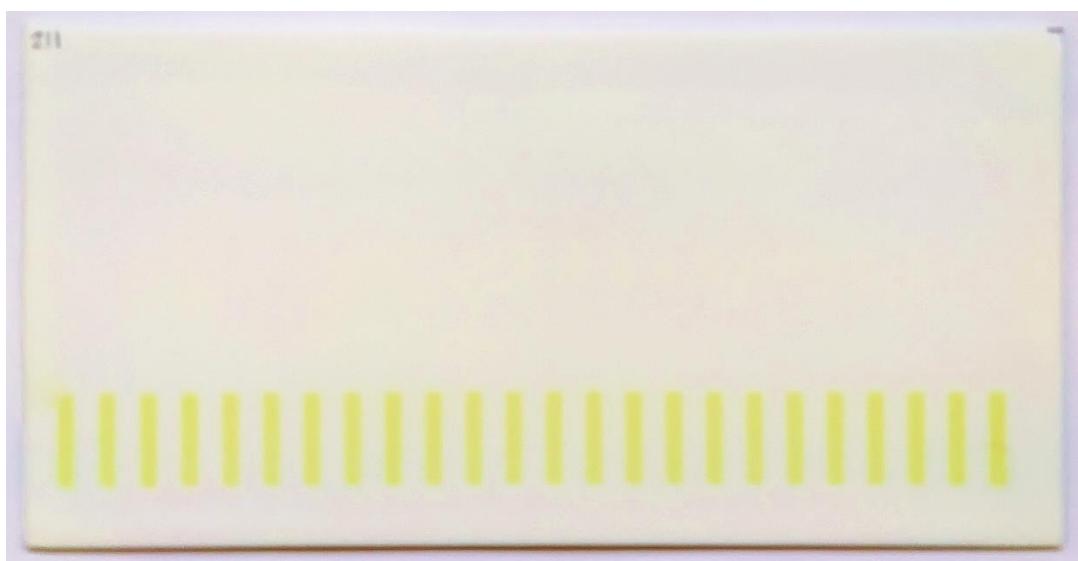


Figura 10. Impregnación de primulina para la detección en fluorescencia

5.5 Rectas de calibrado de los patrones: determinación de las sensibilidades, límites de detección y cuantificación. Elección de patrones referencia y estándar.

Tenemos diferentes patrones con distintas propiedades, así que tenemos que conocer la respuesta de cada uno de ellos en diferentes condiciones para determinar cuáles utilizaremos posteriormente en la determinación de las muestras. Como hemos expuesto anteriormente, los monoglicéridos insaturados generan señal tanto en UV como en fluorescencia, pero los saturados solamente en fluorescencia. Teniendo en cuenta los problemas mencionados en fluorescencia, siendo más sensibles los monoglicéridos cuanto mayor es la cadena de ácidos grasos ^[7], estudiamos en mayor medida la sensibilidad y reproducibilidad de los patrones insaturados.

Las rectas de calibrado que nos aportan los datos de sensibilidad de los diferentes patrones insaturados tienen una linealidad y correlación muy buenas (valores de $R^2 > 0.99$) siendo las sensibilidades las pendientes de las rectas. El patrón que tiene una mayor sensibilidad, es decir, tiene una respuesta lineal con mayor pendiente es el C18:2 (Anexo IV).

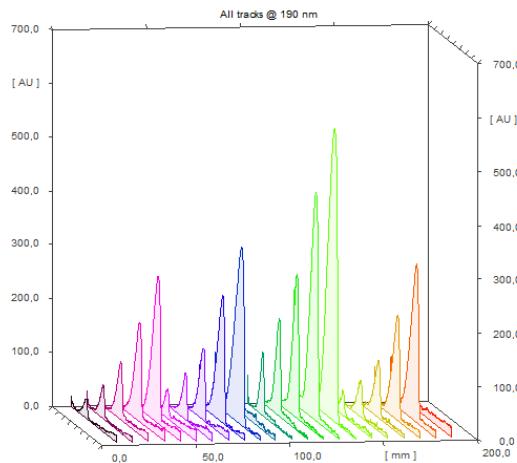


Figura 10. Ejemplo chromatograma obtenido en UV para la calibración de los patrones C16:1, C18:1, C18:2 y C22:1

Los límites de cuantificación y de detección se calculan mediante la variación del blanco, para lo que se han exportado los datos cromatográficos a Excel y medido allí su desviación típica, multiplicada por los factores correspondientes y posteriormente extrapolando en la recta de calibrado de cada patrón obteniendo de esta manera los siguientes resultados:

Tabla 5. LDs y LCs de los patrones insaturados.

Patrón	LD	LC
C16:1	0.010 µg	0.033 µg
C18:1	0.007 µg	0.023 µg
C18:2	0.004 µg	0.012 µg
C22:1	0.010 µg	0.033 µg

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta fase escogemos el patrón C18:2 como patrón estándar que adicionaremos en la determinación de las muestras. También escogemos el patrón de referencia para estudiar la reproducibilidad del método. Por circunstancias de una mayor cantidad de repeticiones del patrón C16:1 en las placas realizadas en esta etapa, es elegido finalmente como patrón de referencia.

5.6 Mezclas de patrones

En esta etapa tratamos de comprobar que las mezclas de patrones reproducen los resultados obtenidos para los patrones aislados como resultado previo al análisis final de las muestras reales. Esto se lleva a cabo inyectando por overspotting en cada banda una serie de patrones (saturados e insaturados), todos ellos en la misma proporción y en un barrido de concentraciones para ver qué respuesta generan tanto en UV como en fluorescencia.

En UV obtenemos una linealidad acorde con el barrido de concentraciones crecientes que hemos programado sobre la placa, pero menores señales y sensibilidades que los patrones sin mezclar.

En fluorescencia también hay buena linealidad pero la sensibilidad es peor. Realizamos varios experimentos con las mismas condiciones para determinar la reproducibilidad del método así como una comparación entre los diferentes métodos de impregnación anteriormente expuestos. Los resultados se exponen en el siguiente apartado.

5.7 Muestras reales de biodiesel

Finalmente se procede a la determinación de monoglicéridos en los biodiesels, para lo cual se elige el método de calibración por adición estándar, dada su menor dependencia de diferencias de naturaleza entre las muestras que pueden causar cierto efecto matriz. El patrón seleccionado (C18:2) ofrece una mayor sensibilidad en UV y permite obtener resultados con buena sensibilidad tanto en UV-vis como en fluorescencia inducida con primulina. Obtenemos dos informaciones diferentes dependiendo de la lectura en condiciones UV o en fluorescencia como ya se ha comentado anteriormente.

Resultados y conclusiones

Aunque el programa WinCats permite la integración de los distintos picos cromatográficos obtenidos, y sería la forma directa de obtener resultados cuantitativos, se ha preferido por flexibilidad y control detallado de los diferentes pasos de cuantificación realizar la exportación de los datos de los cromatogramas a Excel como se ha comentado anteriormente. Con el uso de las hojas de cálculo realizamos la corrección de la línea base en cada pico así como la integración de los mismos para obtener sus áreas. En función de los datos que obtenemos con las diferentes detecciones conseguimos dos tipos de información diferente: contenido de monoglicéridos insaturados y de monoglicéridos totales.

La repetibilidad de los experimentos obtenida con los datos generados por el patrón de referencia (C16:1) indica que esta técnica tiene una buena reproducibilidad (%DSR < 5%).

6.1 Monoglicéridos insaturados. Detección en UV.

La cantidad de monoglicéridos insaturados contenidos en cada muestra se determina mediante la detección de las placas en el rango del UV con las condiciones anteriormente mostradas, aplicando posteriormente los factores de dilución y concentración correspondientes para adquirir los siguientes resultados:

Tabla 6. Concentración de monoglicéridos insaturados en muestras

Muestra	Concentración insaturados
409-4744	2,78 ± 0,40 µg/µL
409-4745	1,53 ± 0,27 µg/µL
410-108	10,84 ± 0,86 µg/µL
410-111	3,62 ± 0,25 µg/µL
410-113	6,68 ± 1,06 µg/µL
410-115	5,02 ± 0,43 µg/µL

Como se puede ver en los resultados, tenemos una incertidumbre significativa, debido a que nos encontramos en un rango de concentraciones límite, es decir, las cantidades que determinamos son muy pequeñas y están cerca del rango del ruido instrumental.

No solo tenemos en cuenta los datos obtenidos con las muestras sino que también realizamos mezclas de patrones tanto saturados como insaturados para ver cuál es la respuesta en UV. Los resultados indican coherentemente que las mezclas en cuyo contenido se encontraba el patrón más sensible (C18:2) también son las que generan una mayor pendiente en sus rectas (Anexo V).

6.2 Monoglicéridos totales. Detección en fluorescencia.

En este caso la cantidad de repeticiones llevadas a cabo y con resultados significativos no es tan grande debido a los problemas asociados a unas malas líneas base en fluorescencia, de todos modos obtenemos unos resultados que confirman que en fluorescencia se logra captar una mayor emisión lo cual demuestra que hay más contenido en monoglicéridos de lo que se detecta en UV, concordando con la teoría.

Los resultados definitivos se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Concentración de monoglicéridos totales en muestras

Muestra	Concentración total
409-4744	21,43 ± 2,30 µg/µL
409-4745	7,47 ± 0,81 µg/µL
410-108	33,56 ± 1,76 µg/µL
410-111	18,11 ± 0,84 µg/µL
410-113	23,33 ± 2,07 µg/µL
410-115	26,84 ± 3,51 µg/µL

Las cantidades podemos apreciar que son muy superiores a las obtenidas en UV y eso es debido a la detección añadida de los monoglicéridos saturados en las muestras. También hemos realizado un estudio de comparación entre los dos tipos de impregnaciones, la inmersión clásica y la impregnación por medio del ATS 4.

Nuestras muestras tienen un contenido en monoglicéridos totales que puede obligar a usar los biodiesel en mezclas con diésel normal para evitar un contenido superior al 0,7 % en masa de acuerdo a la legislación citada en su momento.

El procesamiento de datos es significativamente más sencillo de hacer con la impregnación clásica ya que la línea base y los picos están mejor definidos. También por medio de la impregnación por inmersión obtenemos posteriormente unas mejores rectas de adición estándar, aunque en ese aspecto entran también factores de incertidumbre como por ejemplo la inyección del ATS 4.

Al igual que en UV también detectamos la respuesta de las mismas mezclas de patrones obteniendo unas rectas con una peor correlación lineal pero en concordancia con resultados experimentales expuestos anteriormente en cuestión de la obtención de una mayor señal cuanto mayor es la cadena de ácidos grasos. Se puede ver como la pendiente de la mezcla que contiene el patrón C18:0 es mayor que las que contienen C16:0 y C14:0 (Anexo VI).

6.3 Conclusiones

Los resultados ponen de manifiesto que es posible realizar una valoración cuantitativa de monoglicéridos en FAMEs utilizando la técnica HPTLC aprovechando sus ventajas de fácil introducción de muestra, realización de un gran número de cromatogramas por placa,

flexibilidad en la detección, etc. si bien se cree que estos resultados tienen todavía un cierto margen de mejora con un estudio más detallado.

La reproducibilidad es mejor en detección UV que en fluorescencia, siendo en este último caso mejor a su vez en impregnación por inmersión que por proyección con el ATS 4, que es la posibilidad que parece más prometedora pero requiere un mayor estudio.

Asimismo se ha podido comprobar la notable diferencia en el contenido en monoglicéridos insaturados y totales derivada de la posibilidad de cuantificar en UV o en fluorescencia (AnexoVII).

Bibliografía

- [1] Knothe G, Van Gerpen J, Krahl J. "The history of vegetable oil-based diesel fuels. The biodiesel handbook". Urbana, IL (USA): AOCS Press; 2005. 4–16.
- [2] Jarne, C. et al. "Separation and profiling of monoglycerides in biodiesel using a hyphenated technique based on high-performance thin-layer chromatography". FUEL 177, 244–250 (2016).
- [3] Wawrzyniak, R., Wasiak, W. & Ackowiak, M. F. R. "Determination of Methyl Esters in Diesel Oils by Gas Chromatography – Validation of the Method" . Chem. Pap. 59, 449–452 (2005).
- [4] Monteiro MR, Ambrozin ARP, Liao LM, Ferreira AG. "Critical review on analytical methods for biodiesel characterization". Talanta 2008;77(2):593–605.
- [5] A. Domínguez et al., "A Hyphenated Technique based on High-Performance Thin Layer Chromatography for Determining Neutral Sphingolipids: A Proof of Concept," Chromatography, vol. 2, no. 2, pp. 167–187, Apr. 2015.
- [6] "Poole-Inst_TLC-AMD."
- [7] V. L. Cebolla, L. Membrado, C. Jarne, and R. Garriga, "High-Performance Thin-Layer Chromatography."
- [8] F. P. Cossío et al., "Enhancement of fluorescence in thin-layer chromatography induced by the interaction between n-alkanes and an organic cation," Anal. Chem., vol. 72, no. 8, pp. 1759–1766, Apr. 2000.
- [9] V. L. Cebolla et al., "Fluorescence detection by intensity changes for high-performance thin-layer chromatography separation of lipids using automated multiple development," J. Chromatogr. A, vol. 1218, no. 19, pp. 2668–2675, May 2011.
- [10] V. L. Cebolla et al., "Changes in fluorescent emission due to non-covalent interactions as a general detection procedure for thin-layer chromatography," ChemPhysChem, vol. 13, no. 1, pp. 291–299, Jan. 2012.
- [11] E. M. Gálvez et al., "General contribution of nonspecific interactions to fluorescence intensity," Anal. Chem., vol. 78, no. 11, pp. 3699–3705, Jun. 2006.
- [12] Baeyens, W. R. G., "Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications: Part 1" Schulman, S. G., Ed.; Chemical Analysis Vol. 77; Wiley- Interscience: New York, 1985.
- [13] Boutin, M.; Auray-Blais, "C. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb3-related analogues in Fabry disease". Anal. Chem. 2014, 86, 3476–3483.

- [14] Hahn-Deinstrop, E. "Applied Thin-Layer Chromatography", Wiley-VCHVerlag GmbH, Weinheim", p. 30. 2000.
- [15] Liquid petroleum products – fatty acid methyl esters (FAME) for use in diésel engines and heating applications – requirements and test methods. UNE-EN14214; 2013.

Anexos

I. Variables escogidas para la realización de todas las detecciones en UV una vez acabada la fase de optimización.

Scan settings

Slit dimension : 3.00 x 0.45 mm, Micro

Optimize optical system for maximum : Light

Scanning speed : 5 mm/s

Data resolution : 200 µm/step

Measurement	
Wavelength	190 nm
Lamp	D2 & W
Measurement type	Remission
Measurement mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Manual
Y-position for 0 adjust	10,0 mm
Track # for 0 adjust	
Track start for quick scan	0,0 mm
Track end for quick scan	0,0 mm
Track # for quick scan	1
Analog offset	10 %
Sensitivity	58

Filter factor : Savitsky-Golay 15

Baseline correction : None

Peak thresholds

Minimum slope : 1

Minimum height : 1 AU

Minimum area : 1 AU

Maximum height : 1000 AU

Integration limits

Track start position : 10,0 mm

Track end position : 90,0 mm

Display scaling : Automatic Manual 1000 AU

Scan mode

Single wavelength

Scan display scaling : Automatic Manual 1000 AU

Track Optimization

Required Passes : 7

Spacing : 0,5 mm

Spectrum mode

None

Link parameters to previous TLC steps

Rf positions (gray if linked to previous TLC steps)

Application position : 10,0 mm

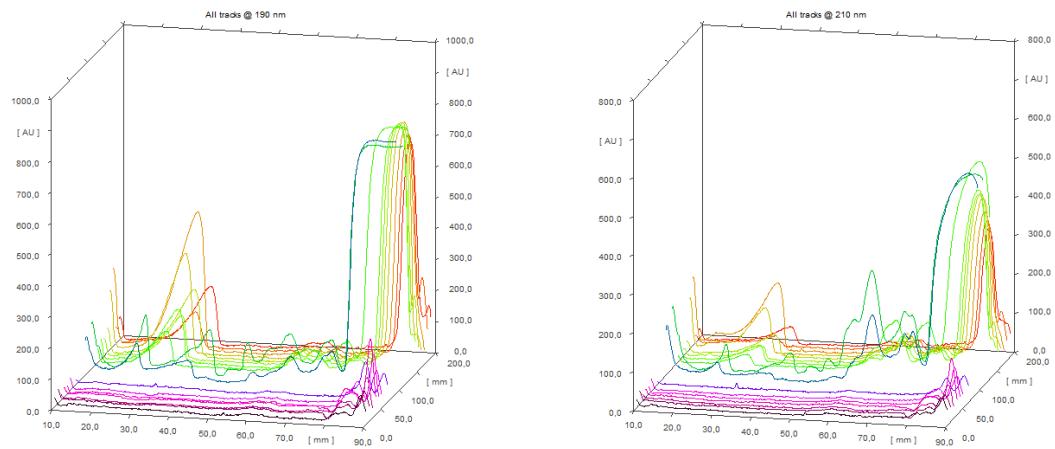
Solvent front position : 90,0 mm

Sc3 instrument

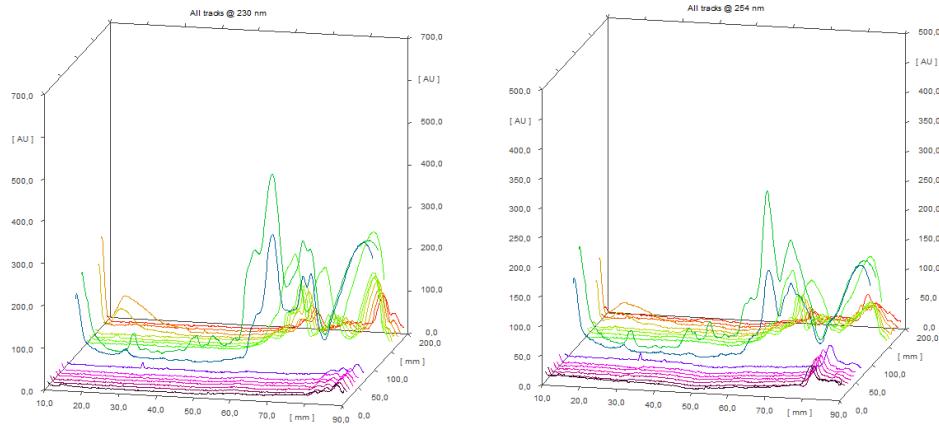
Use : Scanner3_131023

Anexo 1. Condiciones TLC Scanner para detección UV

II. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda para la detección en UV en una misma placa. Optimización de variables ópticas.

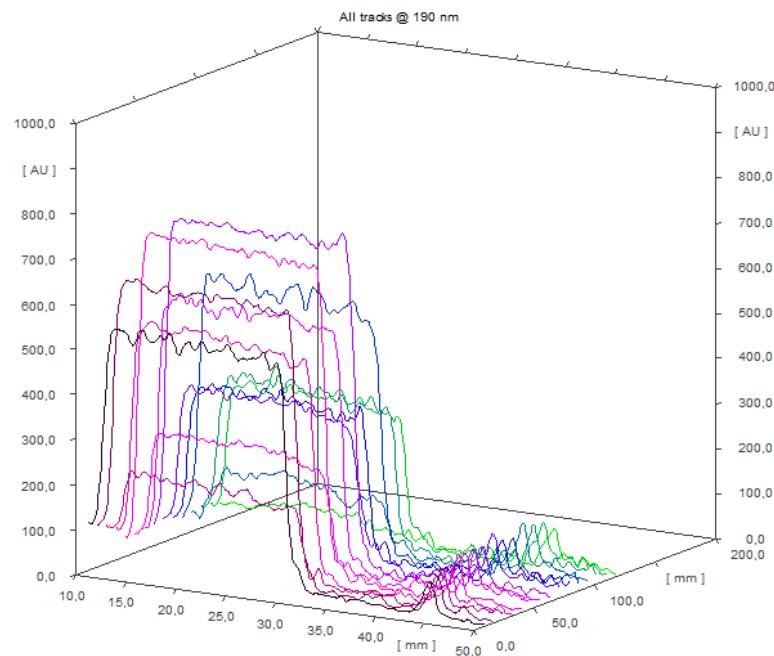


Anexo 1. 190 nm y 210 nm



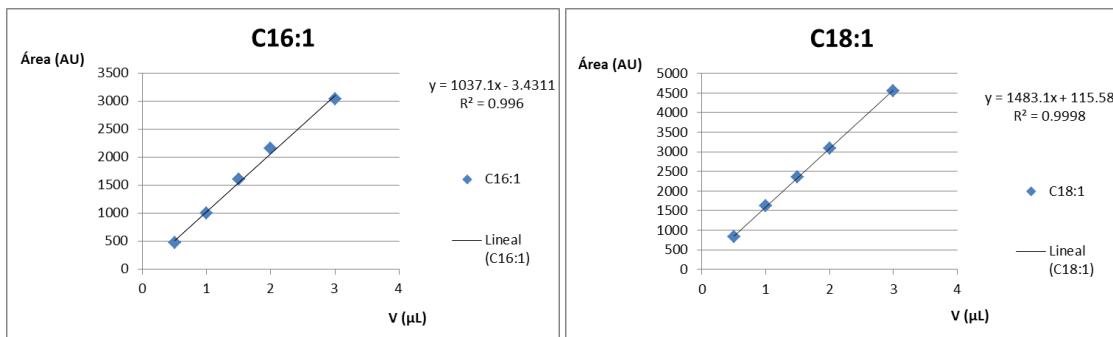
Anexo 1b. 230 nm y 254 nm

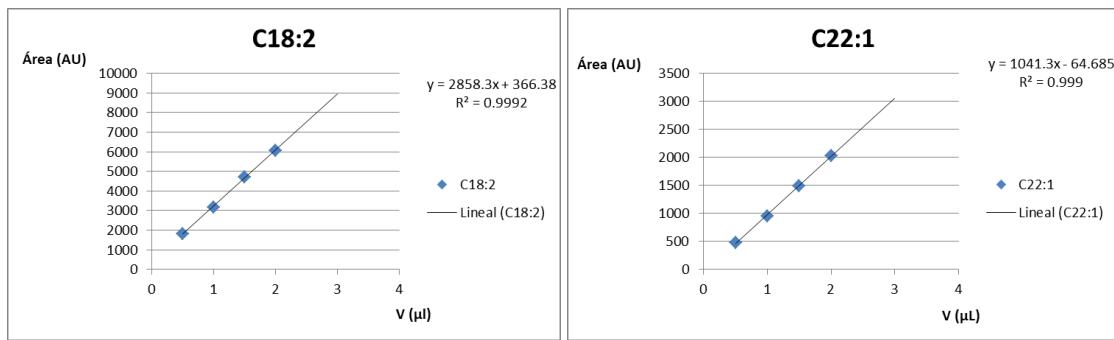
III. Cromatograma correspondiente a concentraciones diferentes de primulina y berberina sin muestras.



Anexo 3. Mesetas y líneas base típicas de la detección en fluorescencia. Diferentes concentraciones.

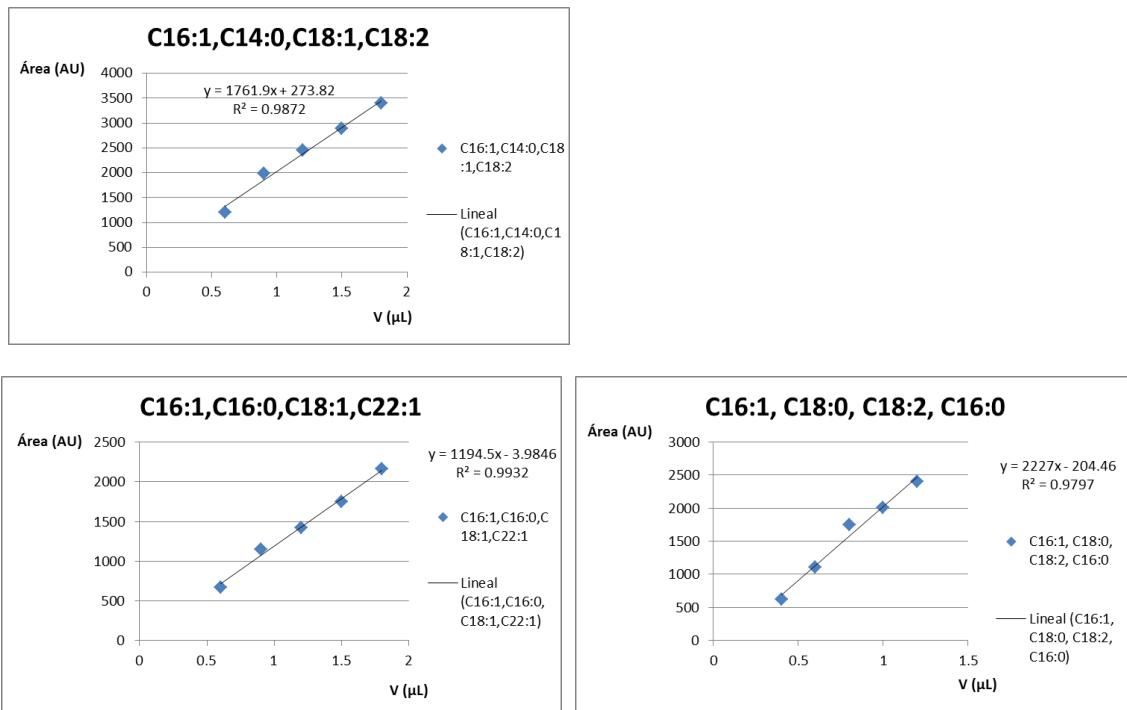
IV. Rectas de calibrado entre 0,5 y 3 μ L de volumen inyectado de los cuatro patrones insaturados.





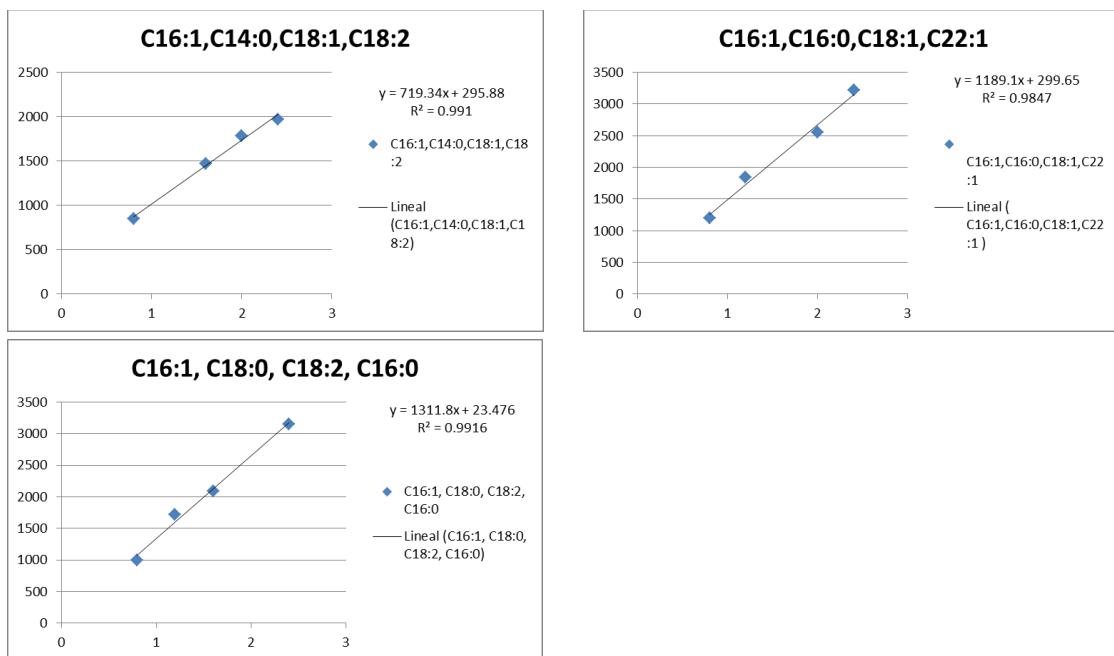
Anexo 4. Rectas de calibrado: patrones insaturados.

V. Rectas de las respuestas según la concentración y composición de las mezclas de patrones, detectadas en UV.



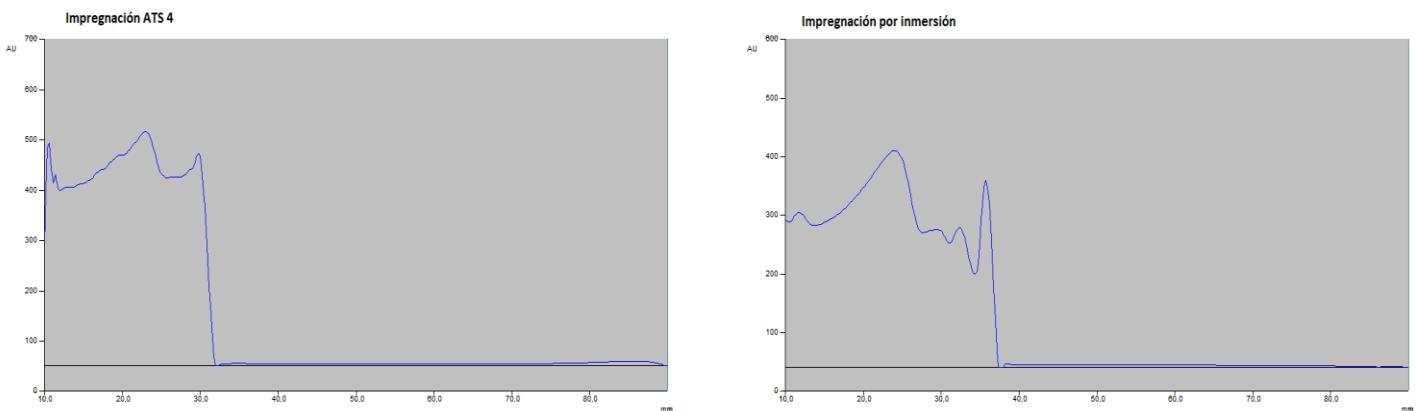
Anexo 5. Respuesta de las mezclas de patrones en UV.

VI. Rectas de las respuestas según la concentración y composición de las mezclas de patrones, detectadas en fluorescencia.



Anexo 6. Respuesta mezcla de patrones en fluorescencia.

VII. Comparación para una misma muestra y misma concentración de los cromatogramas obtenidos en fluorescencia mediante los dos modos de impregnación.



Anexo 7. Comparativa impregnación por ATS 4 vs. impregnación por inmersión