Scientia Chromatographica Vol.2, N°1, 29-47, 2010
Instituto Internacional de Cromatografia
ISSN 1984-4433

Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Elena E. Stashenko*, Jairo René Martínez

Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química
Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, Laboratorio de Cromatografía. Bucaramanga, Colombia

Resumo

En el presente trabajo se discuten algunos aspectos prácticos de GC-MS, que deben tenerse en cuenta por un analista quien trabaje con mezclas complejas y requiera hacer la identificación de sus componentes *in situ*. Se analizan estrategias relacionadas con el uso combinado de los parámetros cromatográficos, *i.e.*, índices de retención y espectros de masas, para llevar a cabo la identificación de analitos a los niveles preliminar y confirmatorio.

Palavras-chave

GC; GC-MS; Índices de retención; Espectros de masas; Aceites esenciales; *Lippia alba*; Terpenos.

Abstract

This work presents some practical aspects of GC-MS that should be taken into account by an analyst who works with complex mixtures and requires performing *in situ* component identification. The analysis is focused on strategies related with the combined use of chromatographic parameters, i.e. retention indices, and mass spectra, to carry out analyte identification at the preliminary and confirmatory levels.

Keywords

GC; GC-MS; Retention indices; Mass spectra; Essential oils; *Lippia alba*; Terpenes.

*e-mail: elena@tucan.uis.edu.co

1 Introducción. Consideraciones generales.

"Durante una sustentación de Tesis de Grado en Química, uno de los oponentes del trabajo presentado comentó, que él, siendo un químico orgánico "clásico" y con mucha experiencia en el laboratorio, quien sintetizó centenares de moléculas nuevas y pasa horas descifrando sus estructuras con base en los espectros (IR, NMR, MS y otros) tomados en equipos instrumentales costosos, no entendía cómo fue posible a través de un solo "numerito", de un tal llamado ***índice de retención****, "identificar" en una mezcla muy compleja, que es un aceite esencial, las estructuras químicas y hasta diferenciarlas, e.g., el limoneno del felandreno o el p-cimeno del o-cimeno, y le pidió al estudiante las debidas explicaciones.. Infortunadamente, la respuesta del estudiante fue deficiente, vaga, a pesar del trabajo experimental bueno… que hizo".*

Caso real. Diciembre 2009, UIS, Bucaramanga, Colombia.

La abrumadora mayoría de muestras analizadas en diferentes ramas de la *Ciencia Química*, *e.g.*, ambiental, forense, alimentos, productos naturales, petróleo, sabores y fragancias, semioquímicos y muchas otras, son mezclas -a menudo muy complejas-, que pueden comprender hasta más de 300 componentes (*e.g.*, gasolina, aceite esencial, etc.) con diversos pesos moleculares, composiciones elementales, propiedades físico-químicas, entre ellas, volatilidades, temperaturas de cambio de fases, así como con un amplio rango de polaridades (momentos dipolares, constantes dieléctricas) y solubilidades en diferentes medios. El peso molecular, la volatilidad (temperatura de ebullición) y la polaridad de las sustancias marcan la frontera entre los métodos para su separación, a saber: cromatografía de gases (GC) *Vs* cromatografía líquida (LC o HPLC), supercrítica (SFC) o métodos electroforéticos (por ejemplo, electroforesis capilar, CE). Menos del 10% de muestras reales son aptas para su análisis por GC. Ello es por el cumplimiento de ciertas condiciones, entre ellas, figuran la termoestabilidad de los componentes que debe ser alta, su volatilidad debe ser mediana o alta y que el peso molecular de las sustancias no debe superar 400-450 Da [la excepción la representa la GC de alta temperatura en columnas termoresistentes y con sistemas de aplicación de muestra especiales, *e.g.*, *on-column* o con programación de temperatura de volatilización (PTV) de la muestra en el puerto de inyección]. Actualmente, existe la posibilidad casi ilimitada (*e.g.*, usando la cromatografía multidimensional o cromatografía completa, GC x GC [1-4]) de separar las mezclas en sus componentes individuales y cuantificarlos con diferentes métodos (normalización simple, estandarizaciones externa, interna o adición de un estándar), lo que produce a un investigador optimismo, y a menudo, también una preocupación lógica sobre la seguridad con la cual se determina la identidad química de cada componente, o sea, qué es y cuál es su estructura química, etc.

La necesidad imperativa de identificar inequívocamente los componentes en la mezcla compleja fue el motor para el desarrollo de diferentes métodos de acoplamiento (*tándem*), entre los cuales figura -muy utilizada y con gran éxito-, para sustancias volatilizables, la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS). La unión GC-MS es sumamente propicia, sinérgica, ya que los compuestos aptos para el análisis tanto por GC como por MS con impacto de electrones (EI, técnica de ionización de las moléculas más usada en GC-MS), son moléculas con temperaturas de ebullición, pesos moleculares o polaridades bajos o medianos, presentes en mezclas en el rango de concentraciones (ppb – ppm) similar para ambas técnicas; además su análisis transcurre en el mismo estado de agregación (fase vapor). El único "conflicto" (pasajero y ya superado) entre GC y MS, fueron las presiones de trabajo diferentes, *i.e.*, la atmosférica en GC (en la salida de la columna) y la reducida (10^{-5} – 10^{-6} Torr) en la cámara de ionización, respectivamente. Este inconveniente fue técnicamente superado gracias a la introducción de eficientes bombas de vacío (difusoras o turbomoleculares) y, sobre todo, debido a la introducción de columnas cromatográficas capilares (0.18-0.32 mm de diámetro interno, *i.d.*, que tradicionalmente se usan en GC-MS), que se insertan directamente a la cámara de ionización de un detector de masas. Entre los detectores cromatográficos espectroscópicos (de emisión atómica, AED, de infrarrojo, IR o de masas, MS), útiles para la determinación de la estructura química o composición elemental de analitos,

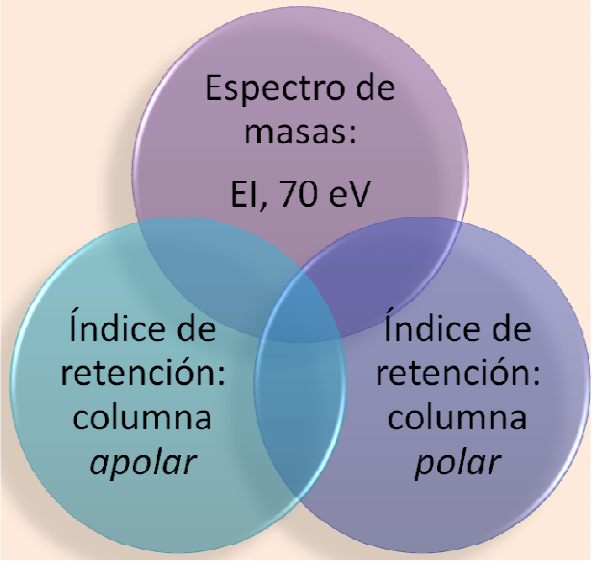
el más ampliamente usado hoy en día es el de espectrometría de masas, gracias a sus sensibilidad, la operatividad y, sobre todo, a un gran volumen de información estructural *sui generis* que puede proporcionar [5-9].

Ya se discutieron previamente [10] los aspectos prácticos relacionados con cuántos componentes están presentes en una mezcla y cuántos de ellos pueden ser detectados; se demostró que la respuesta no es trivial, puesto que depende de varios aspectos, entre ellos, del método de extracción utilizado, limpieza y concentración de la muestra, sistemas cromatográficos y sus elementos (volumen y modo de inyección, tipo y dimensiones de la columna, sistemas de detección), entre otros. La identificación química estructural "clásica", positiva e inequívoca, de una molécula, *grosso modo*, implica su aislamiento en estado puro y la obtención de una serie de "huellas digitales" espectroscópicas, entre ellas, espectros de UV, IR, MS (incluyendo los espectros de MS de alta resolución, para determinar la composición elemental), espectros de NMR y difractogramas, entre otras posibles características espectrales [11]. La combinación de estas "huellas" digitales conduce a la identificación inequívoca de la estructura. No obstante, las consideraciones "ortodoxas" para la identificación de la molécula recomiendan también la necesidad de su "clonación química", o sea, su síntesis a partir de los bloques estructurales conocidos y posterior demostración de la equivalencia de ambas estructuras moleculares, de dos compuestos, aislado (nuevo) y "reconstruido" o sintetizado *ab initio*. Los programas de simulación (cálculo) de espectros de UV-Vis, IR, NMR o difractogramas ayudan también a interpretar la información estructural disponible o a predecir los espectros con base en la estructura molecular.

Empero, hay miles de casos analíticos reales, cuando la identificación "ortodoxa", tradicional y muy rigurosa, de una estructura molecular realmente no es posible, ya que la sustancia dada puede encontrarse en una mezcla muy compleja, multicomponente, o hasta única, no reproducible (*e.g.*, muestras forenses, monitoreo de volátiles biogénicos, etc.), en una cantidad ínfima (ppb, ppt), no aislable o insuficiente para llevar a cabo los análisis UV-Vis, IR, NMR o los de Rayos X. Éstos pueden ser los casos de estudio de metabolitos de drogas en fluidos biológicos *post-mortem*, algunas muestras ambientales, residuos post-explosión o de incendios premeditados, compuestos *off-flavour*, semioquímicos, agentes de dopaje deportivo, etc. Mayores dificultades surgen aún cuando las sustancias son muy volátiles y su aislamiento se dificulta debido a las limitaciones netamente operativas. En todos estos casos, sin embargo, surge la necesidad de "identificar" las estructuras moleculares, *in situ*, aunque no existe la posibilidad real de su aislamiento de la mezcla [12]. En muchos casos, esta identificación tendría un carácter meramente tentativo (presuntivo). Entonces, *¿cuándo y cómo será posible la identificación de los compuestos presentes en una mezcla compleja en cantidades muy pequeñas*?

Existen dos estrategias fundamentales en GC-MS, para la identificación de compuestos, a saber: (I) *Uso de sustancias-estándar* (patrones certificados). Sin embargo, no siempre todos los patrones se pueden conseguir, muchos de ellos no son accesibles o disponibles fácilmente, para una gran cantidad de analitos, y (II) *Combinación de varias aproximaciones*, entre ellas, figuran las siguientes: (a) los *índices de retención* (*RI*), en conjunto con (b) espectros de masas experimentales (EI, 70 eV) y (c) su comparación con los de las bases de datos de índices de retención obtenidos en columnas de polaridad *ortogonal* (polar y apolar) y de espectros de masas estándar (EI, 70 eV). La combinación de varios parámetros experimentales y datos, *i.e.*, índices de retención medidos en ambas columnas y espectros de masas, es obligatoria para la identificación estructural de componentes en la mezcla. La identificación puede ser *tentativa* (preliminar, presuntiva) o *confirmatoria*. La confirmación (identificación positiva o inequívoca) requiere, en muchos casos, el uso de un compuesto-estándar certificado.

Varios analitos, presentes en mezclas complejas, sin embargo, pueden presentar índices de retención similares o sus espectros de masas ser parecidos o revistir solo diferencias cuantitativas (intensidades de iones) mínimas. Sin embargo, la posibilidad de la coincidencia simultánea tanto de los índices de retención, calculados en ambas columnas (polar y apolar), como de espectros de masas para dos sustancias diferentes, en realidad, es muy remota, casi improbable. Para algunos casos, por ejemplo, aquellos que puedan tener implicaciones legales, i.e., casos forenses o disputas ambientales, control de agentes de dopaje en las competencias deportivas, es absolutamente obligatorio el uso de



sustancias-patrón certificadas durante el análisis de mezclas.

La descripción química de un nuevo compuesto natural o de una sustancia sintética nueva, de una feromona o de un producto de la reacción de Maillard, no descrito previamente, implican su aislamiento y la necesidad de hacer un análisis estructural "convencional", o sea, obtener los espectros de UV-Vis, IR, NMR, MS y otros, o, inclusive, en algunos casos, es menester sintetizar el compuesto (a partir de bloques con estructuras conocidas), para compararlo luego con su "gemelo", aislado de la muestra problema [11].

El esquema general de análisis de un compuesto en una mezcla se puede resumir en la **Figura 1**. La combinación de los datos de retención cromatográfica (valores de índices de retención en dos columnas ortogonales) y de espectros de masas (EI, 70 eV) de un "compuesto X" con los de las bases de datos conduce al *reconocimiento* de su estructura química (identificación tentativa), cuando se observa su concomitancia. La misma comparación y la coincidencia de los parámetros experimentales (*RI*, MS) del "compuesto X" con los obtenidos para un compuesto-patrón certificado analizado en el mismo equipo GC-MS y bajo las mismas condiciones operacionales, conducen a la *identificación* estructural inequívoca (positiva) del compuesto en la mezcla.

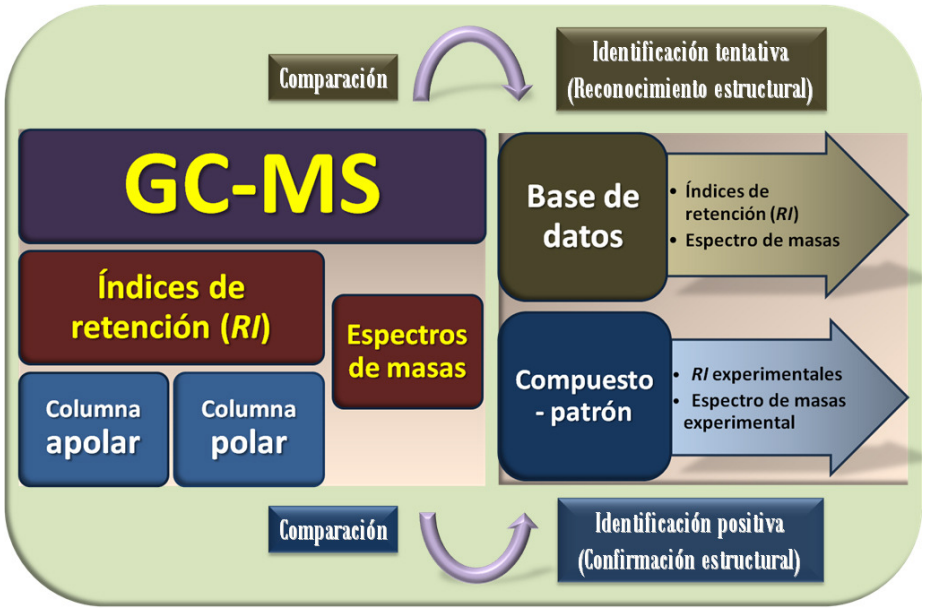


Figura 1. Estrategia analítica general para la identificación tentativa (presuntiva) o positiva (confirmación) de un compuesto presente en una mezcla-problema.

2 Índices de retención en cromatografía de gases

En cromatografía de gases, la separación de sustancias se basa en las diferencias de sus constantes de distribución, K_D, entre las dos fases, móvil y estacionaria (f.e.). El "arte" cromatográfico (*i.e.*, combinación de un sólido conocimiento científico y la experiencia práctica) reside en la selección correcta de las condiciones termodinámicas del proceso de separación, conducente a la situación cuando las constantes K_D para diferentes sustancias, obtenidas bajo las condiciones únicas operacionales, sean distintas, *i.e.*, para que los analitos se separen nítidamente; ello, infortunadamente no se logra en algunos casos. La K_D depende de la naturaleza química de las fases móvil y estacionaria y de la del analito, así como de la temperatura de la columna. La retención de los analitos en una columna es función de sus presiones de vapor y de las fuerzas intermoleculares que gobiernan sus relaciones con la f.e. La constante K_D incide sobre la velocidad de elución de analitos o -lo que más comúnmente se conoce y se utiliza-, sobre los llamados *tiempos de retención*, característicos para una columna cromatográfica dada y para las condiciones operacionales particulares. Si la velocidad lineal promedio del gas de arrastre en la columna es constante, la retención de analitos es influenciada básicamente por el tiempo de su permanencia en la fase estacionaria. A mayores valores de K_D, más largos serán los tiempos de retención de analitos, t_R. Los últimos, empero, son funciones de múltiples variables operacionales, a saber: tipo y dimensiones de la columna, la polaridad de la fase estacionaria y su grosor, temperatura de la columna y la velocidad de su calentamiento, el tipo del gas de arrastre y su velocidad, el modo de inyección y la presión de salida de la columna (ambiental *Vs* presión reducida), y dependen, inclusive, de la cantidad (concentración) del analito que eluye de la columna (**Figura 2**) o del grado de uso (o sea, desgaste), de la contaminación o activación de la columna [13,14].

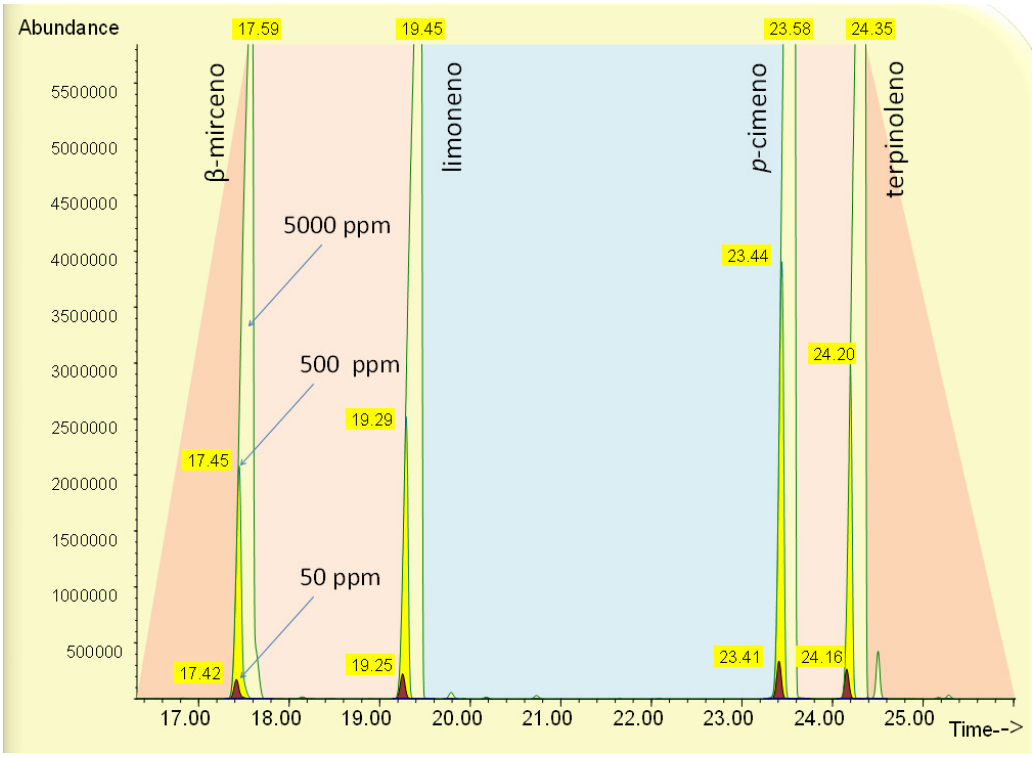


Figura 2. Reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R, min)) -en función de sus concentraciones (50, 500 ó 5000 ppm) en la mezcla-, de algunas sustancias-patrón analizadas por GC-MS en una columna polar (DB-WAX, 60 m), con programación lineal de su temperatura. Obsérvese un desplazamiento de los t_R con el aumento de la cantidad del analito en la mezcla.

En la **Tabla 1** aparecen los datos de los t_R de algunos compuestos terpénicos-patrón, obtenidos con detectores selectivo de masas (MSD) y de ionización en llama (GC-FID). En cada sistema cromatográfico empleado, la mezcla-patrón, en tres concentraciones de sus componentes, se inyectó cinco veces (n = 5) consecutivas, para comparar la repetitividad y la reproducibilidad de los t_R en ambos sistemas.

Tabla 1 Reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de algunas sustancias-patrón medidos en diferentes sistemas cromatográficos (GC-MS y GC-FID) y con diferentes concentraciones de analitos en la mezcla.

Compuesto-patrón	Pureza [a]	Concentración, ppm	MSD [b]		FID [c]	
			t_R promedio, min	CV, % (n=5)	t_R promedio, min	CV, % (n=5)
α-Pineno	98%	50	8.99	0.08	6.34	0.05
		500	9.01	0.06	6.35	0.05
		5000	9.10	0.16	6.46	0.08
Canfeno	95%	50	11.27	0.05	8.00	0.03
		500	11.28	0.05	8.01	0.05
		5000	11.40	0.15	8.16	0.09
β-Mirceno	93.8%	50	17.42	0.02	14.04	0.01
		500	17.44	0.04	14.06	0.03
		5000	17.56	0.11	14.27	0.09
R-(+)-Limoneno	97%	50	19.25	0.02	15.81	0.01
		500	19.28	0.04	15.84	0.03
		5000	19.42	0.14	16.07	0.09
p-Cimeno	99%	50	23.41	0.01	20.07	0.01
		500	23.43	0.03	20.08	0.02
		5000	23.55	0.10	20.27	0.06
Terpinoleno	95%	50	24.16	0.01	20.82	0.01
		500	24.18	0.03	20.84	0.02
		5000	24.32	0.10	21.06	0.03
1-Octen-3-ol	98%	50	33.08	0.01	30.10	0.01
		500	33.09	0.02	30.11	0.01
		5000	33.17	0.05	30.23	0.03
Linalool	97%	50	37.48	0.01	34.47	0.01
		500	37.50	0.02	34.48	0.01
		5000	37.58	0.03	34.62	0.03
(+)-Dihidrocarvona	98%	50	40.85	0.00	37.42	0.01
		500	40.85	0.01	37.42	0.01
		5000	40.92	0.03	37.51	0.03
α-Humuleno	98%	50	42.65	0.01	39.12	0.01
		500	42.68	0.02	39.15	0.02
		5000	42.87	0.05	39.38	0.06
S-(+)-Carvona	96%	50	45.29	0.01	41.84	0.01
		500	45.30	0.02	41.85	0.01
		5000	45.42	0.02	42	0.04
Óxido de cariofileno	95%	50	54.81	0.00	51.14	0.00
		500	54.83	0.02	51.16	0.00
		5000	54.99	0.02	51.35	0.04
Eugenol	99%	50	60.80	0.01	57.38	0.01
		500	60.80	0.01	57.38	0.00
		5000	60.85	0.01	57.44	0.01

Tabla 1 (continuación)

Compuesto-patrón	Pureza [a]	Concentración, ppm	MSD [b]		FID [c]	
			t_R promedio, min	CV, % (n=5)	t_R promedio, min	CV, % (n=5)
Timol	99.5%	50	61.33	0.00	58.04	0.01
		500	61.33	0.01	58.04	0.00
		5000	61.36	0.00	58.09	0.01

a- Compuesto-estándar, adquirido a Sigma-Aldrich.

b- Cromatógrafo de gases (GC) modelo *Agilent Technologies* 6890N (Palo Alto, CA, EE.UU.). Columna capilar polar (f.e. polietilenglicol) DB-WAX (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), inyección en modo *split* 15:1, volumen de inyección – 2 µL, velocidad lineal media de gas de arrastre (helio, 99,9995%) – 39 cm/s, programación de la temperatura del horno cromatográfico: de 45°C (10 min) @ 3°C/min hasta 220°C (30 min). Detector selectivo de masas (MSD): modelo *Agilent Technologies* 5975N, impacto de electrones, 70 eV, analizador cuadrupolar, barrido de radiofrecuencia en rango de masas *m/z* 40 – 250 Da. Temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia - 230°C, para ambas.

c- Cromatógrafo de gases (GC) modelo *Agilent Technologies* 6890 (Palo Alto, CA, EE.UU.). Columna capilar polar (f.e. polietilenglicol) DB-WAX (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), inyección en modo *split* 30:1, volumen de inyección – 2 µL, velocidad lineal media de gas de arrastre (helio, 99, 995%) – 53 cm/s, programación de la temperatura del horno cromatográfico: de 45°C (10 min) @ 3°C/min hasta 220°C (30 min). Detector de ionización en llama (FID), temperatura – 250°C, flujos de gases: aire: 450 mL/min, hidrógeno – 40 mL/min, nitrógeno (*make-up*) – 40 mL/min.

En general, para ambos sistemas de detección, tanto FID como MSD, se observan reproducibilidades de los t_R sumamente altas (CV < 0.2%), con su ligera disminución de este valor para las concentraciones más altas, o para el MSD en comparación con el FID.

Los tiempos de retención son muy sensibles a los cambios -aún muy pequeños-, de las condiciones cromatográficas; son difícilmente reproducibles con muy alta exactitud, si se cambia algún parámetro cromatográfico, aún más cuando se miden en los equipos GC de diferentes fabricantes; se observan también sus variaciones *inter*-laboratorios o inclusive en el mismo cromatógrafo, por ejemplo, cuando la explotación de la columna es larga y continua y se presenta su activación o contaminación. Desde su inicio y durante todo su desarrollo, en el análisis GC siempre ha existido una necesidad de "liberar" o de independizar los parámetros de retención de las condiciones cromatográficas operacionales. Ello, con miras a obtener una herramienta o un parámetro de comparación invariable, que, sobre todo, serviría para la identificación previa o para la diferenciación de analitos en GC y para comparar los datos *intra*- e *inter*-laboratorios.

La determinación de los *tiempos de retención relativos*, t_{RR}, con base en el uso de un *patrón interno*, en parte, permite minimizar la dependencia de los t_R de algunos parámetros operacionales, *e.g.*, de la fluctuación de temperaturas o de gas de arrastre, activación de la columna, etc., pero ello no resuelve el problema para comparar los datos *inter*-laboratorio o para llevar a cabo la identificación tentativa de sustancias (por comparación con sus patrones). Además, es muy difícil para una corrida cromatográfica de una mezcla multicomponente encontrar el patrón interno único y que éste sirva para todas las sustancias de la mezcla, y que eluyen en un amplio rango de t_R. Todos estos inconvenientes relacionados con el uso de los t_R o t_{RR}, para la identificación de sustancias, han sido parcialmente superados a través de la introducción de los llamados *índices de retención*.

Para aumentar el grado de confiabilidad en la comparación de los datos de retención cromatográfica y permitir la identificación tentativa de los analitos, hace un medio siglo, el científico húngaro, E. Kovàts **(Figura 3)** introdujo un sistema de índices de retención, llamados por su nombre "los índices de Kovàts" *(KI)*, que se basan en la medición de tiempos de retención relativos con respecto a los de una serie homóloga de *n*-parafinas, corridas bajo las mismas ones cromatográficas experimentales que las de la muestra [15-17]. Obviamente, a finales de los

años 50, las mediciones se llevaban a cabo a temperatura constante (régimen isotérmico), ya que la posibilidad técnica de programar reproduciblemente la temperatura del horno cromatográfico fue implementada en equipos GC comerciales un poco más tarde. Cuando el análisis se lleva a cabo en régimen isotérmico, los logaritmos de los tiempos de retención (log t_R) aumentan con el número de átomos de carbono en la *n*-parafina; por definición, los índices de retención fueron asignados por E. Kovàts así: 500 - para pentano, 600 - para hexano, 700 - para heptano, etc., o sea, *KI* = (100 x n), para cualquier *n*-parafina, donde *n* – es un número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada.

Figura 3. El doctor E. Kovàts, quien hace más de un medio siglo introdujo en la cromatografía de gases el sistema de los llamados *índices de retención* o *los índices de retención de Kovàts*, *KI*, llamados así por su nombre. Los valores de *KI* se miden con respecto a una serie de *n*-parafinas, separadas isotérmicamente en una columna cromatográfica. (Foto tomada por E. E. Stashenko, en Moscú, Rusia, mayo 2003, durante el Simposio Internacional sobre Separaciones en Bio-Ciencias, SBS-2003).

Los *KI* (índices isotérmicos) se calculan con base en la siguiente fórmula:

$$KI = 100n + 100 \frac{\log t_{Rx} - \log t_{Rn}}{\log t_{RN} - \log t_{Rn}}$$

Ecuación (1)

Donde: **n** es el número de átomos de carbono en la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés (su tiempo de retención es t_{Rx}) y t_{Rn} y t_{RN} son tiempos de retención de las *n*-parafinas con los números de átomos de carbono **n** y **N**, respectivamente, que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés.

Se ha presumido lograr que los índices de retención se independizaran de la mayoría de las condiciones experimentales (temperatura, flujo de gas de arrastre y, sobre todo, de las dimensiones de la columna, etc.); empero, éstos siguen dependiendo de la polaridad de la f.e. de la columna y de su temperatura.

La gran mayoría de muestras son mezclas de componentes con amplio rango de presiones de vapor y pesos moleculares, es imposible analizarlas -en tiempo razonable-, y con la resolución requerida, usando la temperatura constante en la columna **(Figura 4)**. El análisis cromatográfico de mezclas requiere casi siempre programar la temperatura del horno cromatográfico. De esta manera, las *n*-parafinas eluyen de la columna en modo "lineal" y no "logarítmico"

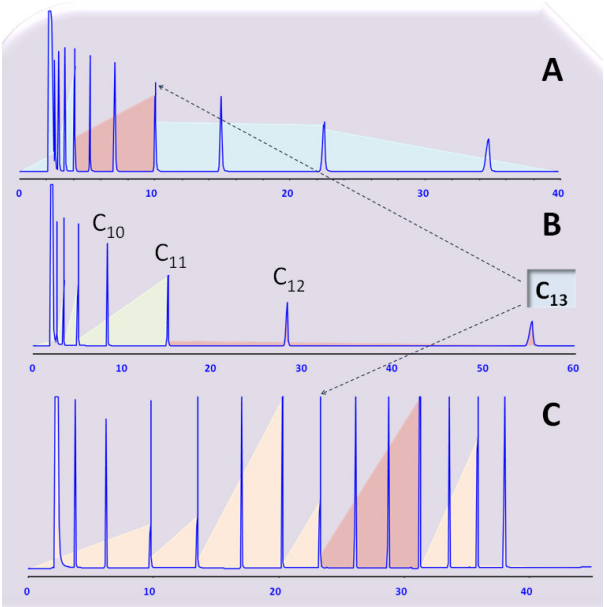


Figura 4. Análisis por GC-FID de una mezcla de *n*-parafinas en una columna apolar HP-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) con dos regímenes de la temperatura: (1) isotérmico (**A**) a 150°C y (**B**) a 80°C; (2) con programación lineal de temperatura de la columna (**C**).

Ello permitió a los investigadores H. van den Dool y D.J. Kratz [18] modificar la **Ecuación (1)** y proponer el cálculo de los llamados *índices de retención lineales* (*LRI*) o los *índices de retención de temperatura programada* (*PTRI* o I^T)

- que se utilizan masivamente hoy en día-, según la **Ecuación 2**, así:

$$LRI = 100n + 100\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Ecuación (2)

Donde: **n** es el número de átomos de carbono en la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés (su tiempo de retención es $\mathbf{t_{Rx}}$); $\mathbf{t_{Rn}}$ y $\mathbf{t_{RN}}$ son tiempos de retención de las *n*-parafinas con los números de átomos de carbono **n** y **N**, respectivamente, que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés.

Los índices de retención isotérmicos (*KI*) y lineales (*LRI*), si más bien pueden tener valores cercanos, no son idénticos, luego, cuando se reportan es necesario diferenciarlos e indicar cómo fueron encontrados. En muchos artículos los índices se llaman simplemente "de Kovàts", cuando, en realidad, se determinaron en columnas capilares con programación de la temperatura. Los *LRI* eventualmente dependen tanto de la temperatura inicial de la columna, como de la velocidad con que ésta se incrementa, también de la polaridad de la f.e. y de su "estado" (contaminación, actividad, fabricante). Por ende, se puede encontrar en la literatura científica una dispersión apreciable de valores de los índices de retención [19], inclusive, para el mismo compuesto y en la misma f.e., lo que reduce, en parte, la confiabilidad de su uso único para la identificación positiva de compuestos, sin acudir a los espectros de masas o a las sustancias-patrón. La estandarización de las condiciones cromatográficas para determinar los índices de retención conduciría indudablemente a su mayor reproducibilidad y confianza en su uso como herramienta de identificación.

La "identificación" basada en la comparación de los índices de retención de la "sustancia X" y de la sustancia-patrón, determinados bajo las mismas condiciones cromatográficas, no libera, empero, completamente de las posibles coincidencias (*e.g.*, dos sustancias diferentes pueden tener el mismo índice de retención en una columna). Por ello, se necesita emplear otra "coordenada", *i.e.*, hallar el índice en una columna diferente, con la f.e. *ortogonal* (polar *Vs* apolar) y, sobre todo, se requiere agregar una información adicional (tercera dimensión), una "huella digital", que es un *espectro de masas* de la sustancia. En el análisis de mezclas por GC-MS, el espectro experimental se compara con el espectro extraído de una base de datos o con el espectro de masas de la sustancia-patrón, cuando se dispone de ésta. En el primer caso, la identificación tendría un carácter tentativo (presuntivo) y conduciría al *reconocimiento* estructural; en el segundo caso, cuando se usa un compuesto-patrón, la identificación del analito se considerará positiva (*confirmatoria*), esto es, cuando los tres parámetros, *RI* en dos columnas ortogonales mas los espectros de masas, coinciden.

Las dispersiones de los valores de índices de retención en bases de datos o en referencias bibliográficas, en algunos trabajos que abundan en portales de *internet*, así como de los valores obtenidos por los mismos laboratorios en particular, se deben a varios factores; entre ellos, han de mencionarse los siguientes: (1) *La columna*: aunque la f.e. puede ser químicamente la misma, de un fabricante a otro, alcanzan a presentarse variaciones en su actividad y capacidad de retención; (2) El uso prolongado y la posible *contaminación* y *activación* de la columna (f.e.) pueden también incidir sobre la variación de los t_R e índices de retención de compuestos; (3) *La temperatura*: la medición de los índices a diferentes temperaturas y las diferencias de la velocidad de calentamiento de la columna, así como sus cálculos hechos sin tener en cuenta los intervalos "isotérmicos" o con programación de temperatura, pueden conducir a la no identidad de valores de los índices para el mismo compuesto; y, finalmente, (4) Los errores cometidos en la *asignación estructural* de compuestos, que conducen a la gran confusión a la hora de uso de los valores de índices de retención como criterio de identificación de sustancias.

Una excelente revisión de diferentes aspectos históricos y conceptos básicos relacionados con los índices de retención, *RI*, su reproducibilidad y aplicación, hacen los investigadores en el trabajo [20]. Los autores analizan y recopilan los conceptos fundamentales y las teorías existentes sobre la retención cromatográfica de analitos y sobre la viabilidad de su comparación cuando éstos se obtienen en diferentes sistemas cromatográficos; se discuten sistemas alternativos a la serie de *n*-alcanos como sustancias de referencia para determinar los índices de retención. Esto sí, solo para algunos de-

tectores específicos, ECD, NPD o FPD (detectores de captura de electrones, específico del nitrógeno y fósforo, o fotométrico de llama, según sus siglas en inglés), que no generan respuesta sensible a los hidrocarburos. Los autores [20] describen minuciosamente diversas aplicaciones de los índices de retención, *e.g.*, en su combinación con los espectros de masas en GC-MS, para la cromatografía multidimensional y para el estudio de los enantiómeros en GC quiral, diferentes bases de datos, hacen también recomendaciones muy útiles y prácticas para el uso de *RI* en el análisis de mezclas complejas. Se destacan los trabajos de Tudor [21,22] y González [23] y sus colaboradores, sobre varios aspectos termodinámicos del fenómeno de retención en GC y la dependencia de los índices de retención de la temperatura de columna. Por su gran utilidad práctica se destaca el trabajo de Babushok y Zenkevich [19], quienes hacen un análisis estadístico de los *RI* de los cien compuestos más frecuentemente reportados en diferentes aceites esenciales y fragancias, recopilando información de algunas de las bases de datos disponibles [24-27], libros [28-31], artículos [32,33] y portales de internet [34,35], que contienen la información sobre los índices de retención de diferentes analitos (terpenos, fragancias, semioquímicos, feromonas, drogas, sustancias de interés ambiental, etc.). Se comparan los índices de retención obtenidos en tres columnas, comúnmente usadas, con fases estacionarias de 100%-poli (dimetilsiloxano), 5%-fenil-poli(metilsiloxano) y de poli(etilenglicol). Estos autores [19] resaltan, que, en general, los valores de índices de retención medidos en columnas apolares (OV-101, HP-1, DB-1, SE-30, Ultra-1 y DB-5, SE-54, HP-5, Ultra-2, etc.) son más reproducibles (± 1-10 unidades), que los determinados en columnas polares (Carbowax 20M, Innowax, CP-WAX, 52 CB, DB -WAX, etc.). Las columnas polares, con poli (etilenglicol) (PEG) como f.e., presentan mayores dispersiones de valores de *RI* (± 10-50) porque la reproducibilidad de sus propiedades y características químicas es más baja que la de poli (dimetilsiloxanos), debido a los siguientes factores: amplio rango de pesos moleculares promedio de PEGs, diferente nivel de su entrecruzamiento y de tratamientos recibidos, entre otras variables. Mayores variabilidades de los *RI* se observan cuando el analito y la f.e. son "ortogonales", o sea, de diferentes polaridades, por ejemplo, eugenol y metilsiloxano, pineno y PEG. Sin embargo, una desviación muy grande del índice de retención de un analito dado de los reportados en la literatura o una base de datos, significa -en la mayoría de los casos-, su identificación estructural incorrecta.

