DETERMINACIÓN DE 2,4 D MÉTODO QuPPe POR LC MS-MS

ELABORADO POR:	VERIFICADO POR:	VISTO BUENO DE:
Nombre y Apellido: Lic. Leyla Díaz Lic. Laura Lezcano	**Nombre y Apellido:** Lic. Olga Pavón	**Nombre y Apellido:** Ing. Agr. Carmen Berni
Cargo: Jefa Técnico Departamento de Laboratorio Químicos (DLQ)	**Cargo:** Directora Dirección de Laboratorios (DL)	**Cargo:** Directora General Dirección General Técnica (DGT)
Firma: **Fecha:**	**Firma:** **Fecha:**	**Firma:** **Fecha:** 05/10/26

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento analítico para determinar residuos de plaguicidas polares, incluido el 2,4-D, en hojas mediante el método QuPPe y su cuantificación por LC-MS/MS.

2. ALCANCE

Aplica al análisis de muestras de hojas comestibles y no comestibles, así como cereales, frutas y vegetales procesados en el laboratorio, desde la preparación de la muestra, el análisis instrumental por LC-MS/MS, hasta la emisión del resultado.

3. DOCUMENTO DE REFERENCIA

3.1 Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination (QuPPe-Method) Version V 3.1 (Mayo 2019, Document History, see page 434) Authors: M. Anastassiades; D. I. Kolberg; D. Mack; C. Wildgrube; I. Sigalov; D. Dörk Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019).

4. SIGLAS

4.1 siglas:

4.1.1 **mg/kg y mg/L**: Es el equivalente a ppm.

4.1.2 **LRCV**: Laboratorio de Residuos y Contaminantes en Productos y Subproductos Vegetales.

4.1.3 **LC-MS/MS:** Cromatografía Líquida con detector de Masa/Masa.

4.1.4 **QuPPe:** Método rápido de plaguicidas polares

5. RESPONSABLE

El Departamento de Laboratorios Químicos es responsable de asegurar la correcta implementación del procedimiento. Los técnicos del área deben ejecutar cada etapa del método, registrar la información en los formularios correspondientes y garantizar el cumplimiento de los lineamientos técnicos establecidos.

6. ACTIVIDADES

Se describen los equipos y materiales a emplear en el ensayo:

6.1 Equipos:

a) Cromatógrafo Líquido con detector de Masa/Masa

b) Agitador Vortex

c) Baño Ultrasónico

d) Balanza analítica

e) Desionizador ultrapuro

f) Balanza granataria

6.2 Materiales:

a) Espátula de metal

b) Matraz de vidrio con tapa de 10 ml

c) Jeringa de 5ml

d) Matraces vidrio con tapa de 100mL

e) Probeta de vidrio de 100 ml

f) Pipeta automática o micropipeta 100 a 1000µl

g) Vasos de precipitado 100 ml

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lsc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

h) Viales de vidrio con tapa de 2 ml

i) Tubos de plástico con tapa de 50 ml

j) Filtro minisart 0,2 µm

6.3 Reactivos:

a) Material de referencia certificado

b) Acetona grado HPLC

c) Acetona p.a

d) Acetonitrilo grado HPLC

e) Acido acetico p.a

f) Metanol grado HPLC

g) Agua grado HPLC

h) Acetato de amonio p.a

6.4 Desarrollo del ensayo:

6.4.1 Preparación de la solución del estándar:

a) Solución madre

Pesar el material de referencia certificado para preparar una solución madre de concentración 1000mg/L, utilizando como disolvente metanol.

Para principios activos cuyo solvente de dilución sea diferente al metanol ver ficha del material de referencia certificado, etiquetar con el FOR-DLQ-013 Etiqueta de Preparación de Soluciones. Mantener refrigerado entre 2 a 8 ºC. El vencimiento de las soluciones madres es de 1 año.

Los datos se registran en el cuaderno de ensayos de laboratorio LRCV, Código FOR-DLQ-040.

b) Soluciones de Trabajo.

Se prepara partir de la solución madre 1000mg/L tomando un volumen adecuado para obtener una concentración aproximadamente 10 mg/L, utilizando como disolvente metanol, etiquetar con el FOR-DLQ-013 Etiqueta de Preparación de Soluciones.

Se guarda a temperatura inferior a 10ºC y tiene una validez máxima de 6 meses, y solo se puede utilizar dentro del periodo de validez de la Solución madre.

Los datos se registran en el cuaderno de ensayos de laboratorio LRCV, Código FOR-DLQ-040.

c) Niveles

Se prepara cinco concentraciones que incluyan el valor de LMR del plaguicida en la matriz, dos puntos por arriba y dos puntos por debajo, se utiliza metanol como solvente, agitar y etiquetar con el FOR-DLQ-013 Etiqueta de Preparación de Soluciones.

Se guarda a temperatura inferior a 10 °C y tiene una validez máxima de 3 meses, y solo se pueden utilizar dentro del periodo de validez de la Solución madre.

Los datos se registran en el cuaderno de ensayos de laboratorio LRCV, Código FOR-DLQ-040.

6.4.2 Preparación de la muestras a ser ensayadas

6.4.2.1 Procesamiento

Las muestras no se lavan para su procesamiento.

Procesar uniformemente las muestras con la licuadora.

6.4.2.2 Extracción:

a) Pesar 5 gramos de muestra molida en un tubo de centrifuga, adicionar 10ml de agua.

b) Adicionar 10ml de metanol acidificado al 1% con ácido fórmico.

c) Agitar un minuto.

d) Sonicar por 10minutos

e) Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.

f) Filtrar el sobrenadante con filtro minisart de 0,2µm

g) Inyectar en el LC MSMS

6.4.3 Preparación de curva matriz y Fortificado

Se preparan niveles para una curva de calibración a partir de una solución mix, para ello se realizan fortificaciones a muestras blanco.

Para fortificar una muestra se elige un nivel de la curva y se fortifica con una solución mix, preparando el fortificado de la misma manera que la muestra.

6.5. Condiciones cromatográficas:

6.5.1 Cromatógrafo Líquido LC- MS

a) Columna: C18 x 2.1 mm X 150mm. Tamaño de partícula: 5µm.

b) Temperatura de columna: 40 ° C.

c) Flujo: 0,2 ml/min.

d) Fase Móvil A: Solución acuosa de acetato de amonio 5 mmol/L

e) Fase Móvil B: Solución de acetato de amonio en metanol 5 mmol/L

6.5.2 Gradiente : la solución tanto A como B según la pendiente de concentración mencionada en la tabla que se encuentra abajo

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	85	15
1	60	40
3,5	60	40
6	50	50
8	45	55
17,5	5	95
20	5	95

6.4.3 Preparación de la fase móvil

a) Solución acuosa de acetato de amonio 5 mmol/L (solución A de la fase móvil) Tomar 1 mL de la solución acuosa de acetato de amonio 5 mol/L (38,5 g/100 mL) (conservada en refrigeración) y agregar agua para obtener 1L de la solución (conservarla en refrigeración y el plazo de uso es de 1 mes).

b) Solución de metanol/acetato de amonio 5 mmol/L (solución B de la fase móvil) Tomar 2 mL de la solución de metanol/acetato de amonio 2,5 mol/L (19,3 g/100 mL) (conservada en refrigeración) y agregar metanol para obtener 1L de la solución (conservarla en refrigeración y el plazo de uso es de 1 mes).

Lic. Olga Pavón
SENAVE

MSc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

6.5 Cálculos:

Después de elaborar la curva de calibración con diferentes concentraciones apropiadas que incluyan el límite de cuantificación, por medio del método de altura de pico o método de área de pico, llevar a cabo la cuantificación.

Establecer una curva de calibración apropiada según el valor de la detección y la linealidad de la curva.

La concentración de plaguicida en la muestra se obtiene directamente en el software comparando la señal de la muestra con la curva de calibración.

a) Porcentaje de Recuperación

$$\% R = \frac{\text{(Plaguicida en muestra)}}{\text{(Plaguicida agregado)}} \times 100$$

Notas: Los resultados se expresan en mg/kg, con 2 dígitos después de la coma.

7. CONTROL DE CAMBIOS

Item	Página	Cambios

8. DOCUMENTOS

Nombre del Documento	Código	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición Final
Protocolo de trabajo LRCV	FOR-DLQ-014	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación
Preparación de Soluciones	FOR-DLQ-013	Sala de Estándar	Técnicos	5 años	Eliminación
Cuaderno de Laboratorio LRCV	FOR-DLQ-040	Sala de Equipos	Técnicos	5 años	Eliminación
Planilla de Uso del LCMSMS	FOR-DLQ-022	Sala de Equipos	Técnicos	5 años	Eliminación
Esquema de inyección de LCMSMS	FOR-DLQ-023	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación
Historial de ensayos	FOR-DLQ-021	SILAB	Técnicos	5 años	Eliminación

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

9. APROBACIÓN DEL DOCUMENTO

APROBACIÓN POR LA DGT	
Nombre y Apellido	Carmen Berni Ing. Agr. Reg. COSAVE PY-078
Fecha	05/10/26
Vigencia	El presente documento será de aplicación a partir del día hábil siguiente a la fecha de su aprobación.

Msc. Leyla Safia Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE