

Desarrollo y validación de un método de cromatografía gaseosa para la determinación de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica

Antonio Fonseca Gola¹, Juan Manuel Cordoví Velázquez², Niurka Benítez Guerra¹, Mirna Fernández Cervera^{3*}

¹Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales de Bayamo, Medilip, Carretera Central Vía Santiago de Cuba km 845, Bayamo, Granma, Cuba. Correos electrónicos: AFG: antoniofg@medilip.biocubafarma.cu, NBG: niurka@medilip.biocubafarma.cu

²Joven Club de Computación. 9na e/ Ave. Granma y 3ra, Bayamo, Granma, Cuba. Correo electrónico: jmcordv@nauta.cu

³Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Departamento de Farmacia, Universidad de La Habana, Calle 222 # 2317 e/ 23 y 31, La Lisa, La Habana, Cuba.

*Correos electrónicos: mirnafc@ifal.uh.cu, mirnafc@gmail.com

Recibido: 27 de enero de 2020

Revisado: 19 de abril de 2020

Aceptado: 20 de abril 2020

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa para la cuantificación simultánea de mentol (MT), salicilato de metilo (SM), timol (TM) y ácido benzoico (AB) en una solución antiséptica bucal. Se utilizó una columna DB-WAX y dietilenglicol como estándar interno. Se determinó la linealidad en un intervalo de concentraciones de 64,00 a 96,00 µg/mL (MT), 80,00 a 120,00 µg/mL (SM), 96,00 a 144,00 µg/mL (TM) y 48,00 a 72,00 µg/mL (AB), obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0,999, y coeficientes de variación de los factores de respuestas de 1,18, 1,95, 3,52 y 1,48%, respectivamente. Se establecieron límites de detección de 0,51; 1,14; 3,34 y 1,402 ng/mL para el MT, SM, TM y AB, respectivamente, mientras los límites de cuantificación fueron de 1,45, 3,43, 9,73 y 4,36 ng/mL en cada caso. Los porcentajes de recuperación fueron de 100,03, 99, 31, 99, 92 y 100,12; con coeficientes de variación de 0,42, 0,79, 0,66 y 0,76% para cada caso. El método fue lineal, exacto, preciso y selectivo para la determinación de los analitos en el control de calidad.

Palabras clave: Ácido benzoico, cromatografía gaseosa, mentol, salicilato de metilo, timol, validación de métodos analíticos.

SUMMARY

Development and validation of a gas chromatographic method for the determination of menthol, methyl salicylate, thymol, and benzoic acid in antiseptic solution

A method was developed and validated by gas chromatography for the simultaneous quantification of menthol (MT), methyl salicylate (SM), thymol (TM) and benzoic acid (AB) in an oral antiseptic solution. A DB-WAX column and diethylene glycol was used as internal standard. Linearity was determined in a concentration range of 64.00 to 96.00 $\mu\text{g/mL}$ (MT), 80.00 to 120.00 $\mu\text{g/mL}$ (SM), 96.00 to 144.00 $\mu\text{g/mL}$ (TM) and 48.00 to 72.00 $\mu\text{g/mL}$ (AB) achieving correlation coefficients greater than 0.999, and coefficients of variation of the response factors of 1.18, 1.95, 3.52 and 1.48%, respectively. Detection limits were established: 0.51, 1.14, 3.34 and 1.402 ng/mL for MT, SM, TM, and AB, respectively, while the quantification limits were 1.45, 3.43, 9.73 and 4.36 ng/mL in each case. Recovery percentages were 100.03, 99.31, 99.92 and 100.12; with coefficients of variation of 0.42, 0.79, 0.66 and 0.76% for each case. The method was linear, accurate, precise, and selective for the determination of analytes in quality control.

Keywords: Benzoic acid, gas chromatography, menthol, methyl salicylate, thymol, validation of analytical methods.

INTRODUCCIÓN

Diversos tratamientos y terapias con medicamentos combinados se han desarrollado con productos que se utilizaron originalmente como terapias independientes para controlar más rápidamente y de mejor forma las enfermedades. Para el químico analítico, esto presenta un gran desafío. Muchas veces los componentes de estos medicamentos combinados tienen diferencias significativas en sus propiedades físicas (solubilidad, punto de fusión, etc.) y químicas (pKa, máximo de absorción UV, estabilidad en los disolventes etc.) [1]. Por tanto, esto requerirá el desarrollo de métodos analíticos que permitan el análisis de las formulaciones multicomponentes.

La validación es un requisito indispensable para la utilización de los métodos de ensayo en la industria farmacéutica, esta solo será exhaustiva para aquellos métodos no normalizados, los diseñados o utilizados en el laboratorio y los métodos modificados o utilizados fuera de su alcance [2-4].

La validación de los métodos demuestra que los procedimientos analíticos son convenientes para su uso intencional. Es un requisito básico para asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados de todas las aplicaciones analíticas. Las normas que se refieren a los procedimientos de validación de las técnicas analíticas incluyen lo relacionado con el establecimiento de los límites de detección y cuantificación, la precisión, exactitud, especificidad, rango y robustez [2-5].

Variación de métodos analíticos han sido desarrollados para la determinación individual o en combinación de mentol [6-16], timol [17-19], ácido benzoico [20-27] y salicilato de metilo [7, 8, 12, 13, 16, 28, 29] con el empleo de diferentes formas de preparación de las muestras de acuerdo con el tipo de matriz en donde se encuentren los compuestos de interés.

Las técnicas que más comúnmente se han empleado son la cromatografía líquida de alta resolución y los de cromatografía gaseosa (CG), esta última es uno de los métodos más reportados para la determinación de estos analitos de forma individual o combinada, debido a su alta sensibilidad y versatilidad. La volatilidad de estos compuestos ha hecho que la CG sea una opción para su determinación en materia prima o producto final. Sin embargo, hasta el presente, no existe una metodología específica para determinar estos cuatro compuestos simultáneamente.

El hecho de que la solución antiséptica bucal no aparece en ninguna *Farmacopea* justifica la necesidad de desarrollar y validar los métodos analíticos empleados en la evaluación de su calidad.

Teniendo en cuenta las interferencias en la cuantificación simultánea de los cuatro analitos fue necesario el desarrollo de un método por CG sencillo y fácil de aplicar; con disolventes orgánicos disponibles y que no fueran agresivos con el material de relleno de las columnas cromatográficas de uso cotidiano. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar un método de cromatografía gaseosa para el análisis simultáneo de mentol, ácido benzoico, salicilato de metilo y ácido benzoico en una solución antiséptica bucal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Los reactivos usados fueron timol, material de referencia químico (MRQ) (F0D391, EE.UU.); mentol MRQ (R00640, EE.UU.); ácido benzoico MRQ (H0L534, EE.UU.); salicilato de metilo MRQ (G1L203, EE.UU.) y dietilenglicol MRQ (G0J412, EE.UU.).

Optimización del sistema cromatográfico

Para establecer el sistema cromatográfico a emplear en la determinación simultánea del mentol (MT), salicilato de metilo (SM), timol (TM) y ácido benzoico (AB) se aplicó un diseño multifactorial general de dos bloques, con 72 experimentos completamente aleatorizados. Para el inyector y detector se establecieron dos niveles de temperatura (220 y 250 °C); mientras que para el flujo se propusieron tres velocidades entre 50 y 70 cm/s. Posteriormente, se establecieron tres programas de temperatura (PT):

PT-1: temperatura inicial (Ti) a 60 °C mantenida por 5 min incrementándose hasta 220 °C a razón de 12 °C/min. La temperatura final (Tf) 220 °C fue mantenida por 5 min.

PT-2: Ti de 60 °C que se incrementó hasta 220 °C a razón de 8 °C/min. La Tf a 220 °C fue mantenida por 5 min.

PT-3: Ti de 80 °C incrementándose hasta 220 °C a razón de 8 °C/min. La Tf a 220 °C fue mantenida por 5 min.

El diseño propuesto se analizó a través del *software* profesional Design Expert, versión 8.0.6 del 2011, Stat, Ease, Inc. (EE.UU.). Como variables de respuesta se utilizaron: resolución $R_s \geq 2$, factor de cola o asimetría $A_s < 2$, platos teóricos $N > 2000$, temperatura del inyector y detector, velocidad de flujo y programa de temperatura. Para cada variable se analizaron los niveles de ajuste a través de los coeficientes de determinación ($r^2 \geq 0,98$), los coeficientes de determinación ajustados (r^2 ajustado $\geq 0,98$), los coeficientes de determinación predictivos (r^2 predictivo $\geq \pm 0,02$ respecto a r^2 ajustado) y la precisión adecuada (≥ 4). Se obtuvieron varias propuestas de condiciones cromatográficas seleccionando la de mayor valor de deseabilidad, estadígrafo inferencial de los sistemas multifactoriales mostrado a través de los gráficos de rampas.

El análisis se hizo en un equipo Shimadzu modelo 2010 (Kyoto, Japón) con detector de ionización por llama de hidrógeno. La columna empleada fue DB-WAX de 30 m x 0,32 mm, película 0,25 μm (Agilent, EE.UU.).

Primero, se realizaron dos extracciones con 10 y 5 mL de cloroformo (Merck, Alemania). La muestra fue acidulada con 1 mL de HCl 0,1 mol/L para el aislamiento de los analitos del medio acuoso. El dietilenglicol (Panreac, España) 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue empleado como estándar interno. Se pesaron con exactitud patrones de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico, las cantidades fueron 40, 50, 60 y 30 mg, respectivamente. Se trasvasaron con ayuda de 60 mL de etanol 96% hacia un matraz de 100 mL. Luego se transfirieron 5 mL hacia un embudo separador de 100 mL y se procedió igual que en la preparación de las muestras.

Posteriormente, alrededor de 100 mg de dietilenglicol se pesaron con exactitud y se trasvararon hacia un matraz aforado de 50 mL con ayuda de 30 mL de metanol. Se completó volumen con el mismo disolvente y se homogenizó.

Finalmente, 5 mL de la muestra se trasvararon hacia un embudo separador de 100 mL. Se añadió 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 mol/L; se extrajo durante 1 min con 10 mL de cloroformo, se dejó en reposo hasta separación de fases. Luego se trasvasó la fase clorofórmica (abajo) hacia un matraz de 25 mL que contenía 1 mL del estándar interno, a través de un embudo y papel de filtro rápido que contenía 2 g de sulfato de sodio anhidro previamente humedecido con 4 mL de cloroformo. Se realizó una segunda extracción con 5 mL del mismo solvente realizando la misma operación anterior. Por último, se lavó el filtro con 8 mL de cloroformo y se incorporaron al matraz. Se completó volumen con cloroformo y se homogenizó.

Validación del método analítico

De acuerdo con las metodologías descritas [2-5] se desarrollaron los ensayos de especificidad, robustez, estabilidad de las muestras, linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia) para determinar las tolerancias del método para cada analito de interés. En este estudio fue empleado el lote 6003 de solución antiséptica.

Selectividad. Se comprobó si existía interferencia del placebo analizando los resultados de la muestra, el placebo y el estándar interno con el placebo, al aplicar el procedimiento analítico optimizado. No deben obtenerse señales del placebo en la zona de elusión de los analitos estudiados.

Estabilidad de las muestras. Se realizó la determinación cuantitativa de los analitos al inicio y a 2, 3, 8, 16, 23, 38 y 72 h. Se realizaron análisis durante 3 días, conservando las muestras en frascos ámbar, inyectando la misma disolución y comprobando la ausencia de productos de degradación. Luego se calculó el coeficiente de variación el cual debía ser inferior al 2%, en cuanto al valor de las concentraciones relativas de las inyecciones, como criterio de estabilidad.

Robustez. Para este ensayo se consideraron las posibles variaciones aleatorias de los parámetros como temperatura del inyector y el detector (-5 °C, para ambos), programa de temperatura: tiempo de inicio (+2 °C), tiempo final (-2 °C), velocidad del flujo (2 cm/s) y las columnas DB-WAX y Rext-WAX (Agilent, EE.UU.).

Linealidad. Se utilizó el método de patrones de referencia. Se realizaron las determinaciones correspondientes al 80, 90, 100, 110 y 120%, por quintuplicado. Se calculó, en cada caso, la relación entre la concentración y la respuesta. Luego se hizo un análisis de regresión simple por el método de los mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente las concentraciones para cada nivel estudiado y como

dependiente las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos. Se determinaron los estadígrafos de linealidad (ecuación de la recta, coeficientes de regresión, de determinación, y del factor de respuesta (CVfr%). Se ejecutó la prueba de significación estadística de la desviación estándar de la pendiente y la prueba de proporcionalidad o desviación estándar del intercepto. En ambos casos se analizaron los intervalos de confianza (IC) y la prueba t de Student. Para el primer caso el IC debe incluir el cero y mostrar diferencias estadísticas significativas en el estadígrafo inferencia, mientras que la segunda prueba el IC debe incluir la unidad y la dócima de Student no debe mostrar diferencias significativas. Además, se analizó la autocorrelación de los residuales para la pendiente con el estadígrafo Durbin-Watson.

Exactitud. Se determinaron los porcentajes de recuperación ($\%_{\text{Rec}}$), las desviaciones estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV), en cada nivel (80, 100 y 120%) y el CV_{global} para cada uno de los analitos. Se aplicó la prueba de *Cochran* para comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en la respuesta del método en los diferentes niveles de concentración y la prueba de Student en comparación del porcentaje de recuperación, 100%.

Precisión. Para desarrollar este estudio se realizaron las precisiones en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad. Se hicieron 10 determinaciones sobre el mismo material de muestra, analizando tres niveles de concentración (80, 100 y 120%). Se calculó el CV y se comparó con el criterio establecido ($\leq 2,0\%$). Las determinaciones las realizó el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

Precisión intermedia. Dos analistas evaluaron las concentraciones de 80, 100 y 120% por quintuplicado, en 3 días diferentes. Para cada caso se evaluó la media, DE y el CV. Para el procedimiento se realizaron análisis multifactoriales de las varianzas para las concentraciones de los analitos; se compararon las posibles diferencias entre los días y los analistas y se llevaron a cabo pruebas de contrastes múltiples de rangos y gráficos de medias para determinar si alguno de los factores tenía efectos estadísticamente significativos para cada caso de estudio. También se analizaron las interacciones significativas entre los factores. El método utilizado para discernir entre las medias fue el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher. Se comprobó, mediante pruebas de análisis de varianzas múltiples (Manova), si había diferencias estadísticas significativas entre los analistas que emplearon igual método, y también, los dos días en que se realizaron los análisis, para obtener resultados con un nivel de confianza del 95%.

Límites de detección (LD) y cuantificación (LC). Estos se determinaron por el procedimiento de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de

calibrado para métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco y el método de extrapolación de la curva de calibración a concentración cero. Las señales a concentración cero se obtuvieron a partir de los interceptos de las curvas de linealidad para cada analito. Se prepararon muestras a concentraciones entre 1,0 y 5,0% respecto a las concentraciones nominales. Cada nivel de concentración se corrió por triplicado, se determinaron los promedios de las áreas y las desviaciones estándar de las respuestas de los blancos (Sbl). Con estos resultados se expresaron las ecuaciones de las rectas de las respuestas del blanco (Ybl) y de las Sbl, para cada uno de los analitos. A partir de los valores de las Ybl y de las Sbl se calcularon los LD y LC teóricos.

Incertidumbre del método de análisis. Las incertidumbres específicas, combinadas y expandidas fueron determinadas a partir de los resultados de las pruebas que miden los errores aleatorios y sistemáticos, estos a su vez determinaron las variabilidades en los resultados para las cuantificaciones de los analitos de interés [30].

Aplicación del método de análisis

El método fue aplicado para las cuantificaciones de los analitos en lotes pilotos de la solución antiséptica recién elaborados. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado estimando la media y el coeficiente de variación. Los criterios de aceptación para cada uno de los analitos fueron: mentol: $40,0 \pm 4,0$ mg/100 mL; salicilato de metilo: $50,0 \pm 5,0$ mg/100 mL; timol: $60,0 \pm 6,0$ mg/100 mL y ácido benzoico: $30,0 \pm 3,0$ mg/100 mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diseño de un método capaz de cuantificar simultáneamente el mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico fue indispensable. Estos se encontraban presentes en la solución antiséptica y se optó por un método por CG sencillo y fácil de aplicar; con el uso de disolventes orgánicos disponibles y no agresivos con el material de relleno de las columnas cromatográficas de uso cotidiano. También se consideró la propiedad química que poseen los analitos de ser compuestos orgánicos hidrocarbonados fácilmente ionizados por un detector de ionización por llama.

El diseño experimental multifactorial facilitó determinar condiciones óptimas a partir de la realización de un número definido de observaciones. El establecimiento de las variables de respuestas permitió la determinación de modelos matemáticos adecuados. Los estadígrafos inferenciales, derivados de la evaluación del diseño experimental, permitieron caracterizar con un 95,0% de confianza si los modelos matemáticos eran adecuados para la predicción de los resultados. Los estadígrafos inferenciales del diseño experimental multifactorial se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estadígrafos inferenciales del diseño factorial para la determinación de las condiciones cromatográficas.

Variable respuesta	r^2	r^2 ajustado	r^2 predictivo	Precisión adecuada
Rs_MT	0,999980	0,999961	0,999917	781,436954
Rs_SM	0,999640	0,999280	0,998476	199,288232
Rs_TM	0,999974	0,999948	0,999890	559,501130
Rs_AB	0,999777	0,999554	0,999056	177,302064
As_MT	0,995050	0,990099	0,979051	39,960180
As_SM	0,997401	0,994802	0,989002	64,435524
As_TM	0,994560	0,989119	0,976978	48,805209
As_AB	0,995137	0,990274	0,979420	43,768948
N_MT	0,999870	0,999740	0,999451	398,433020
N_SM	0,999697	0,999394	0,998718	211,246983
N_TM	0,998772	0,997545	0,994805	104,245498
N_AB	0,999498	0,998995	0,997874	155,370950
Ttc	1		N/A	1,001E-307

Rs: resolución, As: asimetría, N: platos teóricos, MT: mentol, SM: salicilato de metilo, TM: timol, AB: ácido benzoico.

Los r^2 estuvieron en razonable acuerdo con los r^2 ajustados, ambos con valores superiores a 0,98 justificando menos del 2,0% de las variabilidades debidas a los errores sistemáticos y aleatorios. Los resultados de las precisiones predictivas no arrojaron resultados que difieran a los ajustados con diferencias mayores a 0,02 unidades. La precisión adecuada midió la relación señal/ruido. Al obtenerse valores superiores a 4 (según criterio de DX8) se consideraron todos los modelos matemáticos adecuados, por lo que dichos modelos pudieron ser utilizados para el estudio estadístico de los resultados del diseño multifactorial propuesto. En el caso del tiempo total de corrida de los cromatogramas con equilibrio del coeficiente de determinación igual a uno (mayor grado de ajuste), el estadístico r^2 predictivo no está definido por tener un ajuste perfecto, con variación despreciable o nula de los valores residuales en la ecuación de ajuste por mínimos cuadrados y la precisión adecuada deja de presentar valor de criterio por las mismas razones. La coincidencia, en cuanto a ajustes de las relaciones de residuales teóricos y reales, indicó la capacidad de los modelos matemáticos propuestos para explicar sus comportamientos con un grado de probabilidad superior al 0,05. Esto demuestra el alto nivel de confianza del método estadístico por ello fue empleado como predictivo

del mejor comportamiento en la toma de decisiones respecto a las condiciones cromatográficas. En la figura 1 se muestran los gráficos de rampas de las condiciones de los tratamientos seleccionados como los más deseables; los valores de los parámetros cromatográficos más probables a obtener y el valor de deseabilidad.

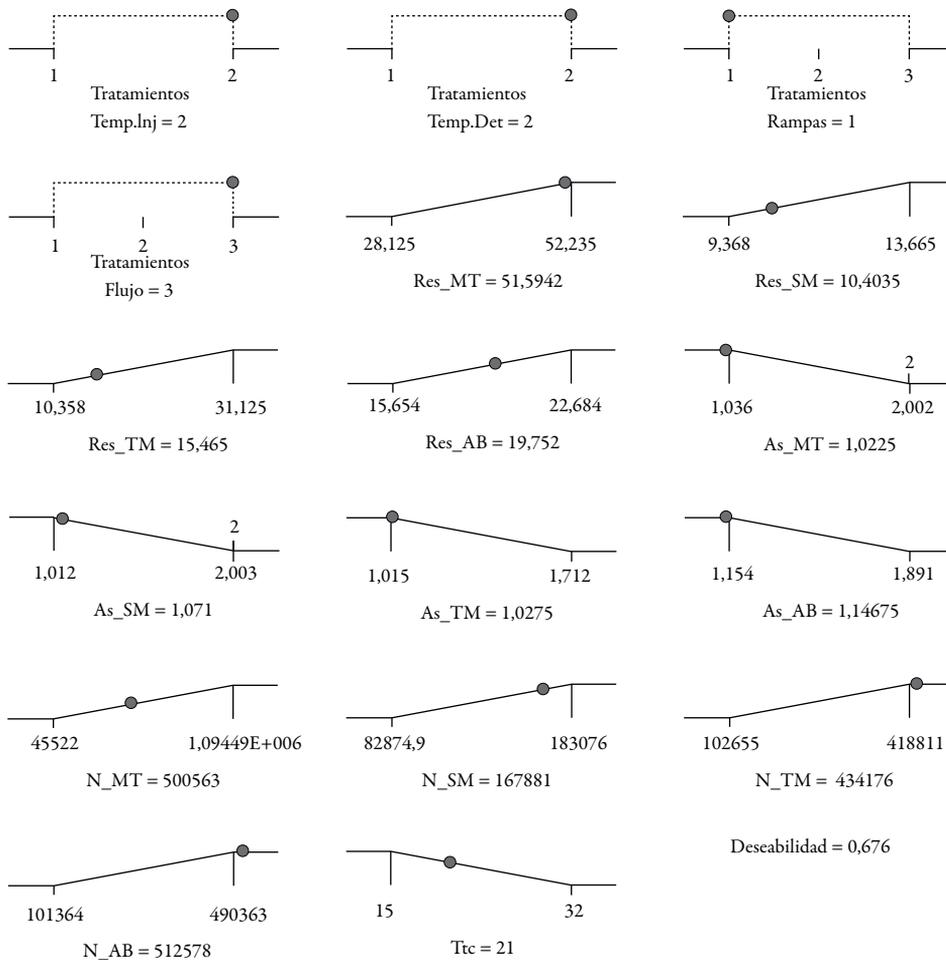


Figura 1. Gráficos de rampa del diseño multifactorial para la predicción de las condiciones cromatográficas. Rs: resolución, As: asimetría, N: platos teóricos, Tr: tiempo de retención, MT: mentol, SM: salicilato de metilo, TM: timol, AB: ácido benzoico.

Como resultado de todo lo anterior el programa sugirió 18 posibles soluciones, de las cuales la primera resultó ser la de mejor deseabilidad con un 67,6% de probabilidad de ejecutarse satisfactoriamente. La corrida propuesta coincidió con la número 10, estándar 53, del diseño experimental factorial propuesto. Los valores predichos difieren

muy poco de los valores reales obtenidos. La comparación de los resultados se puede verificar en la tabla 2, que se incluye el porcentaje de coincidencia obtenido por la relación de los valores. Los valores más altos se obtuvieron en aquellas medidas en que el valor numérico fue más pequeño, por lo que se esperaban resultados superiores. Sin embargo, no superan el 3% de variabilidad, por lo que las predicciones se consideran acertadas.

Tabla 2. Comparación de resultados entre las condiciones reales y predictivas del sistema cromatográfico propuesto.

	Rs/ MT	Rs/ SM	Rs/ TM	Rs/ AB	As/ MT	As/ SM	As/ TM	As/ AB	N/ MT	N/ SM	N/ TM	N/ AB
Valor real	50,62	10,48	15,31	20,21	1,12	1,18	1,09	1,22	110008	167357	418811	490363
Valor predicho	50,62	10,47	15,35	20,24	1,15	1,18	1,07	1,26	110008	167357	418811	490363
Porcentaje de coincidencia	100,00	99,95	100,22	100,17	102,67	100,16	98,16	102,85	99,99	99,99	100,00	99,99

Rs: resolución, As: asimetría, N: platos teóricos, MT: mentol, SM: salicilato de metilo, TM: timol, AB: ácido benzoico.

Los parámetros cromatográficos como tiempo de retención (T_r), asimetría (A_s), resolución (R_s) y platos teóricos (N) se muestran en la tabla 3. La resolución se refiere a la medida de separación entre los picos de interés respecto a la línea base. Los platos teóricos es una función de la eficiencia de la columna y es específicamente para asegurar que los compuestos que eluyan estén resueltos uno del otro, para establecer el poder separativo del sistema. Un pico es considerado resuelto cuando el valor de R es mayor que 2,0 [5]; mientras que una columna es eficiente cuando N es mayor que 2000 (se entiende por eficiencia de una columna cuando más interactúan los componentes de una muestra en análisis con la fase estacionaria lográndose una mayor retención y resolución de los analitos). La asimetría indica la aproximación de la curva a la campana gaussiana, debido a efectos intra y extracolumnares en el proceso separativo; la unidad para picos simétricamente perfectos y su valor varía a medida que el *fronting* o el *tailing* del pico se hacen más pronunciadas. Un pico se considera simétrico cuando su valor está por debajo de 2,0 y cercano a 1,0 [5].

A partir del análisis de los resultados del diseño experimental se fijaron las siguientes condiciones de trabajo: columna DB-WAX de 30 m de longitud, 0,32 mm DI y 0,25 μm ; flujo: 70 cm/s; gas transportador: hidrógeno; temperatura inyector: 250 °C; temperatura detector de ionización de llama: 250 °C; programa de temperatura: temperatura

Tabla 3. Parámetros cromatográficos obtenidos con el sistema seleccionado.

Parámetro cromatográfico	Mentol	Salicilato de metilo	Timol	Ácido benzoico
Tr (min)	9,54	11,973	17,867	21,065
As	1,098	1,043	1,018	1,113
Rs	54,876	39,912	51,762	42,658
N	1676447,45	2333620,51	2545695,58	3025563,27

Rs: resolución, As: asimetría, N: platos teóricos, Tr: tiempo de retención.

inicial de 60 °C por 5 min, incrementándose hasta 220 °C a razón de 12 °C/min y temperatura final de 220 °C mantenida por 3 min; tiempo de corrida: 25 min; modo de división de la muestra (Split): 1:5, flujo detector H₂ y aire 50 m/L y 480 m/L, respectivamente, y volumen de inyección: 1 µL.

Validación del método seleccionado

En la figura 2 se muestran los cromatogramas de la muestra, el placebo y el estándar interno con el placebo obtenidos durante la comprobación del parámetro de la especificidad del método. Al observar los cromatogramas se evidenció que no existen interferencias por parte de los analitos ni de los excipientes presentes en la formulación, por tanto, se considera que el método es específico y aplicable al control de calidad del producto terminado.

En los laboratorios de control de calidad que analizan grandes volúmenes de producción es necesario incluir varias muestras de lotes de un mismo producto para hacer los ensayos de cuantificación, lo que algunas veces prolonga el tiempo de análisis. Después de diluidas se evaluó la estabilidad para comprobar el periodo de tiempo durante el cual las muestras mantenían su concentración sin variación.

La tabla 4 muestra los resultados del estudio de estabilidad de las muestras en el cual se comprobó que las mismas fueron estables durante 3 días después de su preparación. El coeficiente de variación mayor, obtenido para el MT, no excedió del 0,26%. En todos los casos los resultados estuvieron por debajo del criterio de aceptación y cumplieron para los cuatro analitos con valores de CV < 2,0%. Se puede considerar que las muestras fueron estables durante ese periodo.

