DETERMINACIÓN DE MULTIRESIDUOS EN AGUA 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:** 05/10/20

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento analítico para determinar residuos de plaguicidas en muestras de agua mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica al análisis de muestras de agua de consumo humano y agua de escorrentía procesadas en el laboratorio, desde la preparación de la muestra, la determinación instrumental de multiresiduos por LC-MS/MS hasta la emisión del resultado.

3. DOCUMENTO DE REFERENCIA

3.1 Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in waters Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry.

3.2 Determinacion de Residuos de Plaguicidas y Productos de Transformacion en agua pór Cromatografía Liquida-Espectrometría de Masas Tandem (LC MSMS)Jose M.Marin, juan V Sancho, Oscar J.Pozo, Francisco J. Lopezy Felix Hernandez- Journal of Chromatography A 1133(2006)204-214 Capitulo 2.

3.3 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) Desionizador ultrapuro

6.2 Materiales:

a) Jeringa de 5ml

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) Viales de vidrio con tapa de 2 ml

g) Filtro minisart 0,2 µm

6.3 Reactivos:

a) Material de referencia certificado

b) Acetona grado HPLC

Lic. Olga Pavón
SENAVE

mecip 2015

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

Lic. Laura Lorena Lezcano

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

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 °C. 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 10°C 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 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 la muestra a ser ensayada

a) Se filtran 10ml de muestra en un matraz Kitasato y embudo de buchnner con papel de filtro cuantitativo.

b) El filtrado se deja reposar 5 min para corroborar que no haya sobrenadante (Repetir el filtrado si hay sobrenadante)

c) Se toman 1000µl de muestra,se filtra con filtro de membrana de 0,22µm se agita en el Vortex por 15 segundos y se inyecta en el LC MSMS.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

mecip 2015

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

Lic. Laura Lorena Lezcano

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

6.4.4 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 agita el vaso que contiene la muestra fortificada unos minutos y se procede como menciona el punto 6.4.3.

Ej:

C1. V1 = C2. V2

Donde:

C1: concentración del Mix.

V1: Volumen con el cual fortificar

C2: concentración con la cual se desea fortificar

V2: Volumen en ml

6.5 Condiciones cromatográficas:

6.5.1 Cromatógrafo Líquido LC- MS/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

6.6 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) = $C \times Fd$

Donde

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

Fd: Factor de Dilución

Porcentaje de Recuperación

Lic. Olga Pavón
SENAVE

mecip 2015

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

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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

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

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

6.7 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

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.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

mecip 2015

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

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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