DETERMINACIÓN DE HALOXYFOP TOTAL 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 residuos de Haloxyfop total 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 baja humedad destinadas al consumo humano. Incluye la extracción, limpieza, concentración y análisis instrumental para detectar residuos de Haloxyfop total (sin considerar isómeros).

3. DOCUMENTO 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 LC/MS (Agricultural Products).

3.2. Fillion, J.et al, J AOAC Int, 2000, 83, 698-713 8(2000) versión mayo 26, 2006

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) 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

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

ura Lorena Lezcano
ENAVE

1sc. Leyla Soffa Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
a. Agrónoma- R.P.N° 8.544

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

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) KH_2PO_4 P.a

j) Acetato de Amonio p.a

k) Sulfato de sodio Anhidro p.a

l) Cloruro de sodio 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.

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

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

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

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

d) Preparación de Solución

HCl 0,01 mol/L:

Calculo

densidad: 1,19g/1ml

PM: 36,46g/mol

C%: 37,25

1,19g/ml----------1ml 37,25g---------$100g_{solucion}$ 1eq ----------36,46g

X ---------- 1000ml X -------- 1190 $g_{solucion}$ X ---------- 443,275g

X: 1190 g/ml X:443,275 g X: 12,16 eq/ml

X: 12,16 N/12,16mol/L

C1V1:C2V2

12,16 mol/L. V: 0,01 mol/L.1000ml

V: 0,82ml

Acetona: Hexano: TEA (20:80:0,5ml) **(**Preparar en el día**)**

Acetona: Metanol (1:1) **(**Preparar en el día)

6.4.2 Preparación de la fase móvil

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).

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 100 ml, agregar 20 ml de agua y dejar reposar por 15 minutos. Agregar 50 mL de acetonitrilo, homogeneizar la mezcla por 3 min 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 enjuagando con acetonitrilo el matraz kitasato hasta obtener 100 ml.

Añadir 10 g de cloruro de sodio y 20 ml del de HCl 0,01 mol/L en un embudo de separación de 100 ml, agregar 20 ml con precisión de la solución de extracto, agitar la mezcla por 15 minutos., confirmando que quede la sal en el embudo luego de la agitación para corroborar una extracción segura, Dejar reposar y una vez separada las capas eliminar la capa acuosa.

Acondicionar con 10 ml de acetonitrilo al cartucho de C18, eliminar el efluente, no dejar el cartucho seco cuando termina de caer la última gota parar el vacío y dejar humedecido el cartucho C18.

Agregar la capa Orgánica obtenida en el embudo de decantación a este cartucho por la boca superior del embudo y luego agregar 2 ml de acetonitrilo y colectar todo el efluente en un tubo de 50 ml haciendo gotear una gota por segundo.

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

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

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

Agregar sulfato de sodio anhidro (cantidad adecuada), al tubo de 50 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 (en dos porciones) la pared interior del frasco y el papel de filtro y juntar todo el filtrado en el balón de destilación.

Concentrar el filtrado a una temperatura no mayor de 40ºC, dejar 1 ml o menos y luego eliminar el solvente secando y endureciendo la solución final con el gas de nitrógeno. No secar en el rota-evaporador la solución final.

Agregar 2 ml de la mezcla de Acetona:n-Hexano:trietilamina (20:80:0.5) ml al residuo y disolverlo completamente por medio de agitación para obtener la solución de muestra.

6.4.4 Purificación

Acondicionar con (Metanol) 5ml, (Acetona) 5 ml y 10 ml de n-Hexano el cartucho de silicagel y eliminar el efluente, no dejar el cartucho seco, cuando termina de caer la última gota parar el vacío y dejar humedecido el mismo.

Pasar la solución de muestra obtenida a este cartucho, y agregar 10 ml de la mezcla (20:80:0.5) y eliminar el efluente que paso por el cartucho.

Agregar 2ml de la mezcla acetona:metanol en el balón de la solución de muestra con ello se limpia el balón y se hace pasar por el cartucho, se pasa 18 ml de acetona:metanol se recoge el líquido en un Balón de destilación de 50 ml.

Concentrar a una temperatura no mayor a 40ºC hasta que la cantidad sea de 1 mL o menor, luego eliminar el solvente secando y endureciendo la solución final con el gas de nitrógeno. No secar en el rota-evaporador.

Disolver el residuo en metanol para obtener una solución de prueba de 4 mL con precisión.

Filtrar por minisart e Inyectar en el LC MSMS.

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 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 para la 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

c) Condiciones cromatográficas:

Cromatógrafo Líquido LC- MS/MS

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

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

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

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.

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)

W: Peso de muestra (g)

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	Nombre del Documento
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

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

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

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lic. Laura Lorena Lezcano
SENAVE

mecip 2015

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.

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° 8.54