DETERMINACIÓN DE MULTIRESIDUOS EN SEMILLAS OLEAGINOSAS 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:** 01/10/2026	**Firma:** **Fecha:** 02/10/2026	**Firma:** Carmen Berni Ing. Agr. Reg. COSAVE PY-078 **Fecha:** 05/10/2026

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento analítico para determinar multiresiduos en semillas oleaginosas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS.

2. ALCANCE

Aplica al análisis de granos y semillas oleaginosas de bajo contenido de humedad destinadas al consumo humano, procesadas en el laboratorio, abarcando la extracción, limpieza, concentración y análisis instrumental, hasta la emisión de los resultados.

3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

3.1 Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food/ Multiresidue Method for Agricultural Chemicals by GC/MS (Agricultural Products). Fillion, J.et al, J AOAC Int, 2000, 83, 698-713 8(2000) DE-LRPM-488.

3.2 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:** Cromatografía Líquida.

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

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) Balanza granataria

f) Centrifuga

g) Trituradora Robo coup

h) Desionizador ultrapuro

6.2. Materiales:

a) Espátula de metal

b) Matraz de vidrio con tapa de 10 ml

c) Matraces de vidrio con tapa de 100ml

d) Probeta de vidrio de 1000 ml

e) Pipeta automática o micropipeta 100 a 1000µL

f) Tubos de plástico con tapa de 50ml

g) Viales de vidrio con tapa de 2 ml

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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

h) Vaso de precipitado de 100 ml

i) Filtro minisart 0,2 µm

j) Jeringa descartable de 5 ml

k) Cartuchos de limpieza C18

l) Cartuchos de limpieza Envi-Carb

6.3. Reactivos:

a) Material de referencia certificado

b) Acetona grado HPLC

c) Acetona p.a

d) Acetonitrilo grado HPLC

e) K_2HPO_4 p.a

f) Metanol grado HPLC

g) Agua grado HPLC

h) Acetato de amonio p.a

i) Acetato de Amonio p.a

j) Sulfato de sodio Anhidro

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

Disolver 52,7 g de K_2HPO_4 (Fosfato mono ácido de di Potasio) y 30,2 g de KH_2PO_4 (Fosfato di Hidrogeno de Potasio) en aproximadamente 500 ml de agua destilada. Agitar y sonicar la solución y llevar a volumen en matraz de 1000 mL. Etiquetar con el FOR-DLQ-013 Etiqueta de Preparación de Soluciones.

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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

6.4.2 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).

6.4.3 Preparación de las muestras a ser ensayadas:

Pesar 10,00 g de muestra en un vaso de precipitado de 500 ml, agregar 20 ml de agua y dejar reposar por 15 minutos.

Agregar 50 ml de acetonitrilo, homogeneizar la mezcla por 3 minutos y filtrarla al vacío.

Agregar 20 ml de acetonitrilo al residuo en el vaso, homogeneizar por 3 min y filtrar al vacío nuevamente después de homogeneizar.

Enjuagar la pared interior del vaso y el residuo en el papel de filtro con 5 ml de acetonitrilo, juntar todo el filtrado obtenido en el matraz kitasato y trasvasar a un matraz de 100 ml agregando acetonitrilo hasta obtener 100 ml.

Añadir 10 g de cloruro de sodio y 20 ml del búfer de fosfato 0,5 mol/L (pH 7,0) en un embudo de separación de 100 mL, agregar 20 mL con precisión de la solución de extracto, agitar la mezcla por 10 minutos. Dejar reposar y una vez separada las capas eliminar la capa acuosa.

Acondicionar con 10 ml de acetonitrilo a la mini-columna de gel de sílice C18 en dos porciones de 5 ml, eliminar el efluente agregar la capa orgánica arriba mencionada a esta columna y luego agregar 2 ml de acetonitrilo y colectar todo el efluente en un erlenmeyer de 100 ml.

Agregar sulfato de sodio anhidro (cantidad adecuada), al erlenmeyer de 100 ml para deshidratar el efluente separar el sulfato de sodio anhidro por la filtración, en un balón de destilación de 100 ml y enjuagar con unos 10 ml de acetonitrilo la pared interior del frasco y el papel de filtro en dos partes y juntar todo el filtrado.

Concentrar el filtrado a una temperatura no mayor de 40ºC y eliminar el solvente secando y endureciendo la solución final con el gas de nitrógeno.

Agregar 2 ml de la mezcla de acetonitrilo/tolueno (3:1) al residuo y disolverlo completamente para obtener la solución de muestra.

6.4.4 Purificación

Acondicionar en dos porciones con 10 ml en total de la mezcla de acetonitrilo/tolueno (3:1) a la mini-columna de 2 capas de grafito de carbono/gel de sílice aminopropylsilano (500 mg/500 mg) y eliminar el efluente.

Pasar la solución de muestra obtenida a esta columna, agregar 20 ml de la mezcla de acetonitrilo/tolueno (3:1) en dos porciones y colectar todo el efluente en un Balón de destilación de 100 ml.

Concentrar a una temperatura no mayor a 40ºC hasta que la cantidad sea de 1 mL o menor. Agregar 10 ml de acetona y concentrar la mezcla a una temperatura no mayor a 40ºC hasta que la cantidad sea de 1 mL o menor. Nuevamente agregar 5 ml de acetona y concentrar la mezcla para eliminar el solvente. Disolver el residuo en metanol para obtener una solución de prueba de 4 ml con precisión. Inyectar en el LC MSMS con el siguiente esquema de inyección: Una curva de calibración, muestra blanca, muestra fortificada y la solución de prueba.

6.4.5 Preparación de muestras

a. Fortificación

Para fortificar las muestras se debe agregar un volumen calculado de estándar para obtener la concentración de fortificado deseado, una vez agregado este volumen se deja reposar el vaso

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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

mecip 2015

que contiene la muestra fortificada unos minutos y proceder a la extracción descrita anteriormente.

b. Preparación de Curva en matriz

Cuando sea necesario utilizar la solución de patrón con adición de la matriz para obtener el valor preciso de la medición, preparar la solución de patrón con adición de la matriz utilizando una muestra blanca para elaborar la curva de calibración ajustada a la matriz y llevar a cabo la cuantificación.

En cuanto a la muestra blanco, después de preparar la solución para la prueba de acuerdo con "5.4.4. Preparación de muestras ensayadas", tomar 0,5 mL con precisión de la solución de prueba en un tubo de ensayo de 10 mL, secar y endurecerla a una temperatura no mayor de 40ºC y en el gas de nitrógeno, disolver el residuo agregando 0,5 mL la solución de patrón para obtener la solución de patrón con adición de la matriz.

Utilizando la curva con adición de la matriz, elaborar la curva de calibración y realizar la cuantificación

6.5. Condiciones cromatográficas:

a) Condiciones para LC MSMS

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

Temperatura de columna: 40 ° C.

Flujo: 0,2 ml/min.

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

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

b) 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
30	5	95
30,1	85	15

6.6. 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.

Utilizando la curva de calibración elaborada, realizar la cuantificación según la fórmula mencionada abajo.

Contenido de cada agroquímico (mg/Kg) = C x 100 / 20 x 4 /W

Donde:

C: concentración obtenida de la solución para la prueba según la curva de calibración (µg/mL)

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

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

W: Peso de muestra (g) con 2 dígitos luego de la coma

Porcentaje de Recuperación

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

Nota: Los resultados se expresan en mg/kg, deberán tener 2 dígitos luego de la coma

7. CONTROL DE CAMBIOS

Ítem	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	Jefe/Técnicos	5 años	Eliminación
Preparación de Soluciones	FOR-DLQ-013	Sala de archivos	Jefe/Técnicos	5 años	Eliminación
Cuaderno de Laboratorio LRCV	FOR-DLQ-040	Sala de Estándar	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 Equipos	Técnicos	5 años	Eliminación
Historial de ensayos	FOR-DLQ-021	SILAB	Técnicos	5 años	Eliminación

9. APROBACIÓN DEL DOCUMENTO

APROBACIÓN POR LA DGT	
Nombre y Apellido	Carmen Berni Ing. Agr. Reg. COSAVE PY-078
Fecha	05/10/16
Vigencia	El documento entrará en vigencia cinco días hábiles desde la fecha de promulgación de la resolución.

Msc. Leda Sofía Díaz
Lic. Química R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.54

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE