



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ)  
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE  
PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR  
EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON  
GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-TOX-26**

VERSION: 03

Rige desde: 18/12/2023

PAGINA: 1 de 62

<b>Elaborado o modificado por:</b>  <b>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Perito, Sección de Toxicología</b>  <b>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección Toxicología</b>	<b>Revisado por Líder Técnico:</b>  <b>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Líder Técnica de Sección/Unidad de Confirmatorios y Plaguicidas</b>
<b>Visto Bueno Encargado de Calidad:</b>  <b>Dr. Marco Martínez Esquivel Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología</b>	<b>Aprobado por:</b>  <b>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección de Toxicología</b>

**CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN**

<b>Versión</b>	<b>Fecha de Aprobación</b>	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Descripción del Cambio</b>	<b>SCD</b>	<b>Solicitado por</b>
01	30/11/2010	20/07/2020	Versión Inicial del Procedimiento		GBA
02	20/07/2020	18/12/2022	Se cambia el formato, se cambia proceso de extracción, se agregan algunos analitos y se eliminan otros, se modifica lista de materiales, reactivos, cuadro de condiciones ambientales, se modifican controles y partes del procedimiento, se incluye secuencia de verificación, lista de chequeo y disruptor de muestras.	08-2020	DAA
03	18/12/2023		Se incorpora el análisis por GC/MS (no inhibidores de plaguicidas) en este procedimiento	012-2023	DAA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ)  
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE  
PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR  
EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON  
GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-TOX-26**

VERSION: 03

Rige desde: 18/12/2023

PAGINA: 2 de 62

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL  
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

**La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada.**

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 3 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

## 1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer el procedimiento para identificar y confirmar la presencia de plaguicidas Organofosforados (OF), Carbamatos (CM), Organoclorados (OC) y Piretroides (PR) en matrices biológicas, mediante partición de los plaguicidas en acetonitrilo, limpieza de los extractos mediante SPE dispersivo y posterior determinación mediante Cromatografía de Gases con doble Detector de Nitrógeno-Fósforo (GC/NPD/NPD), Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC/DAD) y Cromatografía de Gases acoplada a un Detector Espectrométrico de Masas (GC/MS) en la Sección de Toxicología del Departamento de Ciencias Forenses del O.I.J. de Costa Rica.

## 2 Alcance:

Este procedimiento permite realizar la identificación y confirmación de plaguicidas que pertenecen al grupo de los organofosforados (OF): Dichlorvos, Metamidofos, Etoprofos, Dimetoato, Cadusafos, Forato, Terbufos, Diazinon, Paration-metil, Fenamifos, Edifenfos, Malation, Clorpirifos, empleando etion como estándar interno. Carbamatos (CM) entre ellos: Carbofuran, Metomilo, Propoxur, Aldicarb, Carbarilo y Oxamilo, empleado bendiocarb como estándar interno. Organoclorados (OC): Endosulfan-alfa, Endosulfan-beta y Quintozeno, así como al grupo de los piretroides: Ciflutrina, Cipermetrina, Deltametrina, Lambda Cihalotrina, utilizando trifenilfosfato como estándar interno.

El método permite analizar muestras de contenido gástrico y sangre (humana o de animales). Se necesitan preferiblemente de 2 g o mL de contenido gástrico para realizar el análisis. La muestra de contenido gástrico puede ser líquida o sólida y de composición diversa. Para las muestras de sangre son requeridos al menos 4 mL.

Para ello se realiza una partición con acetonitrilo acidificado con ácido acético en presencia de sulfato de magnesio y acetato de sodio y una limpieza del extracto con fase sólida dispersiva con una mezcla de sulfato de magnesio/PSA/C18.

El extracto se divide y una parte es analizada mediante cromatografía de gases con doble detector NPD, esto permite la determinación de los organofosforados y de algunos carbamatos.

Posteriormente otra parte es analizada mediante cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos para la determinación de los carbamatos.

Otra parte es analizada mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (GC/MS).

Para muestras de sangre el método es capaz de detectar y confirmar la presencia de los organoclorados presentes en una concentración igual o superior a 0,025 µg por mL o g de muestra. Para los piretroides la concentración debe ser igual o superior a 0,05 µg por mL o g de muestra.

Para muestras de contenido gástrico el método es capaz de detectar y confirmar la presencia de los organoclorados presentes en una concentración superior a 1,0 µg por mL o g de muestra y para los piretroides la concentración debe ser superior a 2,0 µg por mL o g de muestra.

En organoclorados y piretroides, hay analitos con límites de detección mayores a los arriba señalados. Para detalles ver el informe de validación (3.4).

En el Anexo No. 5 se presentan los parámetros de identificación de los plaguicidas no inhibidores de la colinesterasa incluidos en esta metodología.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

### 3 Referencias:

- 3.1** AOAC Official Method 474.22. Organophosphorus Pesticides Residues Carbon Column Cleanup Method. Official Method of Analysis of AOAC International. 10th ed. Vol.I, USA, 1999.
- 3.2** Baselt R, Cravey R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th ed. Chemical Toxicology Institute Foster City, California. E.U.A. 2008.
- 3.3** Brown P et al. Analytical Methods Used in the United Kingdom Wildlife Incident Investigation Scheme for the Detection of Animal Poisoning by Pesticides. (2005). J. AOAC Int. 88, 204-220.
- 3.4** Informe de Validación: código 004-TOX-VAL-INC-2015. Sección Toxicología
- 3.5** Lehotay S. 6. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticides Residues. In Press: Pesticide Protocols (Methods in Biotechnology), Eds Vidal J, Garrido F. Humana Press; 1 edition Nov.2004.
- 3.6** Moriya F., Hashimoto Y. Comparative Studies on Tissue Distribution of Organophosphorus, Carbamate and Organochlorine Pesticides in Decedents Intoxicated with these Chemicals. J Forensic Sci 44(6) (1999): 1131-1135.
- 3.7** Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense, Departamento de Ciencias Forenses. Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.), Versión vigente.
- 3.8** Procedimiento para el uso y manejo de cromatógrafos de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS), Departamento de Ciencias Forenses. Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.), Versión vigente.
- 3.9** Reigart J., Roberts J. Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas. 5th ed. United States Environmental Protection Agency (USEPA), EUA, 1999.
- 3.10** Susuki O., Hattori H., Liu J., Seno H., Kumazawa T. Positive and Negative Ion Mass Spectrometry and Rapid Clean-Up of Some Carbamate Pesticides. Forensic Science International, 46 (1990): 169-180.
- 3.11** Tomlin C. The Pesticide Manual, 10th ed. Crop Protection Publications, United Kingdom, 1994.

### 4 Equipos y Materiales:

Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Agitador por vibración tipo vortex.

Balanza analítica, rango 0,00001 a 30 gramos ( $\pm$  0,00001 gramos) y de 30 a 120 gramos ( $\pm$ 0,0001 gramos), similar o superior.

Balanza semianalítica, rango de 0,001 a 100 gramos ( $\pm$  0,002 gramos) similar o superior.

Balines de acero nuevos de ¼ de pulgada lavados con acetona u homogeneizadores de cerámica Agilent 5982-9312 o similar. No se reutilizan.

Balones aforados de 5 mL y de 1000 mL.

Base de datos "RAS electrónico de plaguicidas "

Beakers de vidrio de 50 mL, de 100 mL, de 250 mL, de 500 mL, de 1L y de 2 L.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

Bitácora de control de uso de equipo cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC-2).

Bitácora de control de uso de equipo del cromatógrafo de gases Agilent GC6890/NPD.

[Bitácora de control de uso de equipo del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas GC7890B / MSD5975C \(GC/MS-1\).](#)

Botellas de vidrio de 500 mL con tapa esmerilada.

Cabina de bioseguridad clase 2-B2

Cámara de Bioseguridad tipo I.

Capilla de extracción de gases.

Centrífuga refrigerada, con una fuerza centrífuga relativa de al menos 5000 r.p.m. Thermo Sorvall S16R o similar.

Cilindro de Aire UHP, o similar.

Cilindro de Helio UHP o similar.

Cilindro de Hidrógeno UHP, o similar.

Cilindro de Nitrógeno UHP o similar.

Congelador ( $\leq 0$  ° C).

Desecador de Laboratorio al vacío marca Labconco o similar.

Dilutor Microlab 600 Series Hamilton, con jeringas de dilución y con jeringas de muestreo con rango de 10  $\mu$ L a 50000  $\mu$ L, exactitud  $\leq \pm 3,0\%$ , o similar.

Disruptor mecánico para mezclar extractos de QuEChERS 1600 MiniG o similar

Etiquetas adhesivas con código micro QR.

[Filtros de membrana de nylon para jeringa de 13 mm o de 7 mm, 0,45  \$\mu\$ m de diámetro de poro nuevos.](#)

[Filtros de Membranas de filtración de nylon de 47 mm con 0,45  \$\mu\$ m de diámetro de poro nuevas.](#)

[Formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental \(GC/MS\)"](#)

[Formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental \(GC/NPD\)"](#)

[Formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental \(HPLC/DAD\)"](#)

[Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas"](#)

[Formulario "Registro de preparación de disoluciones"](#)

[Formulario "Registro de uso y control de material de referencia"](#)

[Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales"](#)

[Formulario de análisis en serie por plaguicidas en GC/MS.](#)

Gabacha o uniforme de laboratorio.

[GC/MS: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890, con horno estándar, puerto de inyección split/splitless y con columna capilar polar \(HP-5MS\) o similar; Acoplado a espectrómetro de masas Agilent Technologies con triple axis detector, bomba turbomolecular y](#)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 6 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

cámara de ionización por impacto electrónico; Un robot multipropósito marca Gerstel, modelo MPS-2, con inyector de líquidos e inyección head space; controlado por una computadora con sistema operativo Windows 7 Professional o superior, capaz de correr el programa "MassHunter Workstation Software" versión B-07.04.2260 o superior que a su vez tenga anidado el software MAESTRO versión 1.4.39.3 / 3.5 para el control de los MPS-2, el programa "MSD Chemstation Rev. F.01.03.2357 o superior; Con al menos las siguientes bibliotecas de espectros de masas: Cayman Spectral Library, SWGDRUG Mass Spectra Library, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2014, Maurer/Pfleger/Weber Mass Spectral Library 2007 y Stan Pesticides Library.

GC/NPD/NPD: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890, con doble columna capilar (HP-5MS y DB-1701), doble detector de nitrógeno-fósforo e inyector automático. Controlado por una computadora capaz de correr el programa "GC Chem Station" Rev. B.01.03 (204) o una versión más actual. Incluye impresora.

Guantes desechables.

Horno de laboratorio, rango 20-240° C ( $\pm 10^\circ$  C).

HPLC: Cromatógrafo Líquido Agilent Technologies modelo 1260, con bomba cuaternaria, compartimiento con temperatura controlada para la columna, desgasificador en línea, inyector automático y detector de arreglo de diodos. Controlado por una computadora capaz de correr el programa "Open Lab Chem Station" Versión C.01.05 o una versión más actual.

Impresora de Etiquetas, Citizen CI-S621 o similar.

Insertos de vidrio o plásticos para viales Agilent de 2 mL (pueden ser similares, pero con el mismo diámetro interno). Son desechables.

Jeringa de plástico de 3 mL nuevas.

Lavadora automática de cristalería Labconco o similar.

Lector de código de barras.

Lentes de seguridad.

Listado de tipos de caso de la Sección de Toxicología, versión vigente.

Medidor de temperatura digital, capaz de medir temperatura en el rango de 10-40°C  $\pm 1$ .

Micropipeta ajustable de 100 a 1000  $\mu$ L ( $\pm 10 \mu$ L) o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta automática de 10  $\mu$ L a 100  $\mu$ L ( $\pm 0,2 \mu$ L) o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta automática de 20  $\mu$ L a 200  $\mu$ L ( $\pm 0,2 \mu$ L) o similar. Con puntas nuevas.

Microtubos de 1,5 a 2,0 mL de plástico o polipropileno de tapa rosca o a snap cap, nuevos.

Nitrógeno en cilindro grado industrial, 100 psi por corrida de 24 extractos.

Papel aluminio

Papel Kraft

Pinza de disección con punta plana o similar

Pipeta automática de 1 a 10 mL

Pipeta de vidrio graduada de 5 mL.

Pipeta plástica desechable con bulbo de 3 mL.

Pipetas pasteur de vidrio de espiga corta con algodón nuevas.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 7 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

Pizeta plástica de 500 mL lavada.

Probetas de 10 mL, 25 mL, de 100 mL, de 250 mL, de 500 mL y de 1 L.

Refrigerador (>0 a 10°C).

Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses.

Sistema de Evaporación de Nitrógeno N Evap 111 Organononation para 24 muestras con control de temperatura y suministro de Nitrógeno (o similar).

Sistema de filtración de fase móvil para HPLC de vidrio para membranas de 47 mm.

Tijera de disección.

Tina plástica donde pueda colocarse una gradilla con tubos de 30 mm de diámetro.

Tubos cónicos de plástico de 15 mL, o similar.

Tubos cónicos de plástico de 50 mL, o similar.

Tubos de plástico o vidrio con tapa rosca o snap cap (13x75 o 13x100) o similar (reutilizables).

Tubos de plástico o vidrio con tapa rosca o snap cap de 5 mL o similar (reutilizables).

Viales ámbar silanizados de 5 mL (15x45) con tapa de teflón, para almacenar soluciones de drogas o similar. Utilizar nuevos.

Viales de autoinyector de polipropileno con filtro 0,2 µm. Whatman o similar

Viales de vidrio de 2 mL o de plástico de 2 mL o de volumen reducido (200 µL) para inyectores automáticos Agilent Technologies® nuevos.

Nota 1: Lave la cristalería según lo señalado en el procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

## 5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Acetato de sodio para QuEChERS, Agilent 5982-5751 o similar.

Acetona p.a.r.

Acetonitrilo calidad p.a.r.

Acetonitrilo con 1 % de HAc. (Ver Anexo No. 3).

Ácido acético glacial p.a.

Acido fosfórico 1 M (Ver Anexo No. 3).

Ácido fosfórico concentrado (85%) p.a.

Agua desionizada.

Agua tipo I (ultrapura del sistema Milli-Q con resistividad mínima de 18 MΩ/cm).

Buffer de fosfatos pH 4,5 para HPLC/DAD por carbamatos (Ver Anexo No. 3).

Contenido gástrico blanco.

CRM de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M (Ver Anexo No. 3).

CRM de plaguicidas para HPLC, ES-HPLC-XX (Ver Anexo No. 3).

CRM de plaguicidas para NPD, ES-NPD-XX (Ver Anexo No. 3).

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 8 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

Dihidrógeno fosfato de potasio p.a. (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Disolución de cloro al 0,5% (Ver Anexo No. 3).

Disolución de hipoclorito de sodio comercial del 3-12%.

[Disolución de Trifenilfosfato \(estándar interno\) \(ES-MS-0X\) para GC/MS \(Ver Anexo No. 3\).](#)

[Disoluciones madre de Plaguicidas \(Ver Anexo No. 3\).](#)

Estándar interno de plaguicidas para HPLC (Ver Anexo No. 3).

Estándar interno de plaguicidas para NPD (Ver Anexo No. 3).

Etanol p.a. al 95%.

Fase móvil para carbamatos (Ver Anexo No. 3).

Metanol calidad p.a.r.

Mezcla de acetato de sodio/sulfato de magnesio para QuEChERS (AOAC), puede comprarse comercialmente (Agilent 5982-5755 o similar) o prepararse (ver Anexo No. 3).

Mezcla de sulfato de magnesio/PSA/C18 para limpieza QuEChERS (AOAC), solo es necesario prepararla si no se puede comprar los microtubos de limpieza para SPE dispersivo (ver Anexo No. 3).

Microtubos con material para SPE dispersivo: pueden comprarse comercialmente (Agilent 5982-5121 ó Restek Q211 o similar), o prepararse (ver Anexo No. 3).

Octadecilsilica (C18) para QuEChERS, Agilent 5982-5752 o similar.

[Patrones de plaguicidas certificados con pureza conocida.](#)

Primary Secondary Amine (PSA) para QuEChERS, Agilent 5982-5753 o similar.

Sangre blanco.

Sulfato de magnesio anhidro para QuEChERS, Agilent 5982-8082 o similar.

Tolueno p.a.r.

Trietilamina p.a.

Tubos con mezcla prepesada de extracción QuEChERS (AOAC) con proporción 8/2 de sulfato de magnesio/acetato de sodio, (Ver Anexo No. 3).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

## 6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura en la preparación de muestras y extracción QuEChERS	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Se puede utilizar cámara de bioseguridad tipo I para preparación de la muestra y capilla de extracción de gases para extracción QuEChERS o cabina de bioseguridad clase 2-B2 para ambos procesos, previamente desinfectada con etanol al 95%. El área de trabajo de la capilla debe forrarse con papel Kraft.
2	Temperatura durante el análisis en el equipo GC/NPD	No es crítico para el proceso	40°C	Estos parámetros no requieren monitoreo continuo debido a que en condiciones de aire acondicionado no se alcanza esa temperatura máxima. Si se presenta un fallo en el aire acondicionado debe registrarse la temperatura antes de realizar el análisis.
3	Temperatura durante el análisis en el equipo HPLC/DAD	No es crítico para el proceso	25°C	Si se presenta un fallo en el aire acondicionado debe cerciorarse que la temperatura del cuarto de instrumentos sea inferior a 25°C antes de realizar el análisis. De lo contrario posponga el análisis hasta resolver la situación.
4	Temperatura durante el análisis en el equipo GC/MS	No es crítico para el proceso	40°C	Estos parámetros no requieren monitoreo continuo debido a que en condiciones de aire acondicionado no se alcanza esa temperatura máxima. Si se presenta un fallo en el aire acondicionado debe registrarse la temperatura antes de realizar el análisis.

## 7 Procedimiento:

### 7.1 Actividades previas al análisis

- 7.1.1** Para la preparación, verificación y conservación del material de referencia, disoluciones de CRM y disoluciones de estándares internos refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 7.1.2** Para la preparación, verificación y conservación de reactivos y materiales críticos refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 7.1.3** Para efectos de realizar la extracción de manera eficiente, idealmente la cantidad total de extractos, tomando en cuenta las muestras incógnitas, blancos de matriz y blancos enriquecidos, es de 30.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 10 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

- 7.1.4** Realice como técnico encargado una consulta de los casos pendientes de este análisis y seleccione la información de esos casos, para ir llenando el Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas"
- 7.1.5** Entregue el formulario con toda la información, al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregárselas al técnico encargado del análisis a través del SADCF. Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad.
- 7.1.6** Limpie las cámaras de bioseguridad y las capillas de extracción de gases según lo señalado en el PON de "Limpieza, Revisión y Control de áreas de trabajo".
- 7.2 Preparación del equipo GC/NPD:**
- 7.2.1** Revise la bitácora de control de uso del equipo del cromatógrafo de gases Agilent GC6890/NPD que se encuentra al lado del instrumento y cerciórese de que el número acumulado de inyecciones es inferior a 100 para el septum o inferior a 1000 si es sello merlin y menor a 300 para el liner. Si el conteo es mayor realice el cambio de estos consumibles.
- 7.2.2** Refiérase al procedimiento descrito en la página 37 del manual de Operación de Inyectores del Cromatógrafo de Gases Serie Agilent 6890 para cambiar la septa (septum).
- 7.2.3** Refiérase al procedimiento descrito en la página 40 del Manual de Operación de Inyectores del Cromatógrafo de Gases Serie Agilent 6890, si requiere cambiar el liner.
- 7.2.4** Anote en la bitácora de control de uso del equipo del cromatógrafo de gases Agilent GC6890/NPD, el cambio de los consumibles que realizó, e inicie en cero el conteo de inyecciones.
- 7.2.5** Revise las presiones de los cilindros de helio, nitrógeno, aire e hidrógeno. La presión mínima para los cilindros debe ser de 400 psi, si es menor comuníquese al encargado para que proceda a cambiarlo. La presión de salida debe ser de  $80 \pm 10$  psi.
- 7.2.6** Cambie el disolvente de los viales de lavado del autoinyector por tolueno. Verifique la jeringa del autoinyector: abra la puerta de plástico transparente del inyector, proceda a aflojar el tornillo que se encuentra en la parte superior del autoinyector y mantiene sujeta la jeringa al inyector mediante un eje paralelo, hágalo girar en el sentido contrario de las manecillas del reloj y suba manualmente el eje que da sostén a la jeringa. Retire manualmente la jeringa. Cerciórese que la jeringa sea de 1 a 10  $\mu$ L. Si no es la jeringa de 1 a 10  $\mu$ L, reemplácela con la jeringa de 1 a 10  $\mu$ L.
- 7.2.7** Tome uno de los viales de lavado con tolueno, inserte la aguja de la jeringa dentro del disolvente y suba el embolo de la jeringa. El embolo de la jeringa debe de subir y bajar sin ofrecer resistencia. Si hay resistencia, repita la operación descrita hasta que el embolo pueda subir y bajar fácilmente.
- 7.2.8** Proceda a poner de nuevo la jeringa en el sitio del que la quitó, baje manualmente el eje de apoyo de la jeringa y asegure la misma haciendo girar en dirección a las manecillas del reloj al tornillo citado en el punto 7.2.6.
- 7.2.9** Vaya llenando el formulario Lista de Chequeo para equipo instrumental (GC/NPD) con toda la información solicitada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 11 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

### 7.3 Preparación del equipo HPLC/DAD:

- 7.3.1** Encienda todos los componentes del HPLC Agilent 1260 presionando los interruptores que se encuentran en la parte inferior izquierda de cada módulo. Encienda la computadora e inicie la sesión de Windows. Revise la botella de desechos y elimínelos si es necesario.
- 7.3.2** En la bitácora de control de uso de equipo cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC-2) revise el número acumulado de inyecciones que esta anotado en esta. Si es mayor a 300 realice el cambio de la frita de teflón y de prefiltro o precolumna (si está instalada).
- 7.3.3** Refiérase a la página Refiérase a la página 11 del "Mantenimiento de Sistemas LC y LC/MS de Agilent" para realizar el cambio de la frita de la válvula de purga.
- 7.3.4** Si el equipo está usando prefiltro o precolumna debe abrir el compartimento de la columna para hacer el cambio, con ayuda de llave francesa y llave de 1/4 saque el prefiltro o la precolumna y coloque uno nuevo. Si lo que cambió es la precolumna debe tener cuidado de colocarla en la dirección del flujo, para esto está marcada con flechas que indican la posición en dicha dirección.
- 7.3.5** Anote en la bitácora de control de uso de equipo cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC-2) el cambio de consumible realizado, para iniciar el conteo de inyecciones en cero.
- 7.3.6** En una capilla de extracción de gases, coloque el sistema de filtración de fase móvil para HPLC de vidrio para membranas de 47 mm. Coloque una membrana de nylon de 47 mm y 0,2 o 0,45 µm en el sistema y aplique vacío. Filtre en el siguiente orden (enjuagando dos veces con el disolvente que va a filtrar para eliminar el anterior y desechando este enjuague): acetonitrilo, metanol y buffer de fosfatos de pH 4,5. El agua tipo I no requiere filtración. Si el metanol o el acetonitrilo están filtrados de fábrica o previamente no requieren filtración. Entre un líquido y el otro deposite el filtrado en las botellas del HPLC correspondientes.
- 7.3.7** Deposite en la botella A: metanol para HPLC (150 mL mínimo), en la B: buffer de fosfatos de pH 4,5 (no menos de 200 mL), en la botella C: acetonitrilo para HPLC (no menos de 200 mL) y en la botella D: agua tipo I (150 mL mínimo).
- 7.3.8** Revise que la válvula de drenaje de la bomba del HPLC esté abierta girándola a la izquierda.
- 7.3.9** Inicie el programa "OpenLAB CDS" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora que controla el equipo, anote usuario y contraseña para abrir el software. En el menú principal vaya "method") y elija la opción "load method" y cargue el método "PURCOLUMNA ESPLAGUICIDAS.M".
- 7.3.10** Purgue la línea B con agua 5 ml/min. Por 5 minutos.
- 7.3.11** Purgue cada eluyente 5 min. con un flujo de 5 mL/min. en el siguiente orden D, B, D, A y C. Para hacerlo pique con el Mouse en el diagrama del sistema, en la bomba y seleccione "Set Up Pump". Ponga 5 mL/min. de flujo y 100 % del eluyente que desea purgar.
- 7.3.12** Cierre la válvula de drenaje de la bomba girándola a la derecha. Realice una primera inyección con un blanco de corrida con el método "PURCOLUMNA ESPLAGUICIDAS.M"
- 7.3.13** Vaya llenando el formulario Lista de Chequeo para equipo instrumental (HPLC/DAD) con toda la información solicitada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 12 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

#### 7.4 Preparación del GC/MS para inyección de muestras líquidas:

- 7.4.1** Siga el punto 7.1 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) para la preparación del Equipo Instrumental para inyección de muestras líquidas.
- 7.4.2** Cambie el disolvente de los viales de lavado del autoinyector por tolueno. Revise la jeringa del autoinyector según el "Maestro Brief Operating Instructions". Cerciórese que la jeringa sea de 1 a 10 µL.
- 7.4.3** Siga los pasos 7.7 y 7.8 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) si es necesario realizar algún mantenimiento al equipo.
- 7.4.4** Realice, si es necesario, un tuning según el punto 7.3 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).
- 7.4.5** Refiérase al Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) para la utilización del formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (GC-MS)"

#### 7.5 Verificación en el Equipo GC/NPD:

- 7.5.1** Saque del congelador las matrices blanco de (sangre y contenido gástrico) sin estándares internos previamente extraídos con esta metodología. Espere aproximadamente 20 minutos para que se atemperen.
- 7.5.2** Saque del congelador el CRM de plaguicidas y el estándar interno (etion) para GC/NPD (ES-NPD-XX) de fecha más reciente, espere aproximadamente 20 min. a que alcancen temperatura ambiente. Realice una dilución en viales de 2 mL según el siguiente cuadro:

CRM plaguicidas	de	Volumen del CRM de plaguicidas (µL)	Volumen de estándar interno (µL)	Factor de dilución
ES-NPD-XX	1/10	100	25	1 en 10
ES-NPD-XX	1/50	20	25	1 en 50

- 7.5.3** Prepare 1 mL de la disolución con el CRM de plaguicidas para GC/NPD diluida 1/10, para ello tome 100 µL de esta disolución en un vial de 2 mL como se indica en el punto anterior, agregue 25 µL de estándar interno, coloque en el sistema de evaporación con Nitrógeno y adicione 1000 µL de tolueno, tape y aplique vortex por aproximadamente 20 segundos. Esta disolución corresponde al control de arrastre en la secuencia.
- 7.5.4** Elabore una secuencia en el equipo con la disolución diluida 1/10 sin extraer, seguida de la matriz blanco de sangre. Repita el análisis de la disolución sin extraer seguida de un blanco de tolueno y posteriormente la matriz blanco de contenido gástrico. Las matrices blanco corresponden a controles post-arrastre.
- 7.5.5** Esta secuencia de verificación debe analizarse antes de la secuencia con muestras reales.
- 7.5.6** Apruebe como perito de la unidad de confirmatorios y plaguicidas, si se cumplen los criterios de aceptación y rechazo descritos en este procedimiento, los resultados de la secuencia de verificación descrita en el punto anterior. De lo contrario realice las acciones descritas en el apartado 8. de este procedimiento.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 13 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**7.5.7** Finalice el llenado del formulario Lista de Chequeo para equipo instrumental (GC/NPD), anote sus iniciales y fecha y guárdelo en la carpeta correspondiente.

**7.6 Verificación en el Equipo HPLC/DAD:**

**7.6.1** Saque del congelador el CRM de plaguicidas y el estándar interno (bendiocarb) para HPLC/DAD (ES-HPLC-XX) de fecha más reciente, espere aproximadamente 20 minutos a que alcancen temperatura ambiente.

**7.6.2** Realice una dilución 1/10 y 1/50 del CRM de plaguicidas ES-HPLC-XX directamente en viales de 2 mL como sigue:

CRM de Plaguicidas	Volumen del CRM plaguicidas (µL)	Volumen de estándar interno (µL)
ES-HPLC-0X 1/10	100	25
ES-HPLC-0X 1/50	20	25

**7.6.3** Evapore a sequedad en el sistema de evaporación con nitrógeno y agregue 1000 µL de fase móvil para carbamatos. Tape y aplique vortex por aproximadamente 15 segundos.

**7.6.4** Elabore una secuencia en el equipo con la disolución diluida 1/10 sin extraer seguida de la matriz blanco de sangre. Repita el análisis de la disolución sin extraer seguida de un blanco de fase móvil y posteriormente la matriz blanco de contenido gástrico. Las matrices blanco corresponden a controles post-arrastre.

**7.6.5** Esta secuencia de verificación debe analizarse antes de la secuencia con muestras reales.

**7.6.6** Apruebe como perito de la unidad de confirmatorios y plaguicidas, si se cumplen los criterios de aceptación y rechazo descritos en este procedimiento, los resultados de la secuencia de verificación descrita en el punto anterior. De lo contrario realice las acciones descritas en el apartado 8. de este procedimiento.

**7.6.7** Finalice el llenado del formulario Lista de Chequeo para equipo instrumental (HPLC/DAD), anote sus iniciales y fecha y guárdelo en la carpeta correspondiente.

**7.7 Verificación en el GC/MS**

**7.7.1** Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad.

**7.7.2** Limpie las cámaras de bioseguridad y las capillas de extracción de gases según lo señalado en el PON de "Limpieza, Revisión y Control de áreas de trabajo".

**7.7.3** Saque del congelador las matrices blanco de (sangre y contenido gástrico) sin estándares internos previamente extraídos con esta metodología. Espere aproximadamente 20 minutos para que se atemperen.

**7.7.4** Saque del congelador la Mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M y la Disolución de Trifenilfosfato de fecha más reciente, espere aproximadamente 20 minutos para que se atemperen. Realice una dilución en viales de 2 mL según el siguiente cuadro:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 14 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

<b>Dilución de la mezcla de Plaguicidas</b>	<b>Volumen del MIX (µL)</b>	<b>Volumen de estándar interno (µL)</b>	<b>Factor de dilución</b>
ES-MS-XX 1/10	100	20	1 en 10
ES-MS-XX 1/50	20	20	1 en 50

- 7.7.5** Prepare 1 mL de la disolución con la mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS diluida 1/10, para ello tome 100 µL de esta disolución en un vial de 2 mL como se indica en el punto anterior, agregue 20 µL de estándar(es) interno(s), coloque en el sistema de evaporación con Nitrógeno y adicione 1000 µL de tolueno. Esta disolución corresponde al control de arrastre en la secuencia.
- 7.7.6** Elabore una secuencia en el equipo con la disolución diluida 1/10 sin extraer seguida de la matriz blanco de sangre. Repita el análisis de la disolución sin extraer seguida de un blanco de tolueno y posteriormente la matriz blanco de contenido gástrico. Las matrices blanco corresponden a controles post-arrastre. Esta secuencia de verificación debe analizarse antes de la secuencia con muestras reales.
- 7.7.7** Apruebe como perito de la unidad de confirmatorios y plaguicidas, si se cumplen los criterios de aceptación y rechazo descritos en este procedimiento, los resultados de la secuencia de verificación descrita en el punto anterior.
- 7.8 Preparación inicial de las muestras**
- 7.8.1** Utilice como perito encargado del análisis de datos, el SADCF para asignarse a todos los casos del "Formulario lista de objetos de análisis por plaguicidas" e iniciar el RAS electrónico.
- 7.8.2** Revise, como funcionario encargado del análisis, que los objetos entregados por el encargado de la bodega de indicios correspondan a lo solicitado en el formulario anteriormente descrito. Si por alguna razón, debe entregarse un objeto diferente al solicitado o no se puede entregar ninguno de los objetos de un caso específico, indíquelo en este formulario. Reciba las muestras que va a analizar a través del SADCF.
- 7.8.3** Registre como perito encargado, cada uno de los indicios a analizar en el Registro de Análisis en serie del SADCF iniciado en el punto 7.8.1, revise que la totalidad de indicios a analizar hayan sido registrados. Imprima un juego de 3 etiquetas con el número de la orden de trabajo y el número de objeto.
- 7.8.4** Utilice las etiquetas generadas por el SADCF, para rotular un tubo de plástico con tapa rosca de 15 mL, un microtubo de limpieza para QuEChERS y finalmente un vial de 2,0 mL con tapa de rosca para depositar el extracto a analizar en el equipo instrumental.
- 7.8.5** Imprima etiquetas adicionales para el re-embalaje de los tubos con muestras incógnitas y para los controles de análisis.
- 7.8.6** Saque del refrigerador o del congelador según corresponda, las muestras de matrices blanco requeridas, según el tipo de matrices de las muestras incógnitas por analizar.
- 7.8.7** Coloque las muestras de sangre (blanco de matriz e incógnitas) en el agitador rotatorio y espere 20 minutos aproximadamente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 15 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

- 7.8.8** Coloque las muestras (controles e incógnitas) de contenidos gástricos en reposo por 20 minutos aproximadamente. Si recibe las muestras aún congeladas déjelas al menos 45 minutos en reposo dentro de la tina con agua del grifo.
- 7.8.9** Al finalizar el análisis re embale los tubos con las etiquetas anteriormente generadas, entregue las muestras mediante el SADCF al funcionario de la bodega de indicios o a algún funcionario que las requiera para otro análisis. Si fuera necesario, puede dejárselas en custodia intermedia hasta que pueda entregarlas al encargado de la bodega de indicios.
- 7.8.10** Una vez preparadas las muestras debe terminarse el proceso de extracción/partición y SPE dispersivo el mismo día. Los extractos separados en tolueno o acetonitrilo pueden almacenarse en congelación hasta por una semana.
- 7.9 Preparación para extracción/partición con acetonitrilo de muestras de sangre:**
- 7.9.1** Analice además de las muestras incógnitas de sangre y el blanco de sangre, un blanco enriquecido de sangre por corrida de muestras. Rotule un tubo plástico de 15 mL para este fin.
- 7.9.2** Agregue utilizando un equipo volumétrico adecuado, 200 µL de CRM de escrutinio de plaguicidas para GC/MS ES-MS-0X.M al tubo cónico de plástico con tapa rosca rotulado como blanco enriquecido de sangre y coloque en el sistema de evaporación con nitrógeno. Evapore suavemente con un flujo de nitrógeno sin que salpique las paredes. Lleve hasta sequedad.
- 7.9.3** Tome, con un equipo volumétrico adecuado, 4 mL de cada muestra incógnita de sangre y deposite en los tubos cónicos de 15 mL etiquetados con la información de la muestra. Para el blanco de sangre y el blanco enriquecido de sangre utilice el lote de sangre post-mortem preferiblemente o sangre de donador humano.
- 7.9.4** Si por la consistencia de alguna muestra de sangre no se puede tomar el volumen requerido con una micropipeta, proceda a pesar los 4 gramos de la muestra en la balanza semianalítica.
- 7.9.5** Agréguele 40 µL de la disolución de CRM de plaguicidas ES-NPD-XX.M y 40 µL de la disolución de CRM de plaguicidas ES-HPLC-0X.M al tubo rotulado como blanco enriquecido de sangre que fue enriquecido con el CRM de escrutinio por GC/MS en 7.9.2.
- 7.9.6** Agregue a las muestras/blancos de sangre 20 µL del estándar interno para GC/NPD, 20 µL del estándar interno para HPLC y 20 µL de la disolución de estándar interno para GC/MS.
- 7.9.7** Agregue un balín metálico de ¼ de pulgada o un homogeneizador de cerámica a cada tubo.
- 7.10 Preparación para extracción/Partición con acetonitrilo de muestras de contenido gástrico:**
- 7.10.1** Analice además de las muestras incógnitas de contenido gástrico y el blanco de matriz de contenido gástrico, un blanco enriquecido de contenido gástrico por corrida de muestras. Rotule un tubo plástico de 15 mL para este fin.
- 7.10.2** Agregue utilizando un equipo volumétrico adecuado, 200 µL de la Mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS ES-MS-0X.M al tubo cónico de plástico con tapa rosca rotulado como blanco enriquecido de contenido gástrico y en el sistema de evaporación con nitrógeno. Evapore suavemente con un flujo de nitrógeno sin que salpique las paredes. Lleve hasta sequedad.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

- 7.10.3** Homogenice las muestras incógnitas de contenido gástrico y la muestra de contenido gástrico blanco en sus recipientes originales agitando manualmente.
- 7.10.4** Tome, con un equipo volumétrico adecuado, 2 mL de cada muestra incógnita de contenido gástrico y de la matriz blanco de contenido gástrico; deposítelas en los tubos cónicos de 15 mL etiquetados con la información de la muestra. Si por la consistencia de alguna muestra de contenido gástrico no se puede tomar el volumen requerido con una micropipeta, proceda a pesar 2 gramos de la muestra en la balanza semianalítica.
- 7.10.5** Tome 2 mL de blanco de contenido gástrico en el tubo rotulado como blanco de contenido gástrico y en tubo rotulado blanco enriquecido de contenido gástrico (GC/NPD, HPLC/DAD y GC/MS). El tubo para el blanco enriquecido es el que se preparó en 7.10.2.
- 7.10.6** Agréguele 200 µL de la disolución de CRM de plaguicidas ES-NPD-XX.M y 200 µL de la disolución de CRM de plaguicidas ES-HPLC-0X.M al tubo rotulado como blanco enriquecido de contenido gástrico.
- 7.10.7** Agregue a las muestras/blancos de contenido gástrico 100 µL del estándar interno para GC/NPD, 100 µL del estándar interno para HPLC y 40 µL de la Disolución de estándar interno para GC/MS (Trifenilfosfato).
- 7.10.8** Agregue un balín metálico de ¼ de pulgada o un homogeneizador de cerámica a cada tubo.
- 7.11 Extracción/Partición con acetonitrilo**
- 7.11.1** Coloque dentro de la capilla la botella con dispensador que contiene el acetonitrilo con 1 % de HAc. Purgue el dispensador de acetonitrilo con 1% de ácido acético y deseche la primera alícuota.
- 7.11.2** Aplique los tres pasos siguientes de dos en dos muestras.
- 7.11.3** Deposite 2 gramos de sulfato de magnesio/acetato de sodio en cada tubo de muestra/blanco de sangre y 1 gramo sulfato de magnesio/acetato de sodio en cada tubo de muestra/blanco de C.G.
- 7.11.4** Dispense 4 mL de acetonitrilo con 1% de HAc en cada tubo de muestra/blanco de sangre y 2 mL de acetonitrilo con 1% de HAc en cada tubo de muestra/blanco de contenido gástrico y tape de inmediato.
- 7.11.5** Aplique vortex por 30 segundos aproximadamente.
- 7.11.6** Encienda el equipo disruptor 1600 MiniG y cerciórese que está configurado a una velocidad de 1000 RPM y un tiempo de 1 minuto.
- 7.11.7** Agite vigorosamente un minuto. utilizando el equipo 1600 MiniG de la siguiente manera: coloque en la placa base del equipo la bandeja con los tubos. Ponga la tapa metálica sobre la bandeja, baje las palancas de bloqueo de ambos lados y gire el tornillo de bloqueo central hasta que cierre totalmente y baje la tapa del equipo para asegurar el cierre. Presione el botón de inicio (start) y espere hasta que finalice el ciclo de mezclado de un minuto.
- 7.11.8** La agitación también puede realizarse manualmente con el antebrazo utilizando el movimiento de todo el brazo y no de la muñeca. Se pueden agitar de 3 a 5 tubos por mano. La temperatura se eleva a 40-45° C.
- 7.11.9** Centrifugue los tubos a 5000 r.p.m. por 15 minutos.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 17 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

## **7.12 Limpieza en fase sólida (SPE) dispersiva para muestras de sangre:**

- 7.12.1** Procese primero las muestras/blancos de sangre debido a que los extractos de estas muestras es necesario concentrarlos antes de su análisis para aumentar sensibilidad. Es necesario separar el extracto en tres alícuotas, una para el NPD, otra para el GC/MS y otra para el HPLC.
- 7.12.2** Rotule los microtubos para limpieza de sulfato de magnesio/C18/PSA. Para cada muestra/blanco de sangre rotule tres tubos, uno para NPD, uno para HPLC y otro para GC/MS.
- 7.12.3** Transfiera 1000 µL de la fase superior que se separa en la centrifugación, al microtubo correspondiente utilizando un equipo volumétrico adecuado. Tape bien los microtubos.
- 7.12.4** Agite con vortex por aproximadamente 30 segundos.
- 7.12.5** Centrifugue a 9000 r.p.m. por 6 minutos.
- 7.12.6** Pase 500 µL del sobrenadante de cada microtubo de limpieza a un microtubo vacío de 1,5-2 mL previamente rotulado.
- 7.12.7** Agregue 100 µL de tolueno a cada extracto.
- 7.12.8** Coloque los microtubos en el sistema de evaporación con nitrógeno. Evapore a una temperatura igual o menor a 40° C, sin que el extracto salpique las paredes. Lleve hasta sequedad.
- 7.12.9** Para los extractos de NPD agregue 100 µL de tolueno, aplique vortex aproximadamente 30 segundos y trasvase los extractos a insertos de 200 µL dentro de viales de 2 mL para auto inyección.
- 7.12.10** Para los extractos de HPLC una vez secos agregue 20 µL de acetonitrilo, aplique vortex por aproximadamente 30 segundos y tape de inmediato.
- 7.12.11** Agregue 80 µL de buffer de fosfatos. También puede preparar la fase móvil con buffer de fosfatos /acetonitrilo (80/20) en una probeta o en un beaker y agregar 100 µL a cada uno de los extractos de HPLC. Filtrelos con jeringa de 3 mL
- 7.12.12** Para los extractos de GC/MS agregue 100 µL de tolueno. Tape y aplique vortex por aproximadamente 15 segundos y transfiera al menos 50 µL de cada extracto a inserto de 200 µL y coloque en el mismo vial de vidrio de 2 mL.
- 7.12.13** Guarde los extractos en congelación hasta el análisis cromatográfico a menos que sea inmediato.

## **7.13 Limpieza en fase sólida (SPE) dispersiva para muestras de contenido gástrico:**

- 7.13.1** Rotule microtubos para limpieza de sulfato de magnesio/C18/PSA. Para las muestras/blancos de contenido gástrico solo es necesario un microtubo de limpieza por muestra.
- 7.13.2** Transfiera 1000 µL de la fase superior que se separa en la centrifugación al microtubo correspondiente utilizando un equipo volumétrico adecuado. Tape bien los microtubos.
- 7.13.3** Agite con vortex por aproximadamente 30 segundos.
- 7.13.4** Centrifugue a 9000 r.p.m. por 6 minutos.
- 7.13.5** Transfiera 500 µL a un vial de 2 mL.
- 7.13.6** Agregue 100 µL de tolueno a cada extracto.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 18 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

- 7.13.7** Coloque los microtubos en el sistema de evaporación con nitrógeno. Evapore a una temperatura igual o menor a 40° C, sin que el extracto salpique las paredes. Lleve hasta sequedad.
- 7.13.8** Agregue 1000 µL de tolueno a cada microtubo, aplique vortex aproximadamente 30 segundos. En los casos en que se presenten líquidos viscosos o cristales, agregue tolueno para solubilizar más la sustancia, hasta un máximo de 2 mL.
- 7.13.9** Trasvase, del extracto preparado en el punto anterior, 200 µL a un vial de inyección de 2 mL para el GC/NPD, 250 µL a un vial de inyección de 2 mL para el HPLC y deje el resto para inyección en el GC/MS. Siga el procedimiento en 7.13.10 para los extractos para HPLC, en 7.14 para el GC/NPD y en 7.18 para el GC/MS.
- 7.13.10** Coloque los viales con los extractos de contenido gástrico para HPLC en el sistema de evaporación con nitrógeno. Evapore suavemente con un flujo de nitrógeno sin que el extracto salpique las paredes. Lleve hasta sequedad.
- 7.13.11** Agregue 50 µL de acetonitrilo a los extractos de contenido gástrico para HPLC, aplique vortex por aproximadamente 30 segundos y tape de inmediato. Guarde los extractos en congelación hasta el análisis por HPLC en 7.16.
- 7.14 Dilución de las muestras:**
- 7.14.1** Realice diluciones antes del análisis por GC/NPD si se presentan altas concentraciones de plaguicidas en las muestras de contenido gástrico. Para hacerlas se toma en cuenta la apariencia del extracto y el valor de la actividad de la colinesterasa eritrocítica del individuo al que pertenece la muestra según se describe a continuación:
- 7.14.2** No haga ninguna dilución para las muestras de contenido gástrico que se secan completamente (tubo parece vacío) y de casos con colinesterasa normal y que no están en el límite inferior de referencia.
- 7.14.3** Haga una dilución 1 en 20 tomando 50 µL del extracto original y agregando 950 µL de tolueno en otro vial de 2 mL para casos con colinesterasa normal, pero en el límite inferior o ligeramente inhibida (mayor a 200 UI/g Hb) pero con extractos que se secan completamente.
- 7.14.4** Para las muestras de contenido gástrico que presentaron cristales o líquidos viscosos o de casos con colinesterasas muy inhibidas (menores a 100 UI/g Hb) se preparan diluciones de 1 en 100 a 1 en 10000 dependiendo del caso.
- 7.14.5** Guarde los extractos y las diluciones en congelación hasta el análisis cromatográfico a menos que sea inmediato.
- 7.15 Creación de una secuencia de análisis en el equipo GC/NPD:**
- 7.15.1** Tome en cuenta lo señalado para el análisis en serie en el Procedimiento para el MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.
- 7.15.2** Prepare los blancos de corrida poniendo al menos 1 mL de tolueno en viales de 2 mL para automuestreador. Prepare los que necesite según el número de extractos que va a inyectar (ver Anexo No. 4).
- 7.15.3** Inicie el programa "Instrument 1 Online" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora que controla el equipo. Cargue el método "ESPLAGUICIDAS DDDMM\_AA.M" (en el menú "file", "load", "method"). Las condiciones de este método se detallan en el Anexo No. 2).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 19 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

- 7.15.4** Espere a que en la pantalla se visualice el estado del equipo como listo "status ready". Realice la lectura del voltaje de la perla, esto se puede visualizar en la pantalla ubicada en la esquina superior izquierda del cromatógrafo de gases. Para ello pulse el botón de mando "front detector" y use los botones de "flecha hacia arriba" y "flecha hacia abajo" para visualizar la opción "bead voltage", los voltajes típicos para una perla nueva varían entre 2.5 a 3.7 voltios, si no se han alcanzado esos valores, vaya subiéndolos lentamente (de 0,5 en 0,5 o menos). El ajuste "output" debe quedar aproximadamente en 30. Valores mayores reducen la vida de la perla. Si esto ocurre proceda a cambiar la perla de acuerdo con lo indicado en la página 94 del Manual de Operación volumen 3.
- 7.15.5** Cree una secuencia basándose en un archivo existente o en un archivo nuevo. Ver Anexo No. 4.
- 7.15.6** Elabore la secuencia iniciando con un blanco de corrida, incluya las diluciones 1/10 y 1/50 del CRM de plaguicidas ES-NPD-XX, continúe con el blanco de matriz sangre y el blanco enriquecido de sangre, de aquí en adelante ponga un grupo de muestras incógnitas, distribuya los controles entre las muestras incógnitas de manera que no queden más de diez muestras seguidas sin controles entre ellas. Repita el procedimiento anterior utilizando la matriz de contenido gástrico.
- 7.15.7** La elaboración de la secuencia puede realizarse a través del lector de código de barras realizando la lectura de los indicios incluidos en el Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas inhibidores de la colinesterasa".
- 7.15.8** Coloque un blanco de corrida entre cada muestra de contenido gástrico para evitar arrastres por las altas concentraciones de analitos presentes en este tipo de muestra.
- 7.15.9** Las condiciones del método "ESPLAGUICIDAS SIM-SCAN DDMM\_AA.M" se detallan en el Anexo 2
- 7.15.10** Cargue el método "LIMPIEZA.M" en el último blanco de corrida de la secuencia. Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador. Salve la secuencia de nuevo. Solicite a un compañero que revise la secuencia antes de ponerla a correr en el equipo.
- 7.15.11** Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador. puede ver un ejemplo de una secuencia típica en el Anexo No. 4. Salve la secuencia con un nuevo nombre de archivo (vaya al menú "Sequence", y seleccione "Save sequence as") déle nombre a la secuencia según el formato ddmmaa y la letra A si es la primera secuencia que se guarda ese día, B si es la segunda y así consecutivamente, además una breve descripción.
- 7.15.12** Al final programe la inyección de un vial de blanco de corrida con el método "DESCANSO.M".
- 7.15.13** Al finalizar la secuencia sume el número de inyecciones para el septum y el liner a las que había en la secuencia anterior y escriba el número total en la bitácora de control de uso de equipo del cromatógrafo de gases Agilent GC6890/NPD/NPD.
- 7.15.14** Cargue el método "Descanso.M" (en el menú "file", "load", "method"). Ponga a correr la secuencia (en el menú "sequence", "run sequence"). Complete la información en el cuadro que aparece en la pantalla. El equipo analizará todos los viales según lo programado en la secuencia y luego cargará automáticamente el método "Descanso.M" nuevamente. Espere a que termine la secuencia antes de continuar.
- 7.15.15** Si la secuencia se detiene por alguna razón y luego debe reanudarse, guarde de

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 20 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

inmediato las muestras en refrigeración o congelación por un máximo de 48 horas hasta reanudar el análisis.

### **7.16 Preparación de las muestras para análisis en HPLC/DAD:**

Nota 2 El análisis por HPLC/DAD se lleva a cabo después de que las muestras se analizan por GC/NPD y pretende cubrir los carbamatos no que se analizan o tiene pobre sensibilidad por GC/NPD para así cubrir a todos los inhibidores de colinesterasa.

**7.16.1** Saque del congelador los extractos para el análisis por HPLC y llévelos a temperatura ambiente. Debe incluir el blanco de sangre y el blanco de contenido gástrico, el blanco enriquecido de sangre, de contenido gástrico y las muestras incógnitas de ambas matrices.

**7.16.2** Agregue 200 µL de buffer de fosfatos pH 4,5 a los extractos de contenido gástrico preparados en 7.13.11. Aplique vortex por aproximadamente 30 segundos.

**7.16.3** Prepare jeringas de 3 mL de plástico quitando el émbolo y colocándoles en la salida un filtro de membrana de 7 mm de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro.

**7.16.4** Trasvase los extractos a la jeringa, coloque el émbolo y recoja el filtrado en un vial de 2 mL con un inserto de 200 µL. Para los extractos de contenido gástrico, que tienen más volumen, puede trasvasar directamente a los viales de autoinyector de polipropileno con filtro incorporado (0,2 µm), sin necesidad de filtrar con jeringa.

### **7.17 Creación de una secuencia de análisis en el equipo HPLC/DAD:**

**7.17.1** Abra el software "HPLC 1260 Online" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora, introduzca el usuario y la contraseña asignada. Vaya al menú "file" y luego "load" y dele clic en "method" y seleccione el método "ESPLAGUICIDAS DDDMMM\_AA.M".

**7.17.2** Vaya a la columna de la izquierda del equipo y en la pestaña "Sequence template" podrá ver todas las secuencias analizadas, seleccione una secuencia de plaguicidas y en "sequence", "load Sequence Template", revise la tabla de la secuencia y sálvela con la fecha del análisis en "Save Sequence Template as", modifique la fecha de análisis en "Sequence parameters" en "subdirectory" y proceda a elaborar la nueva secuencia.

**7.17.3** Cree una secuencia basándose en un archivo existente como se indicó en el punto anterior o en un archivo nuevo. Ver Anexo No. 4.

**7.17.4** Inicie la secuencia con un blanco de corrida, luego las diluciones 1/10 y 1/50 del CRM de plaguicidas ES-HPLC-XX, el blanco de sangre, el blanco enriquecido de sangre y de aquí en adelante ponga un grupo de muestras incógnitas, distribuya los controles entre las muestras incógnitas de manera que no queden más de diez muestras seguidas sin controles entre ellas. Repita el procedimiento anterior utilizando la matriz de contenido gástrico. Coloque en la secuencia el método "ESPLAGUICIDAS DDDMMM\_AA.M". Ver Anexo No. 4.

**7.17.5** La elaboración de la secuencia puede realizarse a través del lector de código de barras realizando la lectura de los indicios incluidos en el Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas".

**7.17.6** Coloque un blanco de corrida entre cada muestra de contenido gástrico para evitar arrastres por las altas concentraciones de analitos presentes en este tipo de muestra.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 21 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

- 7.17.7** Al final programe la inyección de un vial de blanco de corrida con el método "LAVADO COLUMNA 1.M" para la columna utilizada para que automáticamente la columna se lave y quede en metanol.
- 7.17.8** Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador, coloque un vial destapado con agua ultrapura (tipo 1) en la posición 100 para lavado automático de la aguja. Puede ver un ejemplo de una secuencia típica en el Anexo No. 4. Salve de nuevo la secuencia (Vaya al menú principal: "Séquense", "Save Sequence"). Solicite a un compañero que revise la secuencia antes de ponerla a correr en el equipo.
- 7.17.9** Cierre la válvula de drenaje de la bomba girándola a la derecha hasta que tope y un ligero giro más allá.
- 7.17.10** Vaya llenando la información necesaria en la bitácora de control de uso de equipo cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC-2). Para iniciar la secuencia oprima "START" (comando de color verde que se encuentra en la parte superior izquierda de la pantalla).
- 7.17.11** Al terminar el equipo, asegúrese que el método "LAVADO.M" este cargado, debajo del menú principal hay cejillas, la primera dice "Run and method control" y la segunda indica el método que está cargado. Si no lo está o el equipo se detuvo antes del final de la secuencia reinicie la secuencia o realice el lavado.
- 7.17.12** Al finalizar la secuencia sume el número de inyecciones a las que había en la secuencia anterior y escriba el número en la bitácora de control de uso de equipo cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC-2).
- 7.17.13** Para terminar, abra la válvula de drenaje de la bomba girándola a la izquierda.
- 7.17.14** Pase la línea B a la botella que contiene agua ultrapura (tipo 1), haga pasar agua por el canal B por 5 min a 5 mL/min. Luego pase las líneas D y B a la botella que contiene metanol y purgue cada una por 5 min. a un flujo de 5 mL/min con 100% de metanol.
- 7.17.15** Otra opción es la siguiente: Luego del lavado de la línea B con agua tipo I, pase las líneas D y B a la botella que contiene metanol y purgue todas las líneas a la vez por 20 min. a un flujo de 5 mL/min con 25% de metanol en cada línea.
- 7.17.16** Salga del programa "OpenLAB Chemstation" (en el menú: "file", la opción "exit").
- 7.18 Creación de una secuencia de análisis y corrida de muestras en GC/MS**
- 7.18.1** Tome en cuenta lo señalado para el análisis en serie en el Procedimiento para el MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.
- 7.18.2** Prepare los blancos de corrida poniendo al menos 1 mL de tolueno en viales de 2 mL para automuestreador. Prepare los que necesite según el número de extractos que va a inyectar (ver Anexo No. 4).
- 7.18.3** Refiérase al Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) para crear una secuencia basándose en un archivo existente.
- 7.18.4** Elabore la secuencia iniciando con un blanco de corrida, continúe con el blanco de matriz sangre, de aquí en adelante ponga un grupo de muestras incógnitas, las diluciones de la mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M y el blanco enriquecido de sangre, distribuidos entre las muestras incógnitas de manera que no queden 10 o más muestras seguidas sin controles entre ellas. Repita el procedimiento anterior utilizando la matriz de contenido gástrico.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 22 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

- 7.18.5** La elaboración de la secuencia puede realizarse a través del lector de código de barras realizando la lectura de los indicios incluidos en el Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas".
- 7.18.6** En el caso de las muestras de contenido gástrico debe colocarse un blanco de corrida entre cada muestra para evitar arrastres por las altas concentraciones de analitos presentes en este tipo de muestra.
- 7.18.7** Las condiciones del método "ESPLAGUICIDAS SIM-SCAN DDMM\_AA.M" se detallan en el Anexo 2.
- 7.18.8** Cargue el método "LIMPIEZA.M" en el último blanco de corrida de la secuencia. Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador. Salve la secuencia de nuevo. Solicite a un compañero que revise la secuencia antes de ponerla a correr en el equipo.
- 7.18.9** Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador. puede ver un ejemplo de una secuencia típica en el Anexo No. 4. Salve la secuencia con un nuevo nombre de archivo (vaya al menú "Sequence", y seleccione "Save sequence as") déle nombre a la secuencia según el formato ddmmaa y la letra A si es la primera secuencia que se guarda ese día, B si es la segunda y así consecutivamente, además una breve descripción.
- 7.18.10** Cargue el método "Descanso.M" (en el menú "file", "load", "method"). Ponga a correr la secuencia (en el menú "sequence", "run sequence"). Complete la información en el cuadro que aparece en la pantalla. El equipo analizará todos los viales según lo programado en la secuencia y luego cargará automáticamente el método "Descanso.M" nuevamente. Espere a que termine la secuencia antes de continuar.
- 7.18.11** Si la secuencia se detiene por alguna razón y luego debe reanudarse, guarde de inmediato las muestras en refrigeración o congelación por un máximo de 48 horas hasta reanudar el análisis.
- 7.19 Análisis de resultados cromatográficos en el equipo GC/NPD:**
- 7.19.1** Abra el software "ChemStation Offline" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora. Vaya al menú "view", "data analysis" y luego a "file", "load", "method" y seleccione el método ESPLAGUICIDAS DDMMM\_AA.
- 7.19.2** En el menú "file", "load signal", seleccione la señal correspondiente al CRM de plaguicidas ES-NPD-XX diluida 1/10. Si es necesario (no todos los analitos están siendo reconocidos), corrija los tiempos de retención hasta obtener un cromatograma similar al del Anexo No. 1. Repita para la dilución 1/50.
- 7.19.3** En el menú "file", "load signal", seleccione la señal correspondiente al blanco enriquecido de sangre para NPD y el blanco de sangre.
- 7.19.4** En el menú "file", "load signal", seleccione la señal correspondiente a las muestras incógnitas de sangre. Al hacer esto el programa le asignará el nombre del analito al pico que se encuentre en el tiempo de retención relativo de este analito  $\pm 1$  %. Cargue también la señal del blanco de corrida anterior a la muestra.
- 7.19.5** Revise la intensidad de los picos obtenidos. Si existe un pico identificado como alguno de los analitos en las dos columnas cromatográficas, la señal debe ser menor a la que presenta para la sustancia en el blanco enriquecido de sangre. Si la intensidad es mayor realice una dilución.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 23 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

- 7.19.6** Repita el análisis anterior para las muestras/blancos de contenido gástrico.
- 7.19.7** Si se inyectó una dilución de la muestra y no presentan picos cromatográficos o son de intensidad muy baja (<200 pA), debe inyectarse la muestra sin diluir.
- 7.19.8** Anote en el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas inhibidores de la colinesterasa" la dilución de la segunda inyección. Realice las diluciones correspondientes para la segunda inyección directamente en viales de 2 mL para autoinyector.
- 7.19.9** [Reporte los resultados de blancos y muestras en el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas"](#).
- 7.19.10** Imprima los cromatogramas en archivos PDF de todas las muestras incógnitas de sangre y contenido gástrico, así como las de los blancos en matriz y blancos enriquecidos.
- 7.20 Análisis de resultados cromatográficos en el equipo HPLC/DAD:**
- 7.20.1** Abra el software "HPLC 1260 Offline" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora, Introduzca el usuario y la contraseña asignada. Vaya al menú "method" y luego "load "method" y seleccione el método "ESPLAGUICIDAS DDDMMM\_AA.M".
- 7.20.2** En el menú "file" vaya al ícono "load signal" y busque la secuencia. Luego revise cada uno de los datos de la secuencia y verifique que el equipo los inyectó y capturó la señal.
- 7.20.3** Seleccione la señal correspondiente al CRM de plaguicidas ES-HPLC-XX diluida 1/10. Si es necesario (no todos los analitos están siendo reconocidos) corrija los tiempos de retención hasta obtener un cromatograma similar al del Anexo No. 1. Haga lo mismo para la dilución 1/50.
- 7.20.4** Luego seleccione la señal correspondiente al blanco enriquecido de sangre para HPLC, el blanco de sangre y las muestras incógnitas. Al hacer esto el programa le asignará el nombre del analito al pico que se encuentre en el tiempo de retención relativo de este analito  $\pm 2,5 \%$ .
- 7.20.5** Realice la comparación del espectro ultravioleta para cada analito y el estándar interno. Imprima también el espectro UV comparado contra la biblioteca carbamat.uvl o plaguicidas.uvl y la tabla índice de concordancia de la búsqueda. Cargue también la señal del blanco de corrida anterior a la muestra (en el menú "file", "load signal"). Imprima los cromatogramas en PDF de las muestras, los controles y la concordancia de los espectros.
- 7.20.6** Repita los pasos 7.10.2 a 7.10.4 para los blancos/muestras de contenido gástrico.
- 7.20.7** Salga del programa "Instrument 1 Offline" (en el menú: "file", la opción "exit"). No salve los cambios.
- 7.20.8** [Reporte los resultados de blancos y muestras en el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas"](#)
- 7.21 Análisis de resultados cromatográficos SIM en el GC/MS:**
- 7.21.1** Abra el software "GC-MS Data Analysis" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora. Vaya al menú "method", opción "load method" y seleccione el método Esplaguicidas SIM-SCAN DDDMMM\_AA.M
- 7.21.2** En el menú "file", "load signal", seleccione la señal correspondiente a la dilución 1/10 de la Mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M (Ver Anexo No. 1). Seleccione la señal de SIM (en el menú "file", opción "select signal", marcar solo la opción DATASIM.MS) Realice el ajuste de tiempos de retención, de intensidades relativas de los

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 24 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

iones calificadores y de relación de área de los compuestos, siguiendo el Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS). Utilice la dilución 1/50 de la Mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M para ajustar la relación de área, no ajuste los tiempos de retención ni las intensidades relativas.

**7.21.3** Cargue los cromatogramas correspondientes al blanco de sangre, blanco enriquecido de sangre y muestras incógnitas de sangre (en el menú "file", "load signal"). Seleccione la señal de SIM (en el menú "file", opción "select signal", marcar solo la opción DATASIM.MS). Realice el análisis de datos siguiendo el "Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) Imprima en PDF el resultado (en el menú "report", opción "generate report", opción "detailed to printer").

**7.21.4** Repita los puntos 7.19.2 y 7.19.3 para el análisis de muestras de contenido gástrico.

**7.22 Análisis de los resultados cromatográficos SCAN en el GC/MS:**

**7.22.1** En el menú "file", "load signal", seleccione el cromatograma correspondiente a las muestras incógnitas tanto de sangre como de contenido gástrico. Seleccione la señal de SCAN (en el menú "file", opción "select signal", marcar solo la opción DATA.MS). Realice la comparación con bibliotecas de espectros de masas siguiendo el "procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)". Imprima en PDF el resultado de las comparaciones.

**7.22.2** Revise las muestras incógnitas en busca de plaguicidas, medicamentos, drogas y agentes tóxicos en general siguiendo el "procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)".

**7.22.3** "Un match que esté arriba del 90% significa que el espectro de masas es muy similar y muy probablemente se trata de la sustancia identificada. Sin embargo, para establecer la identidad de la sustancia es necesario inyectarla en el equipo y obtener además una coincidencia en el tiempo de retención. Si no se cuenta con el estándar analítico para corroborar el tiempo de retención, debe reportarse solo la presencia de una sustancia con espectro de fragmentación de masas similar a la sustancia detectada.

**7.22.4** Si la identificación de los analitos se realiza en modo SCAN deben seguirse los criterios establecidos para tal fin, en el procedimiento para el manejo general de casos en las Sección de Toxicología Forense.

**8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:**

Un resultado se considerará positivo por algún analito en la muestra incógnita siempre y cuando se cumplan los siguientes puntos:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Que no se detecten analitos en los controles post-arrastre de la secuencia de verificación.	Que no se presenten señales de analitos que cumplan con los criterios de identificación.	Cambie el liner del equipo GC/NPD o GC/MS independientemente de las inyecciones acumuladas, cambie los viales de lavado de la jeringa, realice al menos 3 lavados a la jeringa en cada vial de lavado.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 25 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
			<p>Corra un blanco de tolueno con el método de limpieza.</p> <p>En el equipo HPLC/DAD realice nuevamente la purga de líneas con mayor tiempo y/o flujo y purgue la columna</p> <p>Reinyecte la secuencia de verificación. Si el problema persiste comuníquelo al Líder Técnico.</p>
2	Que se detecten los estándares internos en las muestras incógnitas.	Estándares internos con al menos el 50% de la respuesta de ese mismo estándar interno en los controles.	Ver Procedimiento para el MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.
3	Que en el blanco de muestra se detecten únicamente los estándares internos y que no se detecte el analito.	Que no se detecten los analitos de interés en el blanco de sangre ni en el blanco de contenido gástrico.	Repita la extracción de las muestras de la matriz contaminada. Si el estándar interno no se detectó, busque una muestra incógnita negativa con estándar interno que valide que no hay contaminación en las muestras de esa matriz.
4	Que estén presentes todos los analitos que se agregaron al blanco de matriz enriquecido con la disolución de CRM de plaguicidas.	Que se recuperen todos los analitos agregados a los blancos enriquecidos de sangre y contenido gástrico	Repita la extracción de las muestras salvo que por la información que se tiene del caso, los compuestos de interés no se perdieron en los blancos enriquecidos. En este caso se reportarán los resultados con una nota que indique cuales analitos no están incluidos en el análisis.
5	Que los picos cromatográficos para el analito sean integrados automáticamente, según los parámetros de integración del método, salvo situaciones justificadas.	No aplica	Realice en casos justificados, una integración manual del pico cromatográfico iniciando en un extremo de la base del pico y finalizando en el otro extremo; la integración manual es válida sólo si hay un error evidente debido a alguna particularidad de ese cromatograma. por ejemplo, la presencia de un interferente o una alta concentración del analito en la muestra.
6	Que en el blanco de corrida anterior a la muestra incógnita	No se detecten analitos ni estándar interno en el blanco de corrida previo a	Reemplace el blanco de corrida contaminado con un nuevo blanco de corrida, inyecte este blanco y reinyecte

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 26 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
	de contenido gástrico no se detecten analitos de interés	una muestra incógnita de C.G.	la muestra. Puede ser necesario en muestras con concentraciones bajas de analitos, realizar nuevamente la extracción de la muestra.
7	Que los analitos en la muestra incógnita cumplan los parámetros de identificación.	Que el tiempo de retención relativo del analito detectado no difiera en más de un 1% (en equipos GC/NPD y GC/MS) y más de 2.5 % (en equipo HPLC/DAD) con respecto de las mezclas de escrutinio de plaguicidas. Además, que el espectro UV del pico en la muestra incógnita, cuyo tiempo de retención coincide con el analito, tenga un índice de concordancia igual o mayor a 990 con respecto al espectro del analito de la biblioteca carbamat.uvl. Que las intensidades relativas de los iones calificadores de la sustancia detectada en GC/MS estén dentro de la variación aceptada para el método	Si algún analito en la muestra no cumple estos criterios de identificación no debe reportarse.

## 9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

## 10 Reporte de Análisis y Resultados:

**10.1** Las conclusiones a las que se puede llegar con el análisis de Organofosforados y Carbamatos dependen del resultado obtenido para la actividad de colinesterasa eritrocítica obtenido de la aplicación del PON correspondiente. Por lo tanto, las conclusiones sugeridas en los siguientes puntos son solo ejemplos y siempre debe tomarse en cuenta la colinesterasa.

**10.2** Un resultado positivo confirmado por algún plaguicida solo en contenido gástrico permite concluir:

"Se detectó en el contenido gástrico del (de la) occiso (a) el plaguicida "nombre del plaguicida". Su presencia indica que ingresó al organismo por vía oral."

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 27 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

**10.3** Un resultado positivo confirmado por algún plaguicida en sangre y en contenido gástrico permite concluir:

"En la sangre del (de la) occiso (a) se detectó el plaguicida "nombre del plaguicida". Además, su presencia en contenido gástrico indica que ingresó al organismo por vía oral."

**10.4** Cuando se detecte una sustancia solo por similitud del espectro UV comparado contra la biblioteca, se puede indicar en el cromatograma y/o en el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas: "Valorar nombre de la sustancia". Si la sustancia es de interés para el caso, su presencia debe ser confirmada por otra metodología.

**10.5** Cuando se detecte una sustancia solo por similitud del espectro de fragmentación de masas (Ver 7.20) se puede concluir:

"En la sangre (contenido gástrico) del (de la) occiso (a) se detectó una sustancia con un espectro de fragmentación de masas similar a" nombre de la sustancia".

**10.6** Siempre que se asegure algo en una conclusión debe complementarse el Dictamen Criminalístico con notas técnicas acerca de la toxicidad y las propiedades de la sustancia en cuestión y las referencias bibliográficas correspondientes.

**10.7** Los casos con resultados positivos o "no se detectó" se reportan como tales en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico.

**11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:**

- Los tubos con muestras deben transportarse dentro del laboratorio en las gradillas destinadas para este uso.
- Las muestras deben manipularse con todos los cuidados que requieren las muestras de origen biológico. Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.
- Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- No abra ningún recipiente con disolventes volátiles fuera de la capilla de extracción de gases.
- Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bioinfeccioso al jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.
- Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.
- Si ocurre algún derrame importante de disolventes o ácido en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.
- Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lávese las manos y deje la gabacha en la entrada de este.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 28 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

## 12 Simbología:

ACN:	acetonitrilo
aprox:	aproximadamente
CM:	carbamatos
C18:	octadecilsilica
C.G:	contenido gástrico
CRM:	material de referencia certificado
DCF:	Departamento de Ciencias Forenses.
DDMMM_AA:	se refiere a día mes y año, como por ejemplo 07DIC_20.
GC/NPD/NPD:	cromatografía de gases con doble detector de nitrógeno-fósforo
GC:	cromatógrafo de gases.
GC/MS:	<a href="#">cromatografía de gases con detector de masas.</a>
HPLC/DAD:	cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos
HPLC:	cromatógrafo líquido.
LD <sub>50</sub> :	Dosis letal 50%.
HAc:	Ácido acético
In. Hg.:	pulgadas de mercurio de vacío.
N/A:	no aplica.
NPD:	Detector de nitrógeno-fósforo.
OF:	organofosforados
p.a.:	calidad para análisis o calidad reactivo.
p.a.r.:	calidad para análisis de residuos o calidad cromatográfica.
psi:	libras por pulgada cuadrada.
PDF:	Formato de Documento Portátil
PON:	Procedimiento de Operación Normado.
PSA:	Primay Secondary Amine
RAS:	Registro de Análisis en Serie.
rpm:	revoluciones por minuto
SADCF:	Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses
SCD:	Solicitud Cambio Documental.
SGC:	Sistema de Gestión de Calidad.
SIM:	<a href="#">Monitoreo de Ion Selectivo</a>
SPE:	<a href="#">extracción en fase sólida.</a>
T.A:	temperatura ambiente
TRR:	tiempo de retención relativo
UAP:	Ultra Alta Pureza

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 29 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

UGC: Unidad de Gestión de Calidad

### 13 Terminología:

Analito: sustancia o componente que se desea determinar.

Blanco de matriz: contiene matriz blanco, además de todos los reactivos utilizados en la preparación, extracción, dilución, etc., de las muestras. Se nombra según la matriz que contiene (blanco de sangre, blanco de C.G)

Blanco de corrida: consiste en la inyección de disolvente o de fase móvil en un sistema cromatográfico para evidenciar ausencia de sustancias.

Blanco enriquecido de matriz: corresponde a un control preparado utilizando matriz blanco y enriquecido con los analitos, al que se aplican todos los procesos de una muestra incógnita o real. Permite verificar la eficiencia del proceso de extracción/partición, del SPE dispersivo en esa matriz y del sistema cromatográfico. Se nombra según la matriz que contiene (blanco enriquecido de sangre, blanco enriquecido de C.G, etc.).

Estándar interno: sustancia de comportamiento similar a los analitos de interés que se agrega a todas las muestras y controles para evidenciar las pérdidas de analitos durante el proceso de análisis.

Muestra incógnita: muestra de sangre, contenido gástrico que se desea analizar cualitativamente por plaguicidas.

### 14 Anexos

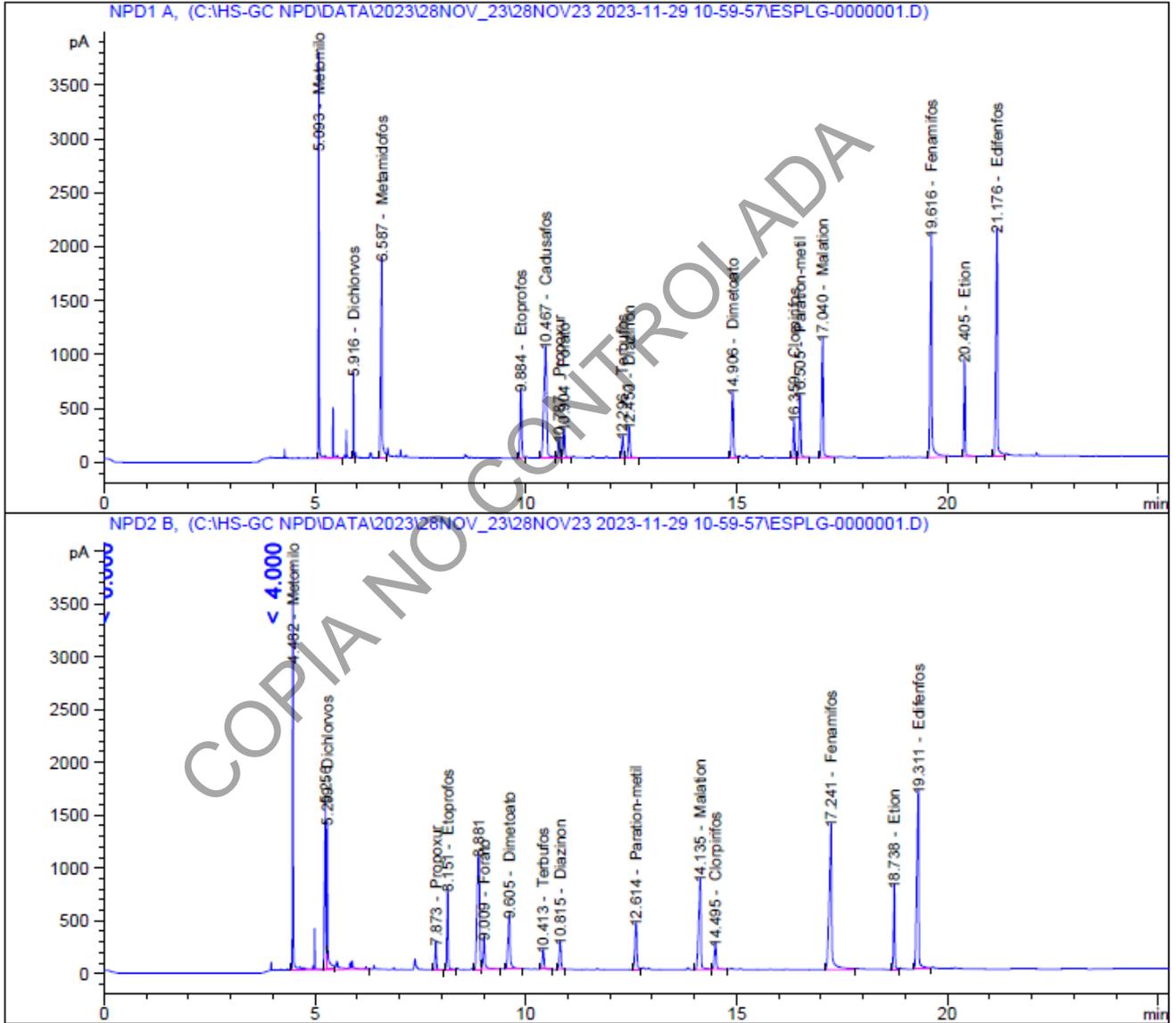
No. de Anexo	Nombre del Anexo
<b>1</b>	Cromatogramas GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS de las mezclas de plaguicidas.
<b>2</b>	Condiciones de los métodos instrumentales.
<b>3</b>	Preparación de reactivos.
<b>4</b>	Secuencia típica en GC/NPD, HPLC/DAD y GC/MS.
<b>5</b>	Parámetros de identificación de los plaguicidas OC y PR
<b>6</b>	Porcentajes de recuperación plaguicidas

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 30 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**Anexo No. 1 Cromatogramas GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS de las mezclas de plaguicidas.**

Sample Info : Mix sin extraer 1/10

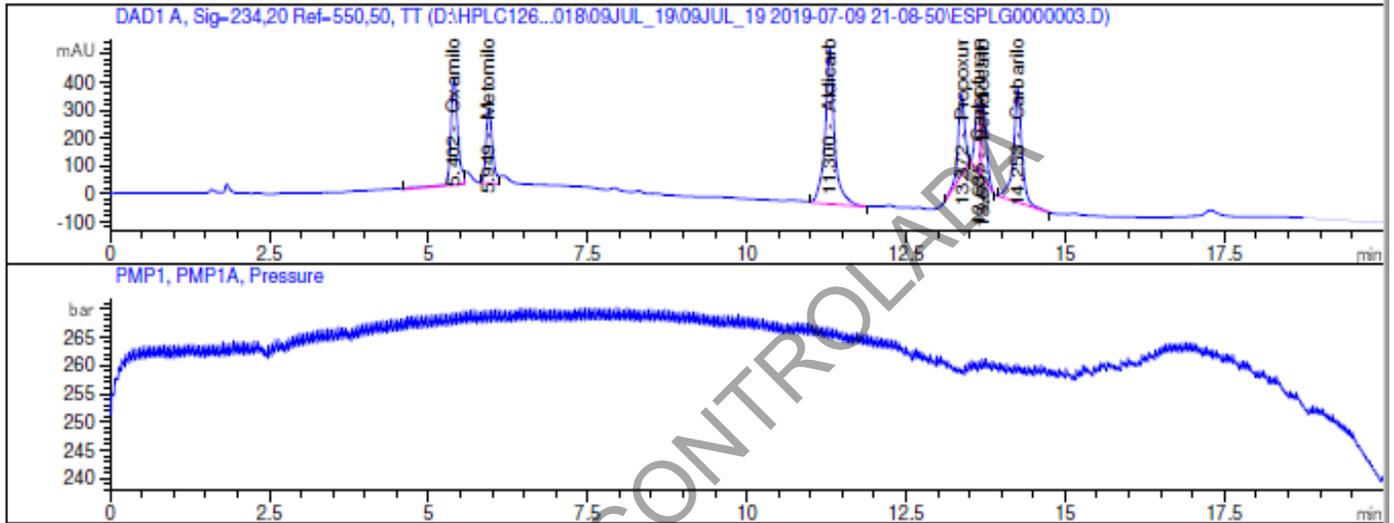
=====



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 31 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

Sample Info : MIX+ ESTANDAR INTERNO ES-HPLC-14, DILUIDO 1/10

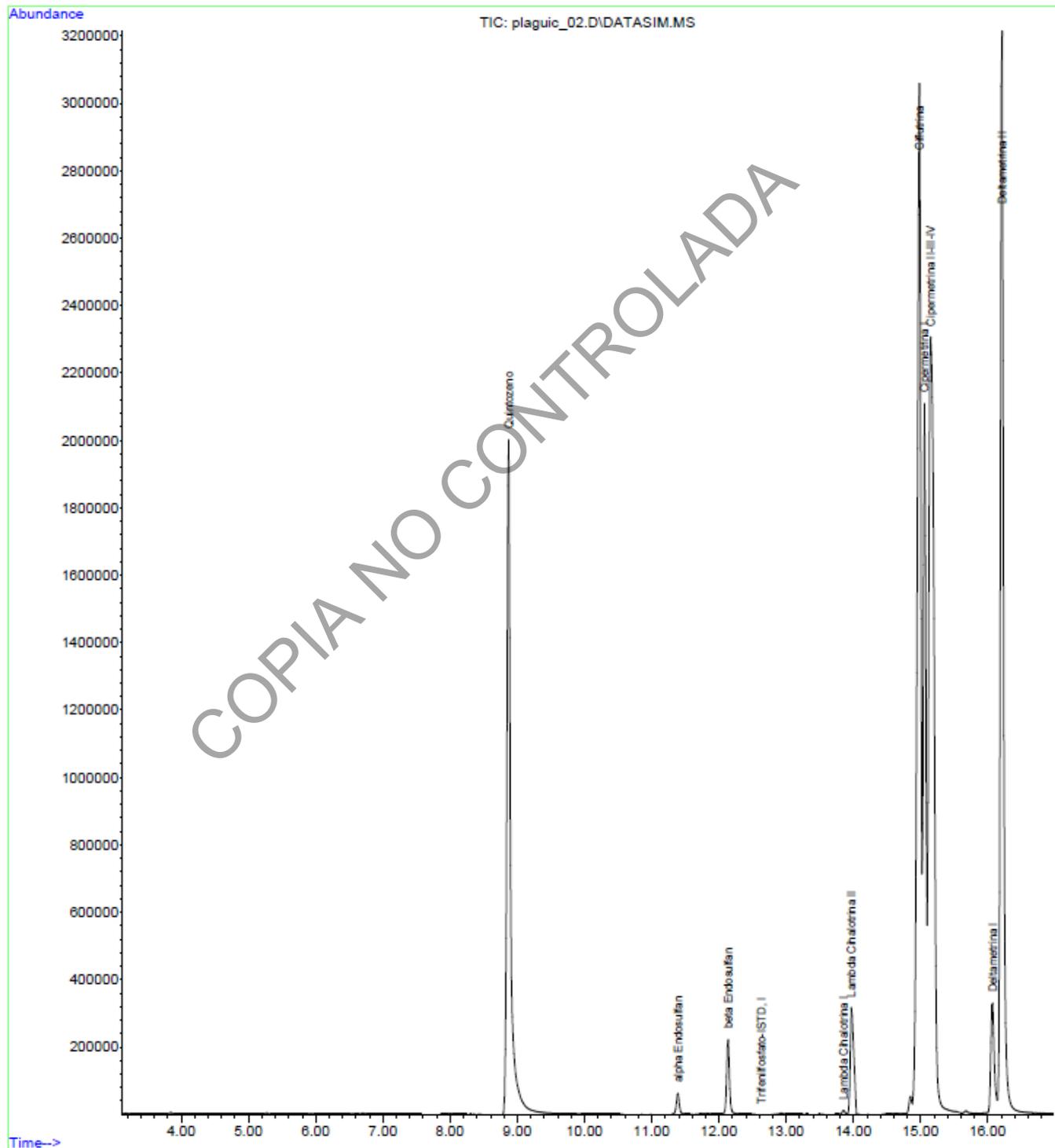
Additional Info : Peak(s) manually integrated



COPIA NO CONTROLADA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN  
MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y  
DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS****P-DCF-ECT-TOX-26**

Instrument : GCMS-1  
Sample Name: Mix sin extraer 1/10  
Misc Info : MIX+SI DILUIDO 1/10  
Vial Number: 2



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 33 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**Anexo No. 2**

**CONDICIONES DEL MÉTODO INSTRUMENTAL PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS POR GC/NPD**

Method: C:\HS-GC NPD\METHODS\ESPLAGUICIDAS 12DIC\_2023.M

Modified on: 12/07/2023 at 11:28:00 AM

Method Information

MÉTODO PARA EL ESCRUTINIO DE PLAGUICIDAS EN CONTENIDO GÁSTRICO

NPD1B: DB-1701 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

NPD2A: HP-5 MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

Injection Source and Location

Injection Source: GC Injector

Injection Location: Front

=====

6890 GC METHOD

=====

OVEN

Initial temp: 70 'C (On)      Maximum temp: 310 'C

Initial time: 2.00 min      Equilibration time: 1.00 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	40.00	180	5.00
2	5.00	205	0.00
3	10.00	280	3.00
4	0.0(Off)		

Post temp: 70 'C

Post time: 0.00 min

Run time: 25.2500 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Splitless

Initial temp: 250 'C (On)

Pressure: 19.8 psi (On)

Purge flow: 50.0 mL/min

Purge time: 1.50 min

Total flow: 56.3 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 15.0 mL/min

Saver time: 5.00 min

Gas type: Helium

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 34 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

COLUMN 1

Capillary Column

Model Number: Agilent 19091S-433  
 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane  
 Max temperature: 325 'C  
 Nominal length: 30.0 m  
 Nominal diameter: 250.00 um  
 Nominal film thickness: 0.25 um  
 Mode: ramped flow  
 Initial flow: 1.8 mL/min  
 Nominal init pressure: 19.8 psi  
 Average velocity: 39 cm/sec  
 Inlet: Front Inlet  
 Outlet: Back Detector  
 Outlet pressure: ambient

COLUMN 2

Capillary Column

Model Number: JW 122-0732  
 DB-1701 14% cianopropilfenil  
 Max temperature: 300 'C  
 Nominal length: 30.0 m  
 Nominal diameter: 250.00 um  
 Nominal film thickness: 0.25 um  
 Mode: (see column 1)  
 Nominal initial flow: 1.8 mL/min  
 Nominal init pressure: 19.8 psi  
 Average velocity: 39 cm/sec  
 Inlet: Front Inlet  
 Outlet: Front Detector  
 Outlet pressure: ambient

#	Rate	Final flow	Final time
1	0.20	2.0	5.00
2	0.0(Off)		

Initial time:  
17.50 min

FRONT DETECTOR (NPD)

Temperature: 320 'C (On)  
 Hydrogen flow: 3.0 mL/min (On)  
 Air flow: 60.0 mL/min (On)  
 Mode: Constant column+makeup flow  
 Combined flow: 7.0 mL/min  
 Makeup flow: On  
 Makeup Gas Type: Nitrogen  
 Adjust offset: 30.00  
 Electrometer: On  
 Bead: On  
 Equilibration time: 0.50

BACK DETECTOR (NPD)

Temperature: 320 'C (On)  
 Hydrogen flow: 3.0 mL/min (On)  
 Air flow: 60.0 mL/min (On)  
 Mode: Constant column+makeup flow  
 Combined flow: 7.0 mL/min  
 Makeup flow: On  
 Makeup Gas Type: Nitrogen  
 Adjust offset: 30.00  
 Electrometer: On  
 Bead: On  
 Equilibration time: 0.50

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz  
 Type: back detector  
 Save Data: On

SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz  
 Type: front detector  
 Save Data: On

TIME TABLE

Time Specifier	Parameter & Setpoint
0.10	Back NPD Fuel: Off
0.10	Front NPD Fuel: Off
3.60	Back NPD Fuel: On
3.60	Front NPD Fuel: On

GC INJECTOR

Front Injector:

Sample Washes 1  
 Sample Pumps 4  
 Injection Volume 2.00 microliters

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 35 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

Syringe Size            10.0 microliters  
PreInj Solvent A        Washes 2  
PreInj Solvent B        Washes 2  
PostInj Solvent A       Washes 2  
PostInj Solvent B       Washes 2  
Plunger Speed           Fast

Calibration Table

ESCRUTINIO

Calib. Data Modified : 12/7/2023 11:27:57 AM

Rel. Reference Window : 1.000 %

Abs. Reference Window : 0.000 min

Rel. Non-ref. Window : 1.000 %

Abs. Non-ref. Window : 0.000 min

Uncalibrated Peaks : not reported

Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated

Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear

Origin : Ignored

Weight : Equal

Recalibration Settings:

Average Response : Average all calibrations

Average Retention Time: No Update

Signal 1: NPD1 A

Signal 2: NPD2 B

RetTime Lvl Amount Area Amt/Area Ref Grp Name

[min] Sig [µg/mL]

RetTime	Lvl	Amount	Area	Amt/Area	Ref	Grp	Name
4.473	2	1	1.00000	2671.37609	3.74339e-4	1	Metomilo
5.088	1	1	1.00000	2312.21024	4.32487e-4	2	Metomilo
5.215	2	1	1.00000	5184.48047	1.92883e-4	1	Metamidofos
5.291	2	1	1.00000	1416.60358	7.05914e-4	1	Dichlorvos
5.912	1	1	1.00000	1311.16412	7.62681e-4	2	Dichlorvos
6.558	1	1	1.00000	4482.72021	2.23079e-4	2	Metamidofos
7.845	2	1	1.00000	435.69067	2.29521e-3	1	Propoxur
8.137	2	1	1.00000	1674.89001	5.97054e-4	1	Etoprofos
8.810	2	1	1.00000	1.02082e4	9.79606e-5	1	Cadusafos
9.001	2	1	1.00000	1518.27438	6.58642e-4	1	Forato
9.583	2	1	1.00000	1063.32013	9.40451e-4	1	Dimetoato
9.870	1	1	1.00000	4003.98456	2.49751e-4	2	Etoprofos
10.395	2	1	1.00000	1079.75000	9.26140e-4	1	Terbufos
10.451	1	1	1.00000	8350.21362	1.19757e-4	2	Cadusafos
10.799	1	1	1.00000	333.84019	2.99545e-3	2	Propoxur
10.821	2	1	1.00000	1348.65479	7.41480e-4	1	Diazinon
10.900	1	1	1.00000	1691.38480	5.91232e-4	2	Forato
12.292	1	1	1.00000	1221.57474	8.18615e-4	2	Terbufos
12.486	1	1	1.00000	1582.46487	6.31926e-4	2	Diazinon
12.614	2	1	1.00000	1008.47058	9.91601e-4	1	Paration-metil
14.097	2	1	1.00000	3789.86926	2.63861e-4	1	Malation
14.486	2	1	1.00000	810.73233	1.23345e-3	1	Clorpirifos

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 36 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

14.907 1 1 1.00000 1945.44263 5.14022e-4 2 Dimetoato  
16.361 1 1 1.00000 919.04355 1.08809e-3 2 Clorpirifos  
16.509 1 1 1.00000 1493.33789 6.69641e-4 2 Paration-metil  
17.040 1 1 1.00000 2957.62207 3.38109e-4 2 Malation  
17.212 2 1 1.00000 7821.97485 1.27845e-4 1 Fenamifos  
18.738 2 1 1.00000 1749.24902 5.71674e-4 I1 Etion  
19.266 2 1 1.00000 3639.56726 2.74758e-4 1 Edifenfos  
19.560 1 1 1.00000 7858.11084 1.27257e-4 2 Fenamifos  
20.472 1 1 1.00000 1938.73242 5.15801e-4 I2 Etion  
21.146 1 1 1.00000 3533.57773 2.82999e-4 2 Edifenfos

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 37 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**CONDICIONES DEL MÉTODO INSTRUMENTAL PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS  
POR HPLC/DAD**

Method: D:\HPLC1260\METHODS\ESPLAGUICIDAS 11NOV\_14.M  
Modified on: 18/12/2009 at 08:34:55 a.m.

Method Information

METODO PARA EL ESCRUTINIO DE PLAGUICIDAS INHIBIDORES DE COLINESTERASA  
(CARBAMATOS)-COLUMNNA C8 3,0 mm X 150 mm X 3,5 µm

=====

DAD

=====

DAD (G1315C)

=====

Peakwidth: >0.05 min (1.0 s response time) (5 Hz)  
Slit: 4 nm  
UV Lamp Required: Yes  
Vis Lamp Required: Yes

Analog Output 1  
Analog 1 Attenuation: 1000 mAU  
Analog 1 Zero Offset: 5 %

Analog Output 2  
Analog 2 Attenuation: 1000 mAU  
Analog 2 Zero Offset: 5 %

Signals

Signal table

Use Sig.	Signal	Wavelength nm	Bandwidth nm	Use Ref.
Yes	Signal A	234	20	Yes
Yes	Signal B	254	20	Yes
Yes	Signal C	280	20	Yes
Yes	Signal D	210	20	Yes
No	Signal E			
No	Signal F			
No	Signal G			
No	Signal H			

Ref Wavel. nm	Ref Bandw. nm
550	50
550	50
550	50
550	50

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 38 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

Prepare Mode

Margin for negative Absorbance: 100 mAU

Autobalance

Autobalance Prerun: Yes

Autobalance Postrun: No

Spectrum

Spectrum Range WL from: 190 nm

Spectrum Range WL to: 605 nm

Spectrum Step: 2.0 nm

Spectrum Store: All

Stoptime

Stoptime Mode: As pump/injector

Posttime Mode: Off

Timetable

Time Function	Parameter
-----	
0.00 Change Signal	Signal A, Wavel.: 234 nm, Bandw.: 20 nm, UseRef: On, Ref Wavel.: 550 nm, Ref Bandw.: 50 nm
7.50 Change Signal	Signal A, Wavel.: 210 nm, Bandw.: 10 nm, UseRef: On, Ref Wavel.: 550 nm, Ref Bandw.: 50 nm

Instrument Curves

Store Board Temperature: No

Store Optical Unit Temperature: No

Store UV Lamp Anode Voltage: No

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 39 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

```

=====
                        Column Comp.
=====|=====

```

```

Column Comp. (G1316A)
=====

```

```

Valve Position:                               Port 1 -> 6

```

```

Left Temperature Control
Temperature Control Mode:                     Temperature Set
Temperature:                                  24.00 °C

```

```

Enable Analysis Left Temperature
Enable Analysis Left Temperature On:          Yes
Enable Analysis Left Temperature Value:      0.80 °C

```

```

Right Temperature Control
Right temperature Control Mode:               Temperature Set
Right temperature:                           24.00 °C

```

```

Enable Analysis Right Temperature
Enable Analysis Right Temperature On:        Yes
Enable Analysis Right Temperature Value:     0.80 °C

```

```

Stop Time
Stoptime Mode:                               As pump/injector

```

```

Post Time
Posttime Mode:                               Off

```

```

Instrument Curves
Store Left Temperature:                       Yes
Store Right Temperature:                     Yes

```

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 40 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

=====+=====

Sampler

=====

Sampler (G1329B)

=====

Auxiliary

Draw Speed: 200 µL/min  
 Eject Speed: 200 µL/min  
 Draw Position Offset: 0.0 mm

Injection

Injection Mode: Injection with needle wash  
 Injection Volume: 15.00 µL

Needle Wash

Needle Wash Location: Wash Vial  
 Wash Location: Vial 100

High throughput

Overlapped Injection

Enable Overlapped Injection: Yes  
 Overlapped Injection Start Mode: Prefetch Vial  
 Overlapped Injection Wait Time: 18.00 min

Stop Time

Stoptime Mode: As pump/No limit

Post Time

Posttime Mode: Off

Timetable

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 41 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

=====  
Quat. Pump  
=====

Quat. Pump (G1311B)  
=====

Flow: 0.600 mL/min  
Low Pressure Limit: 0.00 bar  
High Pressure Limit: 370.00 bar  
Maximum Flow Gradient: 100.000 mL/min<sup>2</sup>  
Primary Channel: Automatic

Stroke  
Automatic Stroke Calculation: Yes

Compress  
Compressibility Mode: Compressibility Value Set

Compressibility: 100 10e-6/bar

Stop Time  
Stoptime Mode: Time set  
Stoptime: 20.00 min

Post Time  
Posttime Mode: Time set  
Posttime: 9.00 min

Solvent Composition

Channel	Name 1	Used	Percent %
A	METANOL	Yes	0.0
B	BUFFER pH 4,5	Yes	90.0
C	ACETONITRILO	Yes	10.0
D	AGUA	Yes	0.0

Timetable

Time min	A %	B %	C %	D %	Flow mL/min	Pressure bar
12.00	0.0	53.0	47.0	0.0	0.600	370.00
15.00	0.0	53.0	47.0	0.0	0.600	370.00
20.00	0.0	20.0	80.0	0.0	0.650	370.00

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 42 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

Instrument Curves

Store Pressure:	Yes
Store Flow:	Yes
Store Solvent Ratio A:	Yes
Store Solvent Ratio B:	Yes
Store Solvent Ratio C:	Yes
Store Solvent Ratio D:	Yes
Store Direction of Piston A:	Yes

-----  
 General Calibration Setting  
 -----

Calib. Data Modified : 3/21/2018 5:58:13 PM

Rel. Reference Window : 2.000 %  
 Abs. Reference Window : 0.000 min  
 Rel. Non-ref. Window : 2.000 %  
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min  
 Uncalibrated Peaks : not reported  
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated  
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear  
 Origin : Included  
 Weight : Equal

Recalibration Settings:  
 Average Response : Average all calibrations  
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :  
 Printout of recalibrations within a sequence:  
 Calibration Table after Recalibration  
 Normal Report after Recalibration  
 If the sequence is done with bracketing:  
 Results of first cycle (ending previous bracket)

-----  
 Signal Details  
 -----

Signal 1: DAD1 A, Sig=234,20 Ref=550,50, TT

-----

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 43 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

-----  
 Overview Table  
 -----

RT	Sig	Lvl	Amount [µg/mL]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD #	Compound
4.385	1	1	1.00000	27.46954	3.64040e-2	No	No	Oxamilo
		2	10.00000	158.26068	6.31869e-2			
4.858	1	1	1.00000	17.05470	5.86349e-2	No	No	Metomilo
		2	10.00000	98.75584	1.01260e-1			
9.997	1	1	1.00000	75.57011	1.32327e-2	No	No	Aldicarb
		2	10.00000	525.81757	1.90180e-2			
12.039	1	1	1.00000	24.13174	4.14392e-2	No	No	Propoxur
		2	10.00000	169.53120	5.89862e-2			
12.318	1	1	1.00000	54.34680	1.84003e-2	No	No	Carbofuran
		2	10.00000	271.99817	3.67650e-2			
12.429	1	1	1.00000	2046.83679	4.88559e-4	No	No	Bendiocarb
12.986	1	1	1.00000	55.79853	1.79216e-2	No	No	Carbarilo
		2	10.00000	321.08307	3.11446e-2			
15.493	1	1	1.00000	102.41303	9.76438e-3	No	No	Metiocarb
		2	10.00000	529.36823	1.88904e-2			

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 44 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**CONDICIONES DEL MÉTODO INSTRUMENTAL PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS POR GC/MS**

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS-1

-----  
D:\GC-MS 5975C\Methods\Esplaguicidas SIM- 11dic\_23.M

Control Information

-----

Sample Inlet: GC	Injection Source: External Device
Mass Spectrometer: Enabled	Injection Location: Front
GC Run Time: 17 min	Post Run Time: 2 min

Oven

Temperature Setpoint: On	(Initial): 70 °C
Hold Time: 1 min	Post Run: 325 °C
Program	
#1 Rate: 15 °C/min	#1 Value: 280 °C
#1 Hold Time: 0 min	#2 Rate: 10 °C/min
#2 Value: 300 °C	#2 Hold Time: 0 min
Equilibration Time: 0.5 min	Max Temperature: 325 °C
Maximum Temperature Override: Disabled	
Slow Fan: Disabled	

Front SS Inlet He

Mode: Splitless	Heater: On 240 °C
Pressure: On	16.302 psi
Total Flow: On	55.4 mL/min
Septum Purge Flow On	3 mL/min
Gas Saver Off	Purge Flow to Split Vent 50 mL/min at 1.5 min

Thermal Aux 1 (MSD Transfer Line)

Temperature Setpoint: On	(Initial): 300 °C
Post Run: 0 °C	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 45 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

Column #1

Flow

Setpoint Off (Initial) 2.4 mL/min  
 Post Run 1.4154 mL/min Agilent 122-5512UI: 02 DB-5ms Ultra Inert -60 °C—  
 325 °C (325 °C): 15 m x 250 µm x 0.25 µm  
 In Front SS Inlet He Out Aux EPC 2  
 (Initial) 70 °C Pressure 16.302 psi  
 Flow 2.4 mL/min Average Velocity 55.728 cm/sec  
 Holdup Time 0.44861 min

Column #2

Flow

Setpoint Off (Initial) 3.3 mL/min  
 Post Run 5.1656 mL/min Agilent 160-2625-10 Ret Gap 0.15 mm-60 °C—325  
 °C (325 °C): 0.65 m x 150 µm x 0 µm  
 In Aux EPC 2 He Out MSD  
 (Initial) 70 °C Pressure 2.6925 psi  
 Flow 3.3 mL/min Average Velocity 454.12 cm/sec  
 Holdup Time 0.0023856 min Column Outlet Pressure 0 psi

Aux EPC 1 He

Pressure Setpoint Off

Aux EPC 2 He Supplies Column 2

Aux EPC 3 He

Pressure Setpoint Off

GERSTEL MAESTRO

SYSTEM SETTINGS

Maestro Runtime : 19.00 min GC Cool Down Time : 4.00 min  
 GERSTEL MPS Liquid Injection Syringe : 10ul

SAMPLE PARAMETERS

Sandwich : not used Inj. Volume : 2.0 uL  
 Air Volume below : 0.0 uL Inj. Speed : 50.00 uL/s

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 46 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

Fill Volume : 5.0 uL                      Fill Strokes : 1  
 Fill Speed : 5.00 uL/s                      Viscosity Delay : 0 s  
 Eject Speed : 50.00 uL/s                      Pre Inj. Delay : 0 s  
 Post Inj. Delay : 0 s                      Inj. Penetration : 40.00 mm  
 Sample Tray Type : VT98                      Vial Penetration : 27.00 mm

#### CLEANING PARAMETERS

Preclean Sample : 0                      Wash Station 1 : Wash1  
 Preclean Solv.1 : 2                      Postclean Solv.1 : 2  
 Fill Speed Solv.1 : 5.00 uL/s                      Viscosity Delay Solv.1 : 0 s  
 Eject Speed Solv.1 : 50.00 uL/s                      Wash Station 2 : Wash2  
 Preclean Solv.2 : 2                      Postclean Solv.2 : 2  
 Fill Speed Solv.2 : 5.00 uL/s                      Viscosity Delay Solv.2 : 0 s  
 Eject Speed Solv.2 : 50.00 uL/s

#### MS Information

Method file	D:\GC-MS_5975C\Methods\Esplaguicidas SIM 11dic_23.M
Tune file	atune.tu
Ion source	EI
Source temperature (°C)	230
Quad temperature (°C)	150
Fixed Electron energy (eV)	70.3
Acquisition Type	SIM/Scan
Stop time (min)	650.00
Solvent delay (min)	3.00
Trace Ion Detection	True
Gain Factor	4
EM Saver	True
EM Saver Limit	100000000

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 47 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

**Scan Time Segments**

Time	Start Mass	End Mass	Threshold	Scan Speed
3.00	40	570	150	1,562 [N=2]

**Timed Events**

Time	Type of Event	Parameter
------	---------------	-----------

**Real-Time Plots**

Type of Plot	Label	Low Mass	High Mass
Total Ion	N/A	N/A	N/A
Spectrum	N/A	N/A	N/A
Extracted Ion	Scan 1-1	50	550

**SIM Time Segment 1**

<b>Group Name</b>	Quintozeno		
<b>Start Time</b>	3.00		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
213.9	100	NO	
236.8	100	YES	
248.9	100	NO	
294.8	100	NO	

**SIM Time Segment 2**

<b>Group Name</b>	aEndosulfan		
<b>Start Time</b>	10.90		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
194.9	100	NO	
236.8	100	NO	
276.9	100	YES	

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN  
MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y  
DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS**

**P-DCF-ECT-TOX-26**

**SIM Time Segment 3**

<b>Group Name</b>	bEndosulfan		
<b>Start Time</b>	11.67		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
194.9	100	YES	
236.9	100	NO	
264.9	100	YES	
276.9	100	NO	

**SIM Time Segment 4**

<b>Group Name</b>	TFF		
<b>Start Time</b>	12.50		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
325	100	NO	
326	100	YES	

**SIM Time Segment 5**

<b>Group Name</b>	Cihalotrina		
<b>Start Time</b>	13.52		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
141	100	NO	
181	100	YES	
197	100	YES	
208.1	100	NO	

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN  
MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y  
DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS**

**P-DCF-ECT-TOX-26**

**SIM Time Segment 6**

<b>Group Name</b>	Ciflutrina-Cipermetrina		
<b>Start Time</b>	14.45		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
162.9	50	NO	
165	50	NO	
180.9	50	NO	
199.1	50	NO	
206	50	NO	
208.1	50	NO	
209.1	50	NO	
226.1	50	YES	

**SIM Time Segment 7**

<b>Group Name</b>	Deltametrina		
<b>Start Time</b>	15.55		
<b>Resolution</b>	High		
<b>Detector EMV Override</b>			
<b>Ion mass-to-charge</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>Plot This Ion?</b>	<b>Label</b>
174	100	NO	
181.1	100	NO	
209.1	100	NO	
252.9	100	NO	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 50 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**Anexo No. 3**  
**Preparación de Reactivos**

**Disolución de cloro al 0,5 %:**

Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro al 0,5%, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

donde:

(CD): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V)= Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

Utilice una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente(V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro al 0.5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL). Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua desionizada necesario para completar el volumen de la disolución de cloro al 0,5% deseado.

Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de cloro al 0,5%" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara. Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 1 mes.

**Preparación de disolución 1 M de ácido fosfórico:**

Mida 17 mL de ácido fosfórico concentrado (80-85%) p.a. con probeta de 25 mL y deposítelos en una probeta de 250 mL. Lleve a 250 mL con agua tipo I.

Pase a una botella de vidrio de 500 mL con tapa de vidrio esmerilada.

Almacene a temperatura ambiente.

Identifique la botella y rotule. La recomendación de su estabilidad es de 6 mes después de preparada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 51 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**Preparación de buffer de fosfatos pH 4,5 para HPLC/DAD por carbamatos:**

En un beaker de 50 mL pese 1,36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> utilizando balanza semianalítica. Trasvase cuantitativamente a un balón de 1 L.

Filtre esta disolución con un filtro de nylon de 0,45 µm y traslade el filtrado a una probeta de 1 L. Mida el volumen de la disolución.

Agregue 2,8 mL por litro de trietilamina con pipeta de vidrio graduada de 5 mL y trasvase inmediatamente a un beaker de 1 L. Tape con papel aluminio.

Ajuste el pH hasta 5,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado y luego a pH 4,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M.

Conserve un poco del buffer en un beaker de 100 mL para preparar fase móvil. Deposite el resto en la botella ámbar para el buffer del HPLC.

Este buffer debe utilizarse para correr el día que se preparó o al día siguiente conservado en refrigeración, si no es así descártelo.

**Preparación de fase móvil para HPLC/DAD por carbamatos:**

En un beaker de 100 mL, deposite 20 mL de acetonitrilo p.a.r. y 80 mL de buffer de fosfatos de pH 4,5. Rotule apropiadamente.

Utilice inmediatamente antes de utilizar y luego descártela.

**Preparación de Acetonitrilo con 1 % de HAc:**

Mida 10 mL de ácido acético glacial con probeta de 10 mL y deposítelos en una probeta de 1 L. Afore a 1 L con acetonitrilo p.a.r.

Deposite en una botella de vidrio de 1 L provista con un dispensador de disoluciones de 1-10 mL. Identifique la botella y rotule. La recomendación de su estabilidad es de 6 meses después de preparada.

**Preparación de 100 g de la mezcla de sulfato de magnesio/acetato de sodio para QuEChERS (AOAC):**

En una botella plástica de 200 mL pese 80 g de sulfato de magnesio anhidro para QuEChERS y 20 g de Acetato de sodio anhidro para QuEChERS utilizando balanza semianalítica. Agite fuertemente la botella hasta homogenizar por completo. Rotule y guarde en desecación por un máximo de 6 meses.

**Preparación de tubos con mezcla prepesada de extracción QuEChERS (AOAC) con proporción 8/2 de sulfato de magnesio/acetato de sodio:**

Se puede utilizar la mezcla preparada en el punto anterior o la adquirida comercialmente en sobres o tubos de plástico que viene normalmente en presentación de 7,5 g.

Deposite la mezcla de sulfato de magnesio/acetato de sodio en un beaker de 50 mL. Vaya depositando porciones pequeñas conforme vaya necesitando y mantenga el beaker tapado con papel aluminio.

En tubos de ensayo (13 x 75 o 13 x 100 de plástico o vidrio, nuevos o lavados) y utilizando la balanza semianalítica:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 52 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

Pese 1g de la mezcla de sulfato de magnesio/acetato de sodio para QuEChERS para muestras de contenido gástrico.

Pese 2 g de la mezcla de sulfato de magnesio/acetato de sodio para QuEChERS para muestras de sangre. Rotule y guarde en desecación por un máximo de 6 meses.

**Preparación de 25 g de la mezcla de sulfato de magnesio/PSA/C18 para limpieza QuEChERS (AOAC):**

En una botella plástica de 100 mL pese 15 g de sulfato de magnesio anhidro para QuEChERS, 5 g de Primary Secondary Amine (PSA) para QuEChERS y 5 g de Octadecilsilica (C18) para QuChERS utilizando balanza semianalítica. Agite fuertemente la botella hasta homogenizar por completo. Rotule y guarde en desecación por un máximo de 6 meses.

**Preparación de Microtubos de limpieza para SPE dispersivo:**

Deposite la mezcla de sulfato de sulfato de magnesio/PSA/C18 en un beaker de 10 mL. Vaya depositando porciones pequeñas conforme vaya necesitando y mantenga el beaker tapado con papel aluminio.

En microtubos de 1,5-2 mL de tapa rosca o a presión pese utilizando balanza semianalítica; 250 mg de la mezcla. Rotule y guarde en desecación por un máximo de 1 año.

**Preparación de disoluciones madre de plaguicidas.**

Busque el material de referencia (patrones) de las sustancias que desea preparar. Pese el patrón antes de utilizarlo en la balanza analítica y anote la información necesaria en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Pese alrededor de 20 mg de la sustancia en un balón aforado de 5 mL, utilice balanza analítica.

Vuelva a pesar el patrón y anote en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Afore el balón con un disolvente apropiado para la sustancia (tolueno, metanol, acetonitrilo, acetona).

Utilice el "Registro de Preparación de disoluciones" con toda la información requerida. En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por medición" y calcule la concentración de la sustancia tomando en cuenta la masa pesada, la pureza del patrón, el volumen de la disolución madre y si es necesario la relación de la masa de la sustancia base y la de la sustancia de patrón (cuando el patrón no es de la droga base si no de un hidrocloreuro o de un hidrato, por ejemplo).

Pase a un vial ámbar silanizado de 5 mL con tapa con teflón. Conserve en congelación durante un máximo de un año.

Codifique la disolución madre con el código interno del material de referencia empleado más la letra "M" (de madre) y el número que corresponde al día-mes-año de la preparación. Rotule con la identificación de la sustancia, la concentración, la fecha de preparación, el disolvente y las iniciales de quién prepara.

Anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y control de material de referencia" para cada una de las madres.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 53 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>

**Preparación de la disolución de CRM de plaguicidas para NPD (ES-NPD-0X) MIX y estándar interno:**

Para preparar el CRM y el estándar interno, saque del congelador las madres de los plaguicidas correspondientes según los siguientes cuadros:

**Composición del CRM y el estándar interno ES-NPD-0X.**

NOMBRE	Concentración del CRM ES-NPD-0X estándar interno (µg /mL)
Etion	500

NOMBRE	Concentración en el CRM ES-NPD-0X.M MIX (µg /mL)	NOMBRE	Concentración en el CRM ES-NPD-0X.M MIX (µg /mL)
Diazinon	75	Terbufos	75
Edifenfos	1475	Clorpirifos	75
Fenamifos	500	Dichlorvos	150
Paration-metil	150	Dimetoato	150
Malation	500	Cadusafos	500
Metamidofos	750	Etoprofos	150
Metomilo	750	Forato	75
Propoxur	750		

Coloque las disoluciones madre en la capilla y espere a que alcancen temperatura ambiente.

Pese las disoluciones madre antes de utilizarlas en la balanza analítica y anote la información necesaria en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Para calcular la cantidad de cada disolución madre necesaria utilice la siguiente fórmula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cm) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

donde:

(Cd): Concentración deseada

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cm): Concentración de la disolución madre de la sustancia.

(V)= Volumen en mililitros requerido de la disolución madre.

Este cálculo se realiza automáticamente al llenar el formulario "Registro de preparación de disoluciones". En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por concentración"

Tome el volumen calculado de la solución madre de cada analito utilizando un equipo volumétrico adecuado y deposítelo en un balón aforado para la mezcla y otro para el estándar interno que

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 54 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

corresponda con el volumen final calculado. Afore con tolueno. Trasvase a viales de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con código interno, concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación durante un máximo de un año.

**Preparación de la disolución de CRM de plaguicidas para HPLC (ES-HPLC-0X) y estándar interno:**

Para preparar el CRM y el estándar interno, saque del congelador las madres de los plaguicidas correspondientes según el cuadro:

**Composición del CRM y el estándar interno de ES-HPLC-0X**

<b>NOMBRE</b>	<b>Concentración en el CRM ES-HPLC-0X estándar interno (µg /mL)</b>
Bendiocarb	500

<b>NOMBRE</b>	<b>Concentración en el CRM ES-HPLC-0X.M MIX (µg /mL)</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>Concentración en el CRM ES-HPLC-0X.M MIX (µg /mL)</b>
Aldicarb	1000	Oxamilo	400
Carbofura	300	Carbarilo	150
Propoxur	600	Metomilo	250

Coloque las disoluciones madre en la capilla y espere a que alcancen temperatura ambiente.

Pese las disoluciones madre antes de utilizarlas en la balanza analítica y anote la información necesaria en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Para calcular la cantidad de cada disolución madre necesaria utilice la siguiente fórmula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cm) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

donde:

(Cd): Concentración deseada

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cm): Concentración de la disolución madre de la sustancia.

(V)= Volumen en mililitros requerido de la disolución madre.

Este cálculo se realiza automáticamente al llenar el formulario "Registro de preparación de disoluciones". En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por concentración"

Tome el volumen calculado de la solución madre de cada analito utilizando un equipo volumétrico adecuado y deposítelo en un balón aforado para la mezcla y otro para el estándar interno que corresponda con el volumen final calculado. Afore con tolueno. Trasvase a viales de 5 mL ámbar

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 55 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

silanizado con tapa con teflón. Rotule con código interno, concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación durante un máximo de un año.

### **Preparación de la mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, ES-MS-0X.M:**

Saque del congelador las disoluciones madre de los plaguicidas correspondientes (Ver Anexo No. 5). Colóquelas en la capilla de extracción o en la cabina de bioseguridad clase 2-B2 y espere aproximadamente 20 minutos a que alcancen temperatura ambiente. Péseles en la balanza analítica y anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y control de material de referencia" para cada una de las madres.

Determine el volumen que necesita de las disoluciones madre para preparar el volumen requerido de la mezcla de escrutinio de plaguicidas para GC/MS, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cm) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

donde:

(Cd): Concentración deseada

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cm): Concentración de la disolución madre de la sustancia.

(V)= Volumen en mililitros requerido de la disolución madre.

Este cálculo se realiza automáticamente al llenar el formulario "Registro de preparación de disoluciones". En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por concentración"

Tome el volumen calculado de la solución madre de cada analito utilizando un equipo volumétrico adecuado y deposítelo en un balón aforado que corresponda con el volumen final calculado. Afore con tolueno. Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con código interno, concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación.

### **Preparación de la Disolución de estándar interno (Trifenilfosfato) (ES-MS-0X) para GC/MS:**

Saque del congelador la disolución madre de trifenílfosfato. Colóquela en la capilla de extracción o en la cabina de bioseguridad clase 2-B2 y espere aproximadamente 20 minutos a que alcance temperatura ambiente. Pésela en la balanza analítica y anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y control de material de referencia" para esta madre.

Determine el volumen que necesita de la disolución madre para preparar el volumen requerido de trifenílfosfato, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cm) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 56 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EXTRACCIÓN QuEChERS Y DETECCIÓN CON GC/NPD/NPD, HPLC/DAD y GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-26</b>	

donde:

(Cd): Concentración deseada

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cm): Concentración de la disolución madre de la sustancia.

(V)= Volumen en mililitros requerido de la disolución madre.

Este cálculo se realiza automáticamente al llenar el formulario "Registro de preparación de disoluciones". En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por concentración"

Tome el volumen calculado de la solución madre de estándar interno utilizando un equipo volumétrico adecuado y deposítelo en un balón aforado que corresponda con el volumen final calculado. Afore con acetonitrilo. Trasvase a un vial de 5 mL ámbar siliconizados con tapa con teflón. Rotule con código interno, concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 57 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

**Anexo No. 4**

**SECUENCIA TÍPICA DE ESCRUTINIO DE PLAGUICIDAS EN EL GC/NPD/NPD**

Line	Location	SampleName	Method	SampleType
=====	=====	=====	=====	=====
1	Vial 1	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
2	Vial 2	ESNPD-04 mix 1/10	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
3	Vial 3	ESNPD-04 mix 1/50	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
4	Vial 4	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
5	Vial 5	Blanco sangre	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
6	Vial 6	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
7	Vial 7	Blanco enriq sangre	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
8	Vial 8	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
9	Vial 9	010003582020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
10	Vial 10	010003602020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
11	Vial 11	010003752020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
12	Vial 12	010003762020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
13	Vial 13	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
14	Vial 14	ESNPD-04 mix 1/10	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
15	Vial 15	ESNPD-04 mix 1/50	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
16	Vial 16	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
17	Vial 17	Blanco Cont Gástrico	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
18	Vial 18	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
19	Vial 19	Blanco enriq C.G	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
20	Vial 20	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
21	Vial 21	10000852020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
22	Vial 22	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
23	Vial 23	10000862020 (1/20)	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
24	Vial 24	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
25	Vial 25	10000872020 (C.G.)1/100	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
26	Vial 26	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
27	Vial 27	10000902020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
28	Vial 28	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
29	Vial 29	10000952020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 58 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

30	Vial 30	Blanco de tolueno	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
31	Vial 31	10000982020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
32	Vial 32	Blanco de tolueno	LAVADO	Ctrl Samp
33	Vial 1	Blanco de tolueno	DESCANSO	Ctrl Samp

C.G.: contenido gástrico.

### SECUENCIA TÍPICA DE ESCRUTINIO DE PLAGUICIDAS EN EL HPLC/DAD

Line	Location	SampleName	Method	SampleType
=====	=====	=====	=====	=====
1	Vial 1	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
2	Vial 2	ESHPLC-01 mix 1/10	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
3	Vial 3	ESHPLC-01 mix 1/50	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
4	Vial 4	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
5	Vial 5	Blanco sangre	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
6	Vial 6	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
7	Vial 7	Blanco enriq sangre	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
8	Vial 8	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
9	Vial 9	010003582020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
10	Vial 10	010003602020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
11	Vial 11	010003752020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
12	Vial 12	010003762020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
13	Vial 13	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
14	Vial 14	ESHPLC-01 mix 1/10	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
15	Vial 15	ESHPLC-01 mix 1/50	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
16	Vial 16	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
17	Vial 17	Blanco Cont Gástrico	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
18	Vial 18	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
19	Vial 19	Blanco enriq C.G	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Ctrl Samp
20	Vial 20	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
21	Vial 21	10000852020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
22	Vial 22	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank
23	Vial 23	10000862020	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	Sample
24	Vial 24	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS 23ENE_20	blank

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 59 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

25	Vial 25	10000872020	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	Sample
26	Vial 26	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	blank
27	Vial 27	10000902020	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	Sample
28	Vial 28	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	blank
29	Vial 29	10000952020	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	Sample
30	Vial 30	Blanco de fase móvil	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	blank
31	Vial 31	10000982020	ESPLAGUICIDAS	23ENE_20	Sample
32	Vial 32	Blanco de fase móvil	LAVADO		blank

C.G.: contenido gástrico.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 60 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

### Secuencia típica de plaguicidas en GC/MS

Vial	Sample Type	Sample Name	Method Path	Method File	Data Path	Data File	Tray	Volume	Barcode	Comment
1	1	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Limpieza.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	Limpia_01	Tray1,VT98	1.0	Toluenc
2	1	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_01	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
3	2	Sample	Blanco de sangre	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_05	Tray1,VT98	2.0	sangre caballo +SI ES-MS-14
4	3	Sample	Blanco enriquecido sangre	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_06	Tray1,VT98	2.0	sangre caballo + Mix + SI ES-MS-14
5	4	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_07	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
6	5	Sample	01887TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_08	Tray1,VT98	2.0	0100074822019
7	6	Sample	02753TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_09	Tray1,VT98	2.0	0100103912019
8	7	Sample	02766TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_10	Tray1,VT98	2.0	0100113382019
9	8	Sample	Mix sin extraer 1/10	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_03	Tray1,VT98	2.0	MIX +SI ES-MS-14 DILUIDO 1/10
10	9	Sample	02896TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_11	Tray1,VT98	2.0	0100114792019
11	10	Sample	03413TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_12	Tray1,VT98	2.0	0100137452019
12	11	Sample	Mix sin extraer 1/50	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_02	Tray1,VT98	2.0	MIX +SI ES-MS-14 DILUIDO 1/50
13	12	Sample	03571TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_13	Tray1,VT98	2.0	0100145212019
14	13	Sample	03609TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_14	Tray1,VT98	2.0	0100145322019
15	14	Sample	03803TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_15	Tray1,VT98	2.0	0100157262019
16	16	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_16	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
17	17	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_17	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
18	18	Sample	Blanco de C.G.	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_18	Tray1,VT98	2.0	C.G. +SI ES-MS-14
19	19	Sample	Blanco enriquecido C.G.	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_19	Tray1,VT98	2.0	C.G. + Mix + SI ES-MS-14
20	20	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_20	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
21	21	Sample	01887TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_21	Tray1,VT98	2.0	1000001032019
22	22	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_22	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
23	23	Sample	02753TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_23	Tray1,VT98	2.0	1000001582019
24	24	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_24	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
25	8	Sample	Mix sin extraer 1/10	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_25	Tray1,VT98	2.0	MIX +SI ES-MS-14 DILUIDO 1/10
26	25	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_26	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
27	26	Sample	02885TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C\Data\2019\15Nov_19	plaguic_27	Tray1,VT98	2.0	1000001732019
28	27	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_28	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
29	28	Sample	02896TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_29	Tray1,VT98	2.0	1000001742019
30	29	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_30	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
31	30	Sample	03195TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_31	Tray1,VT98	2.0	1000002012019
32	31	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_32	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
33	11	Sample	Mix sin extraer 1/50	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_33	Tray1,VT98	2.0	MIX +SI ES-MS-14 DILUIDO 1/50
34	32	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_34	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
35	33	Sample	03413TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_35	Tray1,VT98	2.0	1000002022019
36	34	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_36	Tray1,VT98	2.0	Toluenc
37	35	Sample	03609TOX2019	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_37	Tray1,VT98	2.0	1000002172019
38	36	Blank	Blanco	E:\GC-MS 5975C\Methods\	Esplaguicidas SIM- 11dic_18.M	E:\GC-MS 5975C>Data\2019\15Nov_19	plaguic_38	Tray1,VT98	2.0	Toluenc

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 61 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

**Anexo No. 5**

**Parámetros de identificación de los plaguicidas OC y PR**

<b>ANALITO</b>	<b>TIEMPO DE RETENCION</b>	<b>ION CUANTIFICADOR</b>	<b>IONES CALIFICADORES</b>	<b>INTENSIDAD RELATIVA</b>
Quintozeno	8,4	236,8	213,9 248,9 294,8	74 86 88
Endosulfan alfa	10,7	276,9	194,9 236,8	144 125
Endosulfan beta	11,4	194,9	276,9 236,9 264,9	46 82 42
Lambda Cihalotrina	13,4	181,0	197,0 208,1 141,0	73 56 21
Ciflutrina	14,3	226,10	199,1 162,9 165,0	86 110 94
Cipermetrina	14,4	181,0	209,1 208,1	46 31
Cipermetrina II	14,5	181,0	209,1 208,1 162,9	44 30 152
Cipermetrina III y IV	14,5	163,0	165,0	79
Deltametrina	15,5	253,0	209,1 181,1 174,0	37 112 37
Deltametrina II	15,3	253,0	209,1 181,1 174,0	42 118 37
Trifenilfosfato (estándar interno)	12,6	326,0	325,0	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 62 de 62
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PLAGUICIDAS NO INHIBIDORES DE COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-20</b>	

**Anexo No. 6**

**PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN PLAGUICIDAS**

Sustancia	Concentración esperada (µg/mL)	Resultado (n= 5)	
		Recuperación Promedio (%)	Desviación estándar
Metomilo	35	58,6	5,4
Propoxur	35	143,6	31,8
Diazinon	5	103,2	12,5
Carbofuran	35	143,4	32,5
Paration-metil	5	114,5	15,9
Fenamifos	5	97,7	10,8
Edifenfos	5	73,0	17,3
Dichlorvos	10	63,8	15,6
Etoprofos	5	93,5	5,5
Forato	5	86,3	6,0
Terbufos	5	91,8	5,7
Dimetoato	10	109,3	7,6
Clorpirifos	5	93,3	5,7
Etion	5	110,9	17,8

COPIA NO CONTROLADA