3 Combinación de parámetros de retención cromatográfica con espectros de masas

Los aceites esenciales, líquidos fragantes constituidos por metabolitos secundarios volátiles, aislados por destilación de plantas aromáticas, son mezclas multicomponente, que pueden contener hasta más de 300 sustancias [36]. El aceite esencial *per se* es un excelente "modelo" para la cromatografía de gases, ya que sus constituyentes poseen diferentes grupos funcionales; entre ellos, se encuentran hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, éteres y ésteres, ácidos, otros. La mayoría de estas sustancias pertenece a la familia de terpenoides (C_{10-} y C_{15-}), pero también se destacan derivados fenólicos. La concentración de los constituyentes en los aceites esenciales puede variar desde ppt hasta ppm, en un amplio rango. Muchos de los componentes de los aceites poseen isómeros, *e.g.*, de posición, geométricos, espaciales y ópticos. Todo ello conduce a dos problemas objetivos en su análisis, a saber: (1) la separación completa de todos los componentes y (2) la asignación correcta de sus estructuras. Para algunas sustancias presentes en los aceites esenciales se observan índices de retención muy cercanos, por lo menos en una de las columnas (apolar o polar, con uso más frecuente figuran las columnas DB-1, DB-5 o DB-WAX o sus análogos comerciales); además, algunos constituyentes poseen espectros de masas muy parecidos, tal como se puede observar en la **Figura 5**. Ejemplos de esta índole se pueden encontrar muchos [24-31].

La separación completa de los componentes de los aceites esenciales puede lograrse con la cromatografía de gases total (*Comprehensive* GCxGC), que con mucho éxito fue aplicada a este tipo de mezclas [37-39].

Infortunadamente, la mayoría de laboratorios analíticos aún no poseen sistemas costosos de GC completa (*Comprehensive* GC x GC) [40], y utilizan la cromatografía de gases en una sola dimensión (una sola columna). Si el

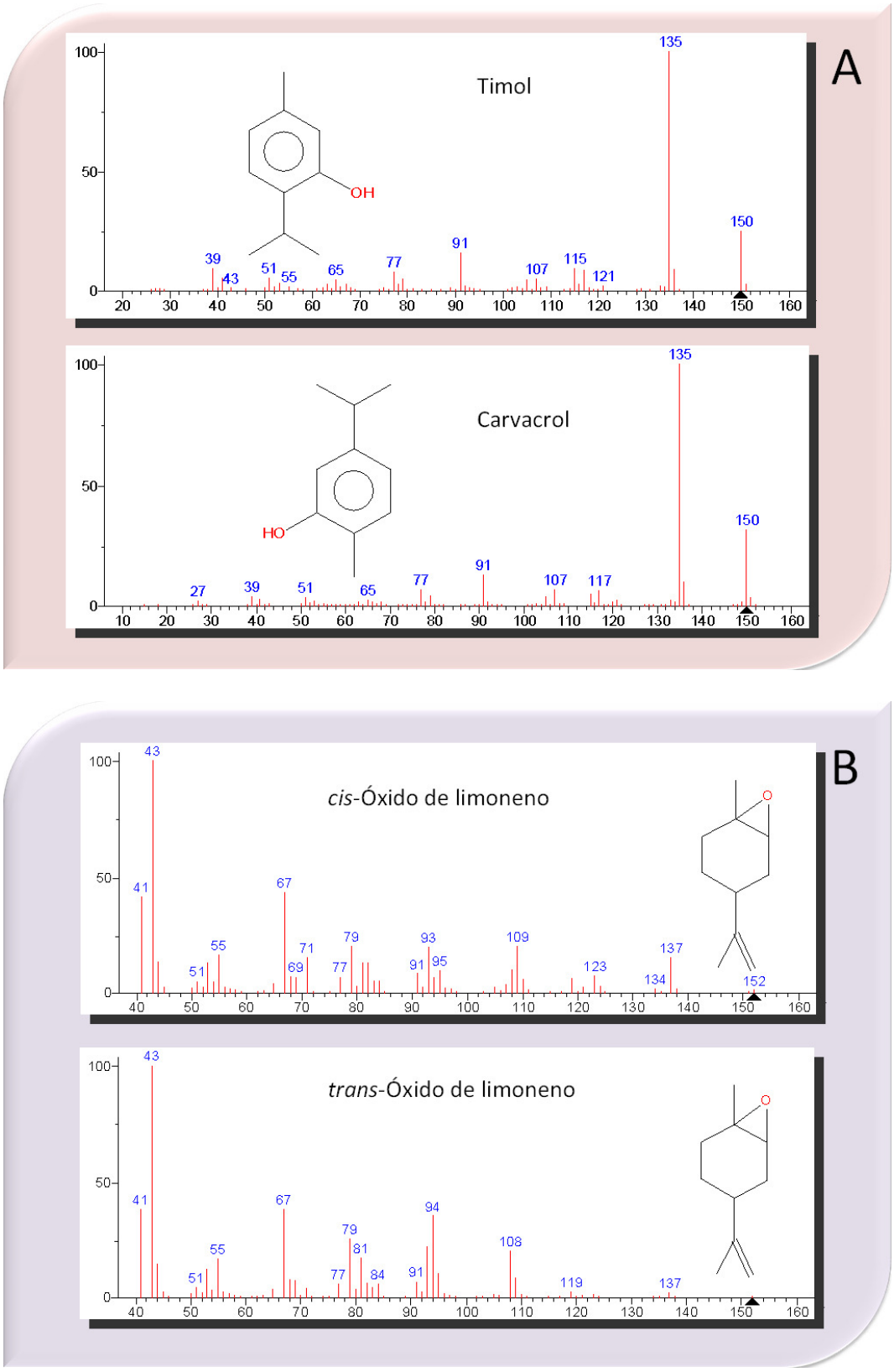
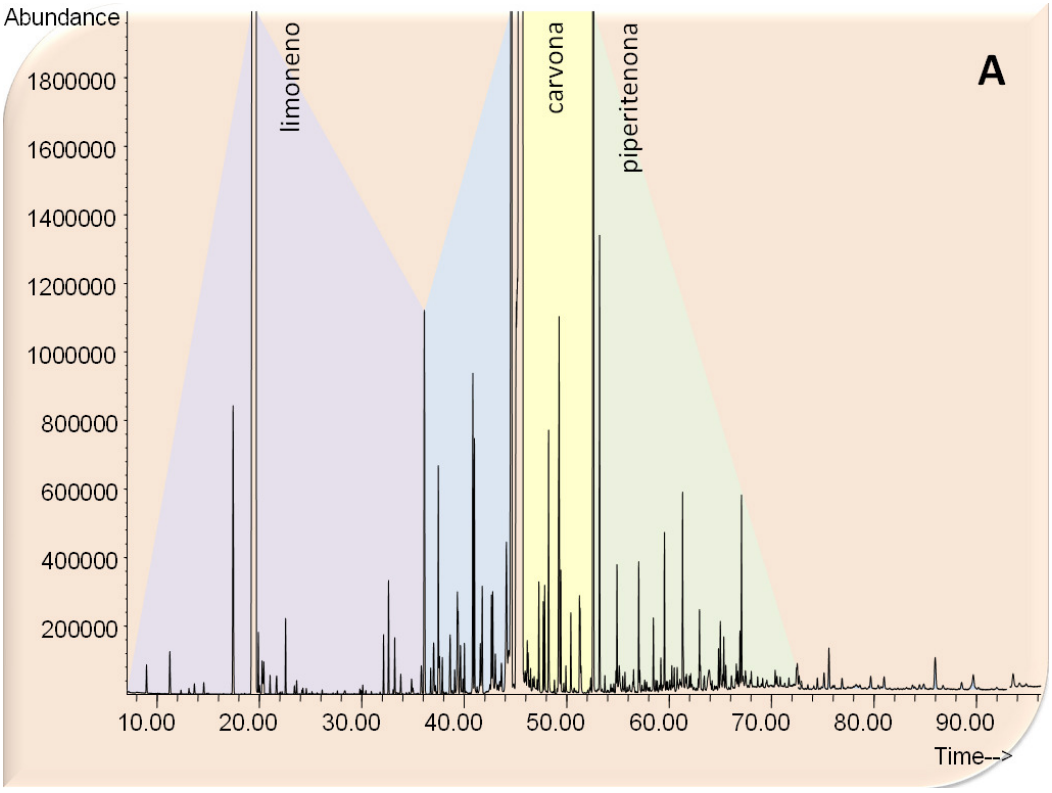
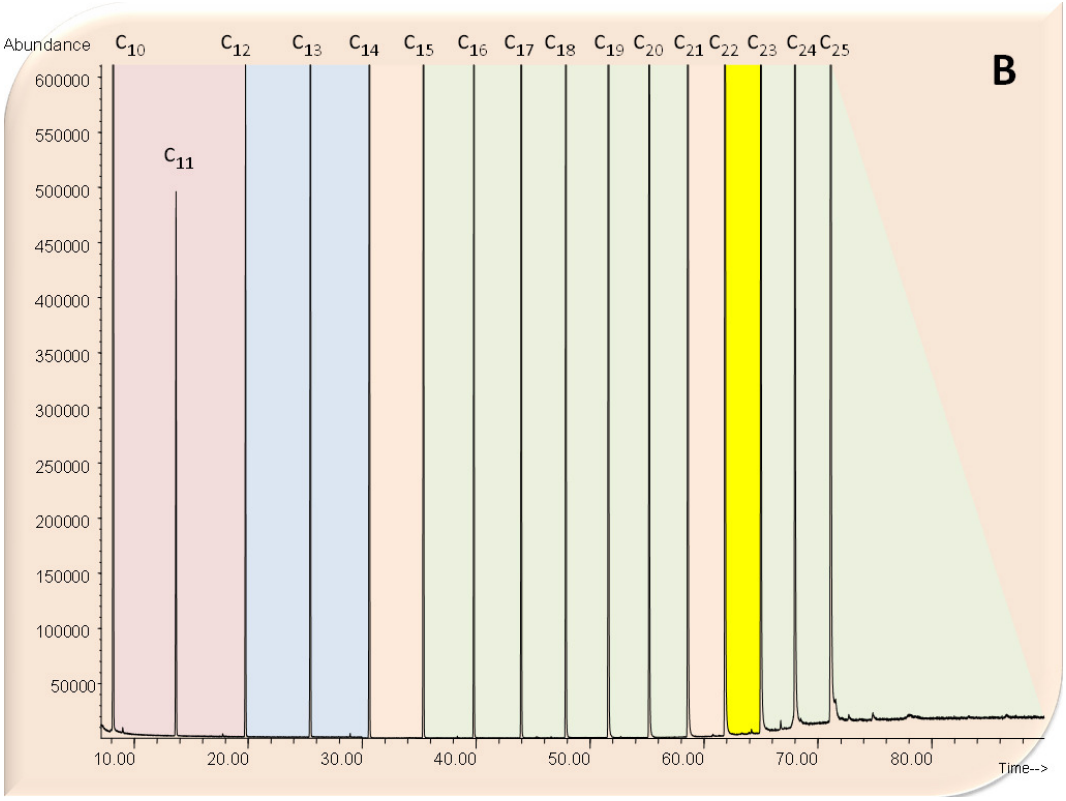


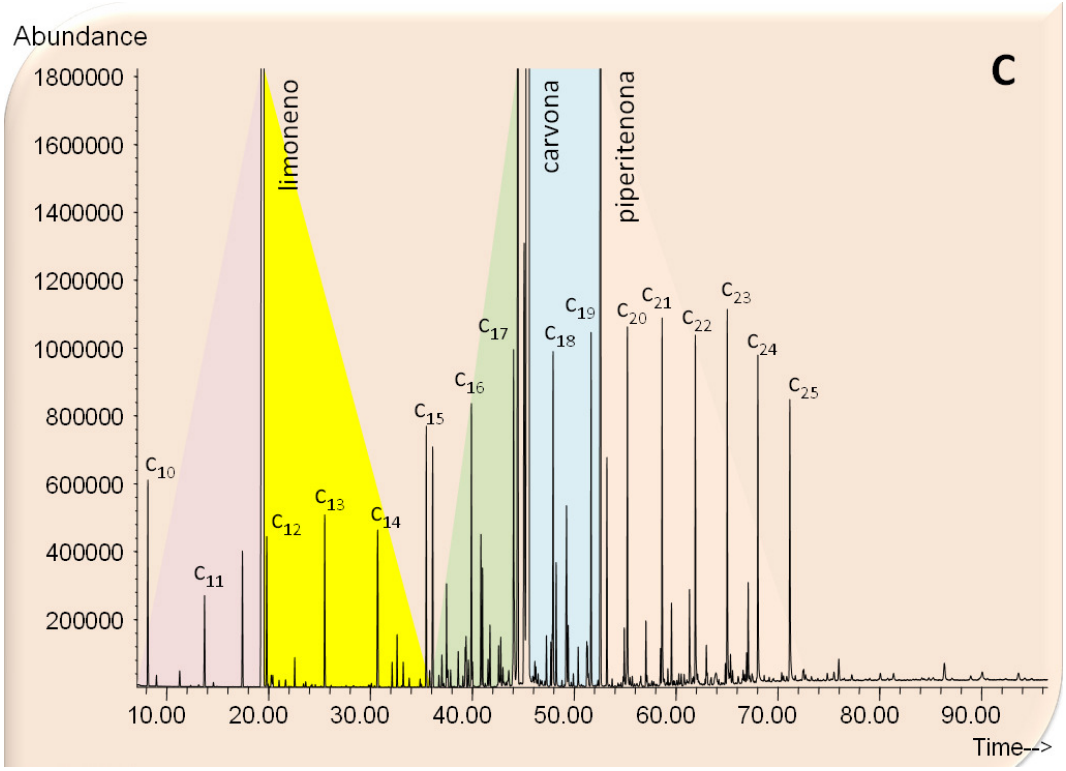
Figura 5. Espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (EI, 70 eV) de los compuestos: (**A**) Derivados fenólicos, timol y carvacrol y (**B**) Monoterpenoides (óxidos de limoneno, isómeros *cis*- y *trans*-), frecuentes constituyentes en los aceites esenciales. Obsérvense que el patrón de fragmentación de estos compuestos es el mismo, pero se notan algunas pequeñas diferencias en las intensidades de iones-fragmento.

análisis de un aceite esencial (o cualquier otra mezcla compleja), con miras a cuantificar e identificar sus componentes, se hace por cromatografía *unidimensional*, se requiere cumplir con las siguientes condiciones, a saber: (1) Usar columnas capilares preferiblemente más largas (50, 60 m); (2) Hacer el análisis en dos columnas capilares con f.e. ortogonales (*e.g.*, DB-1o DB-5 y DB-WAX); (3) Obtener espectros de masas por EI (70 eV) experimentales y realizar la búsqueda comparativa en -preferiblemente-, *varias* bases de datos de espectros de masas (*e.g.*, NIST, Wiley, Adams, etc.); (4) Calcular los índices de retención lineales en dos columnas, polar y apolar y (5) Usar los compuestos-patrón para la confirmación estructural adicional. La combinación de todos estos parámetros permite hacer la identificación confirmatoria de componentes de la mezcla. En el análisis por GC-MS es muy importante asegurarse que los picos cromatográficos sean "homogéneos", ya que la co-elución de varias sustancias puede conducir a las asignaciones incorrectas de las estructuras de analitos correspondientes.

En la **Figura 6** aparece un cromatograma típico (corriente iónica total, TIC, columna polar, DB-WAX, 60 m) del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la planta aromática tropical, *Lippia alba* (Familia Verbenaceae) (**Figura 7**), que se cultiva ampliamente en Colombia [41] y es muy usada en la medicina popular. Se observan los TICs (cromatogramas) del aceite esencial (**Figura 6A**), de la mezcla de *n*-parafinas C_6-C_{25} (**Figura 6B**) y de la mezcla de ambos, *i.e.*, del aceite esencial con las *n*-parafinas (**Figura 6C**), obtenidos en el mismo equipo GC-MS bajo las mismas condiciones operacionales (columna, temperaturas, flujo del gas de arrastre). Los cromatogramas (t_R) de sustancias-patrón disponibles (**Figura 6D**) sirven como una base para la identificación de los componentes del aceite (**Figura 6E**), junto con los índices de retención lineales (*LRI*), hallados en dos columnas ortogonales y la comparación de los espectros de masas experimentales con los extraídos de las diferentes bases de datos y con los de los patrones (**Tabla 2**). Los índices de retención lineales se calcularon tanto con base en los t_R de *n*-parafinas como estándares de referencia *externos* y usando los t_R de la mezcla de *n*-parafinas incorporada en el aceite (estándares *internos*) (**Tabla 3**).




B
Abundance
C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19 C20 C21 C22 C23 C24 C25
600000
550000
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
10.00 20.00 30.00 40.00 50.00 60.00 70.00 80.00
Time-->


C
Abundance
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
limoneno
carvona
piperitenona
C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19 C20 C21 C22 C23 C24 C25
10.00 20.00 30.00 40.00 50.00 60.00 70.00 80.00 90.00
Time-->

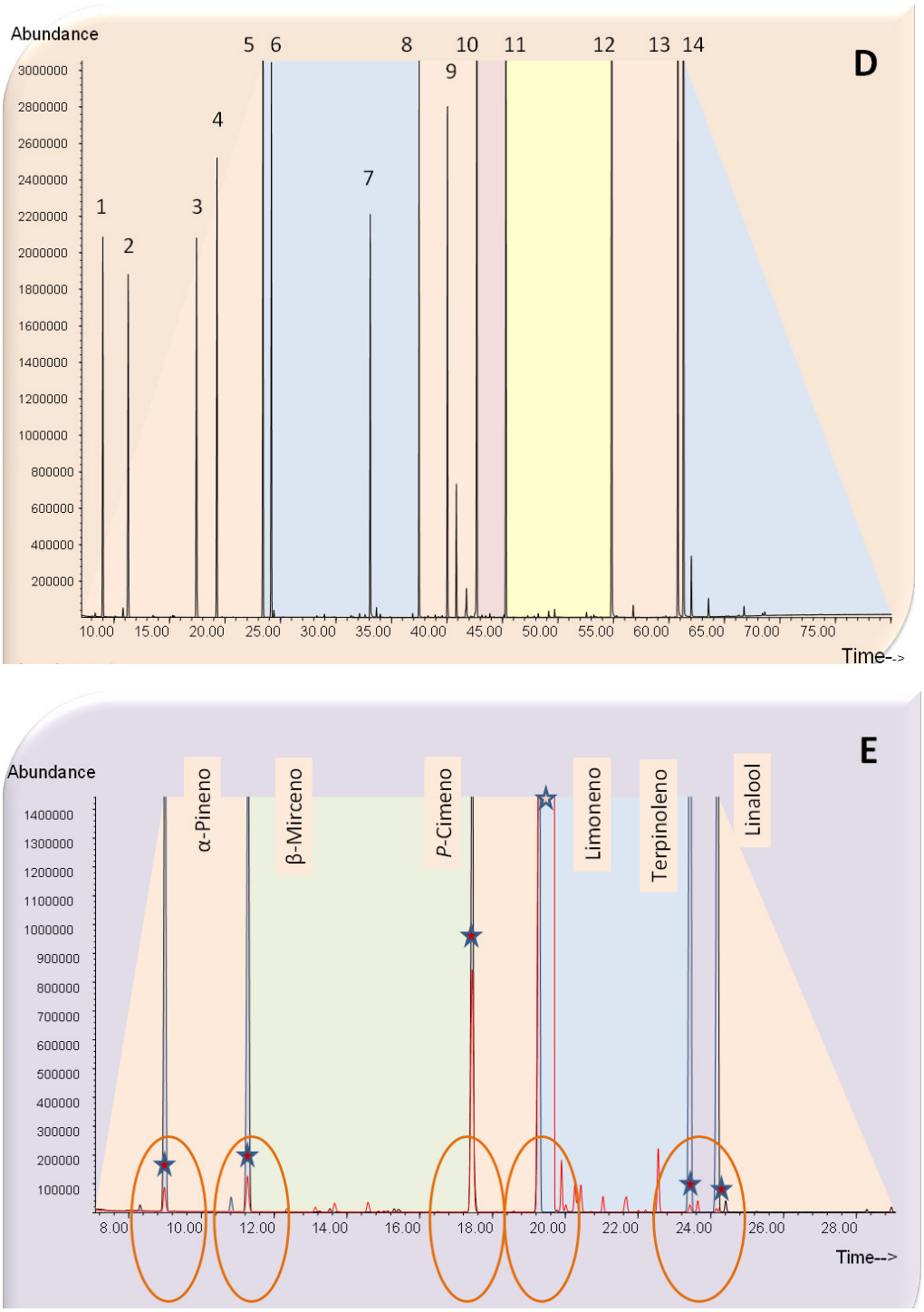


Figura 6. **A**. Cromatograma típico (corriente iónica total, TIC) del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae), aislado por hidrodestilación de la planta fresca, y analizado por GC-MS. Columna polar, DB-WAX (60 m). Programación lineal de temperatura de la columna. Detector selectivo de masas, EI, 70 eV (*m/z* 30-250). **B**. Mezcla de una serie homóloga de *n*-parafinas, C_6-C_{25}, analizada por GC-MS, bajo las mismas condiciones operacionales que el aceite esencial. **C**. El aceite esencial y *n*-parafinas, C_6-C_{25}, analizados por GC-MS, juntos en una mezcla. **D**. Cromatograma típico (TIC) de sustancias-patrón, varios de los cuales están presentes en el aceite esencial de *Lippia alba*. 1. α-Pineno; 2 Canfeno; 3. β-Mirceno; 4. Limoneno; 5. *p*-Cimeno; 6. Terpinoleno; 7. 1-Octen-3-ol; 8. Linalool. 9. *trans*-Dihidrocarvona; 10. α-Humuleno; 11. Carvona; 12. Óxido de cariofileno. 13. Eugenol. 14. Timol. **E**. Fragmento de la superposición de dos cromatogramas, obtenidos por GC-MS, del aceite esencial y de la mezcla de patrones certificados, lo que confirma, entre otros datos (*LRI* y espectros de masas), y por la co-elución en la misma columna, la identidad química de compuestos presentes en el aceite esencial. El color rojo corresponde a la corriente iónica total, obtenida por GC-MS, del aceite esencial de *Lippia alba*.

Tabla 2. Índices de retención recopilados de la literatura científica, y experimentalmente obtenidos, para algunos componentes comunes en los aceites esenciales.

Nombre	CAS	Fase estacionaria [a]	N° de réplicas [b]	Mediana [b]	SD [b]	Rango de 50% *RI* [b]	Valores experimentales [c]	
							Patrón	Muestra
1-Octen-3-ol	3391-86-4	5%-Ph-Me-Sil	181	980	5.7	977-983	981	N.D.
		PEG	212	1449	17.7	1437-1455	1452	
β-Mirceno	123-35-3	5%-Ph-Me-Sil	411	991	4	988-992	990	990
		PEG	380	1160	11.4	1155-1168	1162	1162
p-Cimeno	99-87-6	5%-Ph-Me-Sil	382	1025	5.8	1022-1027	1028	N.D.
		PEG	343	1270	13.1	1263-1281	1264	
Limoneno	138-86-3	5%-Ph-Me-Sil	374	1030	6.5	1027-1032	1033	1036
		PEG	430	1199	13.6	1190-1205	1192	1199
Terpinoleno	586-62-9	5%-Ph-Me-Sil	316	1088	5.8	1086-1090	1089	N.D.
		PEG	274	1283	10.5	1276-1290	1278	
Linalool	78-70-6	5%-Ph-Me-Sil	431	1.099	5.5	1097-1101	1101	1102
		PEG	517	1547	15.8	1537-1557	1548	1547
Carvona	99-49-0	5%-Ph-Me-Sil	121	1242	7.6	1239-1243	1252	1258
		PEG	88	1738	16.4	1722-1751	1734	1739
Timol	89-83-8	5%-Ph-Me-Sil	126	1290	6.5	1289-1293	1293	1294
		PEG	87	2188	27.9	2172-2198	2184	2183
Eugenol	97-53-0	5%-Ph-Me-Sil	149	1356	8.6	1354-1360	1358	1357
		PEG	150	2166	20.5	2151-2185	2168	2166
α-Humuleno	6753-98-6	5%-Ph-Me-Sil	371	1454	9.5	1450-1456	1470	1473
		PEG	296	1667	17.5	1656-1682	1669	1670
Germacreno D	23986-74-5	5%-Ph-Me-Sil	334	1480	7.4	1479-1483	-	1493
		PEG	210	1710	16.2	1700-1722		1711
Óxido de cariofileno	1139-30-6	5%-Ph-Me-Sil	321	1581	8.2	1577-1583	1599	1600
		PEG	216	1988	23.8	1969-2008	1990	1991

a- Fases estacionarias: 5%-Ph-Me-Sil - 5%- fenil-poli(dimetilsiloxano), PEG - poli(etilenglicol).

b- Datos tomados de [19]: V.I. Babushok, I. G. Zenkevich, Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC, *Chromatographia*, **2009**, 69 (3/4), 257-269.

c- Índices de retención lineales, obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Cromatografía, UIS (Bucaramanga, Colombia), de los compuestos-patrón (Sigma-Aldrich) y algunos componentes del aceite esencial aislado por hidrodestilación de la planta aromática *Lippia alba* (Familia Verbenaceae). Columnas DB-5 y DB-WAX de 60 m, ambas, con programación lineal de temperatura.

N.D. No detectado

A modo de ejemplo, en la **Tabla 4**, se reúne la información comparativa, obtenida de las corridas cromatográficas en las columnas apolar, DB-5 (60 m), y polar, DB-WAX (60 m), de las sustancias-patrón certificadas (β-mirceno, limoneno y carvona) y de algunos constituyentes registrados en el aceite esencial de *Lippia alba* (**Figura 6a**); se reportan *LRI* experimentales obtenidos en ambas columnas y de literatura [28], junto con los grados de coincidencia (*peak matching o peak quality*) entre los espectros de masas experimentales (EI, 70 eV) y los de las bases de datos (Adams, Wiley y NIST). El análisis de esta información permite confirmar positivamente la presencia en el aceite del β-mirceno, limoneno y de la carvona, identificar tentativamente a la piperitenona y al β-bourboneno, pero la "identificación" del germa-

Tabla 3. Algunos ejemplos de los índices de retención lineales calculados en las columnas apolar (DB-5, 60 m) y polar (DB-WAX, 60 m) de los compuestos-patrón y presentes en el aceite esencial aislado por hidrodestilación de *Lippia alba* (Familia Verbenaceae).

Terpenos	*LRI, Compuestos-estándar*		*LRI, Aceite esencial de Lippia alba*			
	Columna DB-5MS	Columna DB-WAX	Columna DB-5		Columna DB-WAX	
			Método A	Método B	Método A	Método B
α-Pineno	936	1015	936	936	1015	1015
Canfeno	954	1057	954	953	1056	1056
Limoneno	1033	1192	1036	1036	1199	1195
Linalool	1101	1548	1104	1103	1547	1546
Carvona	1252	1734	1258	1258	1740	1739

Método A La medición se llevó a cabo con base en los tiempos de retención obtenidos en dos cromatogramas, por separado, así: (1) del aceite esencial y (2) de la mezcla de *n*-parafinas (C_6-C_{25}), analizadas en la misma columna, bajo las mismas condiciones cromatográficas (temperatura programada), en el mismo día.

Método B La medición de los índices de retención se llevó a cabo en las mismas condiciones utilizadas en el método A, pero el aceite esencial y los *n*-parafinas (C_6-C_{25}) se mezclaron previamente y se analizaron juntos (Véase **Figura 6**).

Figura 7. **A**. Planta aromática de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae); **B**. Equipo para hidrodestilación de aceites esenciales. Complejo agroindustrial piloto CENIVAM (Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia). Fotos: E.E. Stashenko.

creno D requeriría, quizá, uno de los pasos adicionales, a saber: (1) el uso de sustancia-patrón ó (2) el aislamiento de este sesquiterpeno, para elucidar espectroscópicamente (IR. NMR, MS) su estructura.

Tabla 4. Información comparativa sobre los índices de retención lineales (*LRI*) y espectros de masas (EI, 70 eV) de sustancias-patrón, compuestos presentes en el aceite esencial y los de bases de datos [24,25, 28].

Compuesto	CAS	Grado de concordancia entre espectros de masas *						*LRI*			
		Aceite esencial			Sustancias-patrón			Columna DB-5		Columna DB-WAX	
		Adams	Wiley	NIST	Adams	Wiley	NIST	Patrones	Aceite	Patrones	Aceite
β-Mirceno**	123-35-3	<50	93	86	<50	93	50	990	990	1162	1162
Limoneno**	138-86-3	97	98	94	96	98	95	1033	1036	1192	1199
β-Bourboneno	5208-59-3	95	98	97	-	-	-	1387***	1390	1492***	1500
Germacreno D	23986-74-5	98	98	96	-	-	-	1484***	1493	1689***	1711
Carvona**	2244-16-8	96	96	96	94	97	96	1252	1258	1734	1739
Piperitenona	491-09-8	95	90	<50	-	-	-	1340***	1346	-	1926

(*) Grado de coincidencia (*peak matching*) entre los espectros de masas experimentales y los de bases de datos [24,25,28]

(**) Sustancia-patrón certificada (Sigma-Aldrich).

(***) Índices de retención lineales obtenidos de [28].

4 Conclusiones

A pesar de una inmensa fortaleza analítica y de la confiabilidad de la cual goza hoy en día la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es importante vislumbrar claramente sus alcances y también sus limitaciones. Las limitaciones principales son marcadas por el tipo de muestra a analizar (peso molecular, volatilidad, termoestabilidad y polaridad de sus componentes). Pero existen también algunos problemas de fondo, objetivos. Entre ellos, se destacan estos dos: (1) la co-elución de componentes en la columna y (2) la identificación inequívoca de los componentes. Un conjunto de métodos analíticos instrumentales (UV, IR, NMR, MS, otros) para establecer la estructura molecular, implica el aislamiento de la sustancia pura, pero en muchos casos, esto no es posible; por ejemplo, en las muestras forenses, ambientales, alimentos, sabores y fragancias, aromas, feromonas, entre otras. Frecuentemente es necesario hacer la identificación por GC-MS de un componente *in situ*, directamente en la mezcla. Ello, implica varios pasos obligatorios, a saber: análisis en columnas ortogonales, polar y apolar, cálculo de los RI, obtención de los espectros de masas (EI, 70 eV) y la comparación de todos estos datos obtenidos con los de las bases de datos, compendios, libros o artículos. La coincidencia de los parámetros experimentales con los de referencia conduce al reconocimiento estructural de la sustancia, pero si esta comparación se hace con los *RI* en ambas columnas y con el espectro de masas de la sustancia-patrón (estándar certificado), se llega a la identificación positiva, confirmación estructural. Para la cuantificación de los componentes es obligatorio el uso de patrones y calibraciones, la cuantificación en general se hace por GC-FID (caso de aceites esenciales), la identificación, con base en los espectros de

masas obtenidos por MSD. Si no hay información de referencia, ni sustancias patrón certificadas, analizando los patrones de fragmentación en el espectro de masas, se pueden hacer algunas suposiciones sobre la estructura del analito, pero, son suposiciones, no hay nada más que hacer, porque es necesario o aislarlo de la mezcla, para hacer el estudio espectral (UV, IR, NMR, otros) o sintetizar todas las posibles moléculas hasta encontrar una idéntica al compuesto-problema presente en la mezcla. El camino es largo, pero no imposible.

P.S. Bueno, algunas de estas ideas tenía que exponer el estudiante cuando defendía su tesis y cuando le preguntaron sobre cómo fue posible "identificar" una estructura química, sin aislarla y basándose sólo en unos "numeritos", i.e., índices de retención.

Referencias Bibliográficas

1. H. Cortes, B. Winniford, J. Luong, M. Pursch. J. Sep. Sci., 32, 883 (2009).

2. L. Mondello, P. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo. Mass Spectrom. Rev., 27, 101 (2008).

3. M. Adahchour, J. Beens, U. Brinkman. J. Chromatogr. A, 1186, 67 (2008).

4. P. Marriot. J. Sep. Sci., 27 357 (2004).

5. T. A. Lee. A Beginner´s Guide to Mass Spectral Interpretation. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, 186 pp.

6. M. McMaster, C. McMaster. GC/MS. A Practical User´s Guide. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, 167 pp.

7. F. G. Kitson, B. S. Larsen, C. N. McEwen. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide. Academic Press, San Diego, California, USA, 1996, 381 pp.

8. H.-J. Hübschmann. Handbook of GC/MS. Fundamentals and Applications. 2d Ed. WILEY-VCH, Weinheim, 2009, 719 pp.

9. E. E. Stashenko, J. R. Martínez. Scientia Chromatographica, 1(3), 29 (2009).

10. E. E. Stashenko, J. R. Martínez. Scientia Chromatographica, 1(2), 23 (2009).

11. R. J. Molyneux, P. Schieberle. J. Agric. Food Chem., 55, 4625 (2007).

12. W. L. Budde. Analytical Mass Spectrometry. Strategies for Environmental and Related Applications. Oxford University press, ACS, Washington, D.C., 2001, 386 pp.

13. R. Grob, E. Barry. Modern Practice of Gas Chromatography. 4th Ed. John Wiley, New York, 2004, 888 pp.

14. S. Ahuja. Chromatography and Separation Science. Academic Press, New York, 2003, 250 pp.

15. E. Kovàts. Helv. Chim. Acta, 41, 1915 (1958).

16. E. Kovàts, P. B. Weiss. Ber. Bunseges Phys. Chem., 69, 812 (1965).

17. E. Kovàts. Adv. Chromatogr., 1, 229 (1965).

18. H. van den Dool, P. D. Kratz. J. Chromatogr., 11, 463 (1963).

19. V. I. Babushok, I. G. Zenkevich. Chromatographia, 69, 257 (2009).

20. B. d´Acampora Zellner, C. Bicchi, P. Dugo, P. Rubiolo, G. Dugo, and L. Mondello. Flavour Fragr. J., 23, 297 (2008).

21. E. Tudor. J. Chromatogr. A, 858, 65 (1999).

22. E. Tudor, D. Moldovan. J. Chromatogr. A, 848, 215 (1999).

23. F. R. González, A. M. Nardillo. J. Chromatogr. A, 842, 29 (1999).

24. NIST Standard Reference Database. NIST/EPA/ NIH Mass Spectral Library with Search Program. NIST, Gaithersburg, MD, USA. Data Version NIST 05:2008.

25. Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 9th Edition, 8th Edition, and Other Specialty Wiley Mass Spectral Libraries.

26. The Sadtler Standard Gas Chromatography Retention Index Library. Sadtler Division, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA., 1986, vol. 1-4.

27. FFNSC MS Library ver. 1.3. Chromaleont, Messina, Italy.

28. R. P. Adams. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Ed., Allured Publishing, Carol Stream, IL, USA, 2007, 804 pp.

29. W. Jennings, T. Shibamoto. Quantitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York, 1980, 472 pp.

30. D. Joulain, W. A. König. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B. Verlag, Hamburg, 1998, 658 pp.

31. H. H. Maurer, K. Pfleger, A. A. Weber. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites. Wiley-VCH, Weinheim, 2007, Vol 1-2.

32. N. W. Davies. J. Chromatogr., 503, 1 (1990).

33. F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci. J. Sep. Sci., 30, 563 (2007).

34. R. Mottram. The LRI and Odour Database. Flavour Research Group, School of Food Biosciences, University of Reading, UK: http://www.odour.org.uk (Acceso: 12 de febrero de 2010).

35. A. M. El-Sayed. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. HortResearch, Lincoln, New Zealand: http://www.pherobase.com (Acceso: 12 de febrero de 2010).

36. E. E. Stashenko. Aceites Esenciales. Ediciones UIS, Bucaramanga, Colombia, 2009, 180 pp.

37. P. J. Marriot, R. Shellie, C. Cornwell. J. Chromatogr. A., 936, 1 (2001).

38. R. Shellie, L. Mondello, P. Marriott, G. Dugo. J. Chromatogr. A., 970, 225 (2002).

39. C. von Mühlen. Scientia Chromatographica, 1 (3), 21 (2009).

40. C. Zini. Scientia Chromatographica, 1(1), 31 (2009).

41. E. E. Stashenko, B. E. Jaramillo, J. R. Martínez. J. Chromatogr. A, 1025, 99 (2004).