En la tabla 5 se resumen los resultados del ensayo de robustez. Los resultados estadísticos mostraron que la variación de los parámetros cromatográficos fue muy pequeña, siendo menores que el valor asignado como criterio de aceptación. Esto confirma que

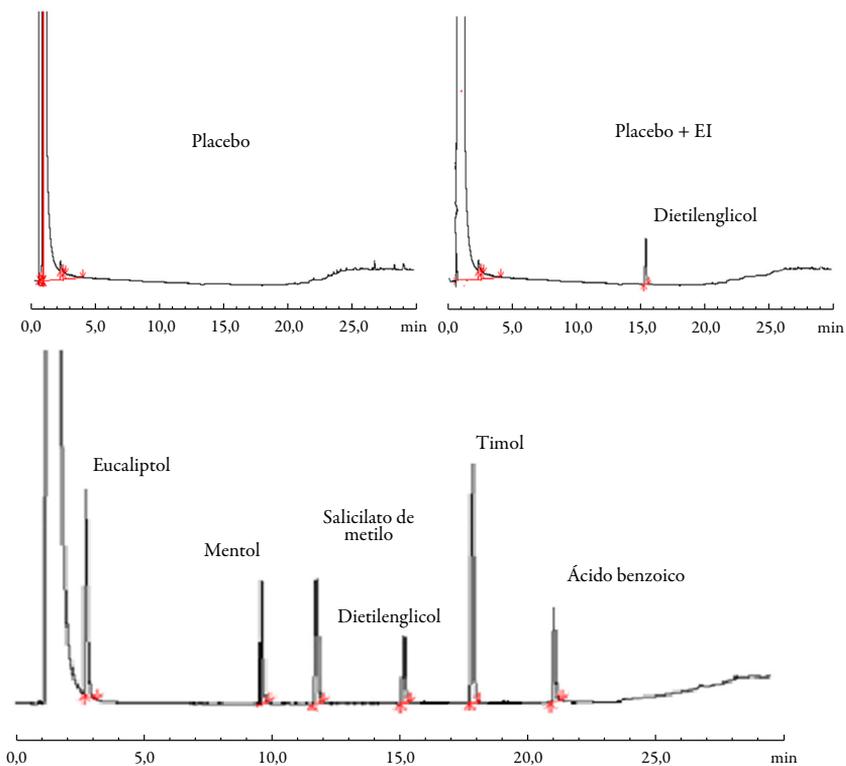


Figura 2. Selectividad del método. EI: estándar interno.

Tabla 4. Concentración de los cuatro analitos en el estudio de estabilidad de las muestras.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)			
	Mentol	Salicilato de metilo	Timol	Ácido benzoico
0	41,215	50,650	59,091	31,345
2	41,163	50,564	58,789	31,369
3	41,011	50,542	58,991	31,402
8	41,055	50,551	58,987	31,389
16	40,996	50,563	58,878	31,423
23	41,014	50,490	59,003	31,431
38	41,016	50,548	59,025	31,509
72	40,871	50,456	59,012	31,374
Media (mg/mL)	41,043	50,546	58,972	31,405
DS	0,1059	0,0570	0,0944	0,0506
CV (%)	0,2580	0,1127	0,1602	0,1612

los resultados obtenidos se mantuvieron dentro de los valores permisibles y que las variaciones en el método cromatográfico no influyeron en la calidad de los resultados, por lo que el método propuesto se consideró robusto.

Tabla 5. Robustez del método.

Analito	Parámetro								Srob
	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	
MT	98,55	97,95	98,19	97,60	98,30	99,21	99,21	97,98	0,871
	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	$V \leq SR\sqrt{2}$	
	0,603	0,260	0,380	0,096	0,216	0,531	0,536	1,231	
SM	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	1,486
	97,50	98,08	97,28	98,59	98,45	98,72	98,69	99,02	
	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	$V \leq SR\sqrt{2}$	
	0,857	0,208	0,624	0,058	0,323	0,197	0,169	2,101	
TM	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	1,075
	108,54	108,27	107,84	107,03	107,85	108,43	108,24	109,32	
	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	$V \leq SR\sqrt{2}$	
	0,537	0,164	0,146	0,804	0,687	0,008	0,256	1,520	
AB	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	1,071
	99,27	98,44	98,86	99,62	99,03	98,29	98,12	98,47	
	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	$V \leq SR\sqrt{2}$	
	0,571	0,012	0,113	0,374	0,076	0,675	0,127	1,514	

s, t, u, v, w, x, y, z: concentraciones (%); VA, VB...VG: variabilidades calculadas, según procedimiento. MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico; S: desviación típica.

En la tabla 6 se observan los resultados estadísticos de la prueba de linealidad del método. Existieron fuertes relaciones seriadas entre las variables dependientes (Y, área bajo la curva) y las independientes (X, concentración) dado que los coeficientes de correlación presentaron valores superiores al 99,0% y los coeficientes de determinación mayores del 98,0%. El grado de ajuste o sensibilidad se demostró, además, por los valores de los coeficientes de los factores de respuestas (CVfr), que para todos los analitos fueron menores del 5,0% y la existencia de relaciones seriadas avaladas por el análisis de las varianzas de las regresiones con valores de probabilidades inferiores al 0,05. Los valores de probabilidades superiores al 0,05 de los estadígrafos de Durvin-Watson no mostraron indicios de una autocorrelación serial en los residuos, con un nivel de

confianza del 95,0%. Al aplicar la prueba t de Student se demostró la existencia de una relación estadísticamente significativa, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ fue muy elevada, superior al 99,9%. En el análisis estadístico de los interceptos, con las dójimas t de Student, se demostró que no existieron diferencias entre las medias de los residuales a cada nivel, para cada uno de los analitos estudiados. Además, los intervalos de confianza incluyen al cero, lo que indica que la probabilidad de que $a=0$ es muy elevada. En la figura 3 se observan las curvas de linealidad por el método de ajuste de los mínimos cuadrados. Todos los puntos a los distintos niveles se encuentran dentro de los límites de confianza y predicción, demostrando que en los cuatros casos el método de cuantificación se ajusta al modelo propuesto.

Tabla 6. Resultados estadísticos de la prueba de linealidad del método analítico.

Parámetro	Resultado				Límite
	MT	SM	TM	AB	
Ecuación de la recta	25,352X+ 0,00	17,602X-0,00	35,722X-0,00	11,788X+0,00	Y= bx+a
r	0,997	0,991	0,999	0,995	≥ 0,990
r ²	0,993	0,981	0,997	0,989	≥ 0,980
CVfr (%)	1,186	1,958	3,529	1,486	≤ 5,0%
Significación estadística de la pendiente					
Residuo Durwin Watson (DW)	DW =1,681 p = 0,15	DW =2,185 p =0,60	DW =3,18 p =0,99	DW =2,04 p =0,45	p > 0,05
t tab (t n-2, p-valor=0,05) = 2,160	t exp = 57,46	t exp = 34,84	t exp = 91,83	t exp = 45,96	t exp > t tab
Ensayo de proporcionalidad					
t tab (t n-2, p-valor=0,05) = 2,160	t exp = 0,000	t exp = -0,006	t exp = -0,017	t exp = 0,013	t exp < t tab
Intervalo de confianza de la pendiente IC=a ± t·Sa	-0,074 a 0,07	-0,106 a 0,11	0,034 a 0,56	-0,053 a 0,05	Debe incluir el cero

Coefficientes de correlación (r); coeficientes de determinación (r²); coeficiente de variación del factor de respuesta (CVfr).

t (t n-2, p-valor=0,05)= 2,160.

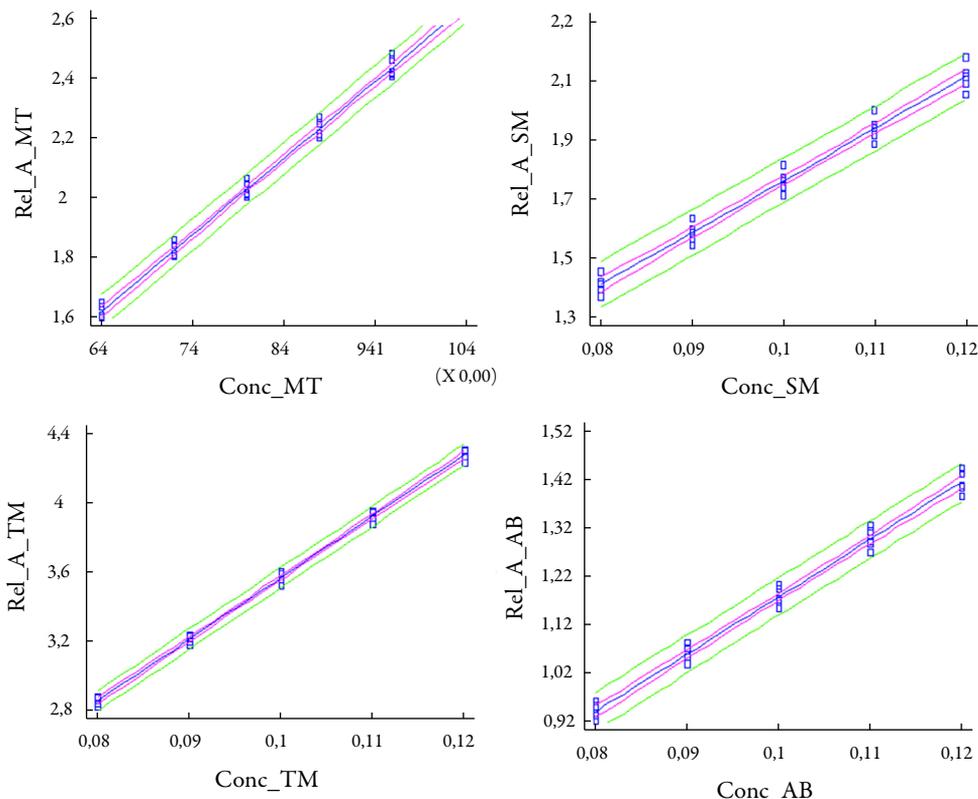


Figura 3. Curva de calibración de la linealidad. MT: mentol, SM: salicilato de metilo, TM: timol, AB: ácido benzoico.

Para el rango seleccionado en el estudio los porcentajes de recobro estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98,0-102,0%) y el valor del coeficiente de variación, fue menor que el 2,0% (tabla 7). En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud, al aplicar la prueba de Cochran, se obtuvieron valores de C calculada menores que la C tabulada para una probabilidad de 0,05, $p=3$ y $n=5$; por tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas fueron equivalentes, indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de los resultados, en el rango estudiado. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación, las medias y el 100% de recuperación, se obtuvieron valores de t de Student menores que el valor tabulado, confirmando la elevada exactitud del método ya que el recobrado medio no difiere significativamente del 100%. Teniendo en cuenta estos resultados puede afirmarse que los errores sistemáticos tuvieron muy bajo impacto en la calidad de los resultados y que

al cumplir con los indicadores establecidos para un método cromatográfico, el mismo puede ser utilizado para el fin propuesto. Estos resultados demuestran que el método permite determinar con exactitud los analitos, en el intervalo de 80 a 120% en las condiciones de trabajo estudiadas.

Tabla 7. Exactitud del método analítico.

Parámetro	Nivel (%)	MT	SM	TM	AB
R (%)	80	99,99	99,98	99,99	99,99
	100	100,00	100,00	99,99	99,97
	120	99,999	99,99	99,99	99,99
S	80	0,741	1,034	0,818	0,613
	100	0,739	1,04	0,821	0,602
	120	0,752	1,048	0,832	0,597
S ²	80	0,549	1,068	0,669	0,375
	100	0,546	1,082	0,674	0,363
	120	0,566	1,099	0,692	0,356
CV (%)	80	0,741	1,034	0,818	0,613
	100	0,739	1,04	0,821	0,603
	120	0,712	1,037	0,819	0,597
C _{cal} C _{tab} (0,05;5;3) = 0,746		0,351	0,34	0,335	0,349
t _{cal} t _{tab} (0,05;14) = 2,145		0,036	0,021	0,018	0,02
R (%)		99,99	99,99	99,99	99,98
S _{Global}		0,689	0,963	0,763	0,559

MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico; R: recobrado; CV: coeficiente de variación.

Se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1,0% al evaluar la precisión en condiciones de repetitividad (tabla 8), en los tres niveles de concentración, para los cuatros analitos. Este valor concuerda con lo expresado como criterio de aceptación (< 2,0%). El análisis de varianza mostró un valor del test de Levene's igual a 0,403 que corresponde a un valor de probabilidad igual a 0,755; indicando que no existen diferencias estadísticas significativas entre las varianzas para los tres niveles de concentración evaluados por lo que se puede considerar que existe homocedasticidad.

Tabla 8. Precisión del método.

Analito	Nivel (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Valor de p
MT	80	32,158	0,725	$P_{\text{analista}} = 0,9980$ $p_{\text{día}} = 1,0000$
	100	40,204	0,733	
	120	48,259	0,745	
SM	80	40,235	1,052	$P_{\text{analista}} = 0,9988$ $p_{\text{día}} = 1,0000$
	100	50,294	1,041	
	120	60,373	1,055	
TM	80	48,377	0,830	$P_{\text{analista}} = 0,9988$ $p_{\text{día}} = 1,0000$
	100	60,469	0,825	
	120	72,581	0,831	
AB	80	24,441	0,566	$P_{\text{analista}} = 0,9997$ $p_{\text{día}} = 1,0000$
	100	30,554	0,596	
	120	36,666	0,597	
Levene's = 0,403 p = 0,7549				

MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico; valor de p: valor de probabilidad.

La figura 4 muestra los gráficos de medias para la precisión intermedia del método. Los gráficos de bigote indican la homogeneidad de las varianzas entre las distintas mediciones comparadas en los factores analizados evidenciando, la similitud de los resultados entre los analistas y en diferentes días. En la tabla 8 se resumen los valores de probabilidades obtenidos por los dos analistas y los tres días estudiados, evidenciando que no existen diferencias estadísticas significativas para un 95,0% de probabilidad. Estos coeficientes indican baja variabilidad por lo que el proceso de cuantificación, los analistas involucrados en el estudio fueron lo suficientemente precisos y las condiciones de trabajos bien controladas. Por lo que se considera que el método fue preciso asegurando que los errores aleatorios no causaron impacto significativo sobre los resultados en las condiciones antes mencionadas.

Los resultados de la determinación de los límites de detección y cuantificación para el MT, SM, TM y AB se observan en la tabla 9. Las curvas de calibración para la determinación de las respuestas y desviación estándar de los blancos mostraron ajustes adecuados con coeficientes de determinación que justificaron más del 98,0% de las variabilidades de los resultados. Con estos resultados se calcularon los valores de Y_{bl} y S_{bl} para la determinación de los LD y LC. Estos valores fueron comprobados experimentalmente obteniendo buenos resultados.

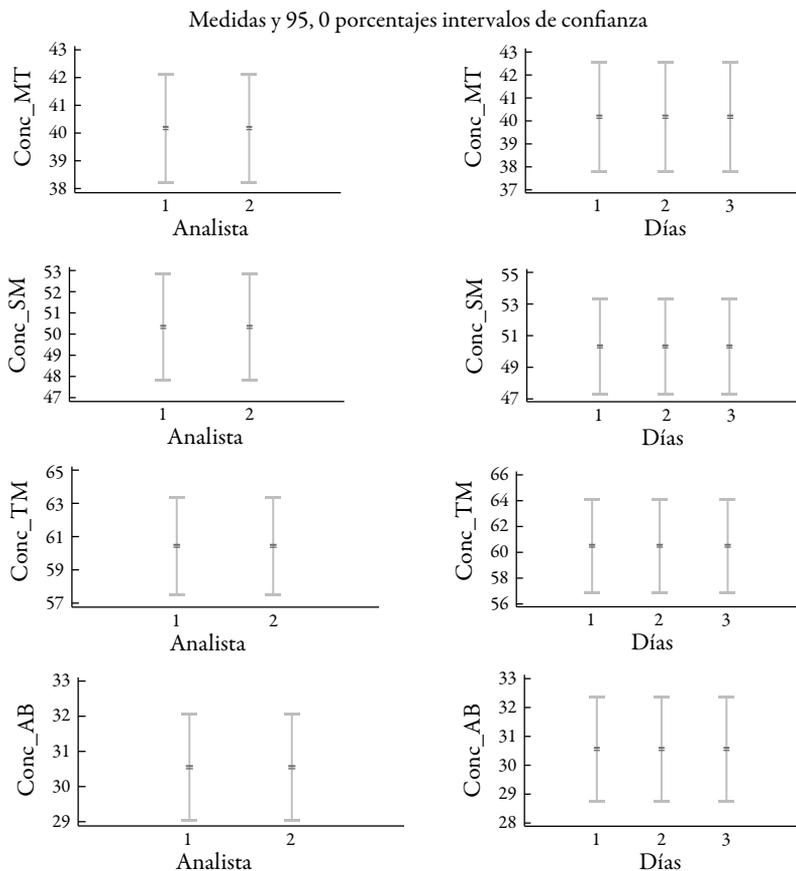


Figura 4. Gráficos de medias para la precisión intermedia del método, según la influencia de los analistas y días. MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico.

Tabla 9. Límites de detección y cuantificación del método.

Parámetro cromatográfico	MT	SM	TM	AB
Ecuación de la recta (Y blanco)	26,12 X-0,00	18,18 X-0,00	30,02 X+0,00	59,84 X-0,00
Ecuación de la recta (S blanco)	0,53 X-0,00	0,04 X+0,00	0,53 X+0,00	0,03 X+0,00
r ² (%)	99,90	100,00	99,99	100,00
Límite de detección (ng/mL)	0,513	1,184	3,348	1,402
Límite de cuantificación (ng/mL)	1,459	3,438	9,734	4,363

MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico.

El conjunto de los resultados mostrados permite afirmar que el método por cromatografía gaseosa para la determinación de salicilato de metilo, timol, mentol y ácido

benzoico es lineal, preciso, exacto, selectivo y robusto en el intervalo de 80 a 120% de concentración, por lo que podría ser empleado para el control de calidad de la solución antiséptica.

La tabla 10 resume los valores determinados de las incertidumbres específicas para cada uno de los analitos en cuestión. Los valores demuestran la poca influencia de los errores aleatorios y sistemáticos sobre los resultados en el proceso de cuantificación. Por tanto, hay aproximadamente un 95,0% de probabilidad de que las concentraciones verdaderas de MT, SM, TM y AB, en muestras de rutina, estén contenidas dentro del intervalo proporcionado por la concentración obtenida al analizar la muestra y su incertidumbre asociada.

Tabla 10. Incertidumbres del método cromatográfico desarrollado.

Parámetro	MT	SM	TM	AB
Incertidumbre específica del ensayo de exactitud	± 0,689	± 0,963	± 0,763	± 0,559
Incertidumbre específica del ensayo de precisión intermedia	± 0,101	± 0,180	± 0,167	± 0,064
Incertidumbre combinada (gl= 43)	0,034	0,041	0,037	0,031
Incertidumbre expandida $t(0,05, g.l.)= 2,017$	± 0,069	± 0,082	± 0,074	± 0,062

MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico; gl: grados de libertad.

Los resultados de la cuantificación de las concentraciones de los analitos de interés en lotes pilotos, recién elaborados, de la solución antiséptica se resumen en la tabla 11. Estos pueden considerarse adecuados al obtenerse una repetibilidad dentro de los valores aceptados con coeficientes de variación inferiores al 2,0%.

Tabla 11. Cuantificación de los analitos de interés en la solución antiséptica con el método cromatográfico propuesto.

Lote	Parámetro	MT	SM	TM	AB
6001	Media (mg/100 mL)	40,20	50,29	60,47	30,55
	CV (%)	0,74	1,04	0,82	0,60
6002	Media (mg/100 mL)	40,21	50,52	60,15	30,16
	CV (%)	0,75	1,27	1,08	1,29
6003	Media (mg/100 mL)	40,42	50,03	60,19	30,45
	CV (%)	1,27	1,44	1,12	0,75

MT: mentol; SM: salicilato de metilo; TM: timol; AB: ácido benzoico; CV: coeficiente de variación.

CONCLUSIONES

Un método de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama fue desarrollado y validado para la cuantificación simultánea de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico. El método demostró ser confiable en cada criterio analítico evaluado, por lo que puede ser empleado para el control de calidad del producto terminado. El procedimiento y el sistema empleado en el estudio permitieron la determinación simultánea de los cuatro analitos en un tiempo de 25 min. Finalmente, la aplicación del método fue demostrada satisfactoriamente al analizar lotes pilotos de la solución antiséptica.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. H. Phatak, V. Vaidya, A rapid gas chromatography-mass spectroscopy method for simultaneous quantification of ornidazole and miconazole from cream formulations: development, validation and application, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **7**(7), 2976-2983 (2016).
2. Anexo I: Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos, en: *Validación de Métodos Analíticos, Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos* (CECMED), Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2013, p. 4-25.
3. Regulación 41-2013, *Validación de métodos analíticos*, Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2013, p. 4.
4. Regulación No. 40, *Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos*, Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2014, p. 3-25.
5. *USP 38*, The United States Pharmacopeia, Official Monographs, Baltimore, Maryland, USA, 2015, p. 6236-6237.
6. Lj. Karuza, K. Folivarski, Validation of the assay method for camphor and menthol in a herbal drug preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 419-422 (1996).

7. J.S. Valdez, D.K. Martin, M. Mayersohn, Sensitive and selective gas chromatographic methods for the quantitation of camphor, menthol and methyl salicylate from human plasma, *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **729**(1-2), 163-171 (1999).
8. E. González-Peñas, M. López-Alvarez, F. Martínez de Narvajás, A. Ursúa, Simultaneous GC determination of turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate in a topical analgesic formulation (Dologex[®]), *Chromatographia*, **52**(3-4), 245-248 (2000).
9. J. Krzek, J.S. Czekaj, W. Rzeszutko, Validation of a method for simultaneous determination of menthol and methyl salicylate in pharmaceuticals by capillary gas chromatography with cool on-column injection, *Acta Pol. Pharm.*, **60**(5), 343-349 (2003).
10. J. Fiori, M. Naldi, R. Gotti, HS-SPME-GC-MS for the quantitation and chiral characterization of camphor and menthol in creams, *Chromatographia*, **72**, 941-947 (2010).
11. L.I. Yan-chao, L.I. Yi-xian, Y.A.O. Ling-wen, L.I. Zhen-guo, GC simultaneous determination of camphor, menthol and synthetic borneol in Tongluo Qutong plaster, *Chin. J. Pharm. Anal.*, **32**(4), 672-675 (2012).
12. R.S. Swati, Antidermatophytic activity and gas chromatography of essential oils, *Am. J. Phytomed. Clin. Therap.*, **2**(3), 430-441 (2014).
13. J.S. Rucha, A.I. Patel, K.V. Vikani, N.L. Patel, Analytical method development and validation of pain relief herbal formulations, *Indo Am. J. Pharm. Res.*, **6**(4), 5112-5117 (2016).
14. R. Kalgutkar, K. Ramakrishna, V. Srinivasarao, Method development and validation of menthol in cough syrup by gas chromatography, *Anal. Chem.: An Indian J.*, **16**(1), 001-006 (2016). ISSN: 0974-7419
15. N.A.M. Adib, U.K. Mandal, F. Mohamed, B. Chatterjee, Fast and simple gas chromatographic method for simultaneous estimation of camphor, menthol and ethyl salicylate in analgesic ointment: application in stability study, *J. Pharm. Invest.*, **47**(3), 275-285 (2017).
16. M.N. Abualhasan, A.N. Zaid, N. Jaradat, A. Mousa, GC Method validation for the analysis of menthol in suppository pharmaceutical dosage form, *Int. J. Anal. Chem.*, **2017**, Article ID 1728414, 1-5 (2017).

17. M. Hatipi-Ibrahimi, V. Papajani, S. Ćavar, V. Matevski, GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus Longicaulis* Presl. from Kosovo, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, **41**, 6-10 (2013).
18. N. Saini, G.K. Singh, Gas chromatographic validated method for quantification of ayurvedic polyherbal formulation, *Asian J. Pharm.*, **9**, 200-205 (2015).
19. B.O. Louchard, L.C. Costa, A.R.A. Silva, L.K.A.M. Leal, Validation of a high performance liquid chromatography method to quantify thymol in nanocapsules of bioactive essential oil from *Lippia sidoides*, *Int. J. Complement. Alt. Med.*, **10**(2), 00330 (2017).
20. M. Heinänen, C. Barbas, Validation of an HPLC method for the quantification of ambroxol hydrochloride and benzoic acid in syrup as pharmaceutical form stress test for stability evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**(5-6), 1005-1010 (2001).
21. D. Satínský, J. Huclová, R.L. Ferreira, M.C. Montenegro, P. Solich, Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**, 287-293 (2006).
22. M. Haider, Development and validation of a stability indicating HPLC method for the estimation of butamirate citrate and benzoic acid in pharmaceutical products, *J. Chromatogr. Separ. Tech.*, **2**(2), 1000111 (2010).
23. L.A. Melikyan, S.S. Martirosyan, R.S. Grigoryan, H.V. Topchyan, T.K. Davtyan, Development and validation of HPLC method for the determination of metronidazole benzoate and related impurities in bulk and pharmaceutical formulations, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **4**(7), 2594-2599 (2013).
24. H. Rouhollah, M. Masoumeh, Simultaneous determination of saccharine, caffeine, salicylic acid and benzoic acid in different matrixes by salt and air-assisted homogeneous liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Chil. Chem. Soc.*, **61**(3), 3090-3094 (2016).
25. D.R. Sahoo, S. Jain, A rapid and validated RP-HPLC method for the simultaneous quantification of benzoic acid, metronidazole and miconazole nitrate in vaginal formulations, *J. Chromatogr. Sci.*, **54**(9), 1613-1618 (2016).
26. S. Kumaravel, P. Shanmugapandiyar, New validated stability indicating gradient RP-HPLC method for the assay & related substances of miconazole nitrate and assay of benzoic acid in miconazole nitrate 2.0% w/w gel, *Int. J. Pharma-Bio Sci.*, **8**(2), 308-312 (2017).

27. L.A. Martínez, J.A. Martínez, Y. Baena, Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejado, en un ensayo de permeación transdérmica *in vitro* empleando piel de cerdo, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 424-440 (2018).
28. J. Pauwels, W. D'Autry, L. Van den Bossche, C. Dewever, M. Forier, S. Vandewaeyenberg, *et al.*, Optimization and validation of liquid chromatography and headspace-gas chromatography based methods for the quantitative determination of capsaicinoids salicylic acid, glycol monosalicylate, methyl salicylate, ethyl salicylate, camphor and l-menthol in a topical ointment, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **60**, 51-58 (2012).
29. H. Zhi-hong, W. Zhi-li, S. Bao-lin, W. Dong, C. Jian-xin, W. Su-li, G. Bao-jia, Simultaneous determination of salicylic acid, jasmonic acid, methyl salicylate, and methyl Jasmonate from *Ulmus pumila* leaves by GC-MS, *Int. J. Anal. Chem.*, **2015**, 698630 (2015).
30. S. Bell, *A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement*, National Physical Laboratory, Teddington, UK, 1999.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A. Fonseca-Gola, J.M. Cordoví-Velázquez, N. Benítez-Guerra, M. Fernández-Cervera, Desarrollo y validación de un método de cromatografía gaseosa para la determinación de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(2), 306-328 (2020).