



Producto 5: “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico”. *Notas Técnicas* conteniendo 6 *Metodologías diseñadas* para la estandarización y normatización de los resultados de Laboratorio de P, Cd y Zn en suelo y matriz vegetal.

Gabriela Coria, Inmaculada García-Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre, Adalgisa Scotti



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Inmaculada García-Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre y Adalgisa Scotti

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract	7
Resumen EJECUTIVO	8
Palabras Clave:	8
Introducción	9
Objetivos	10
Resultados	10
1. Determinaciones de P, Zn y Cd en suelo	10
1.1. Muestreo	10
1.2. Preparación de la muestra	11
1.2.1. Principio	11
1.2.2. Equipos y materiales	11
1.2.3. Procedimiento	11
1.3. Digestiones	12
1.3.1. Ácido nítrico-ácido perclórico	12
1.3.1.1. Principio y alcance	12
1.3.1.2. Equipos y materiales	12
1.3.1.3. Reactivos	12
1.3.1.4. Procedimiento	13
1.3.2. Con ácido nítrico asistido con microondas	14
1.3.2.1. Principio y alcance	14
1.3.2.2. Equipos y materiales	14
1.3.2.3. Reactivos	14
1.3.2.4. Procedimiento	15
1.4. Metodología de medición de P en suelo	16
1.4.1. Método Olsen	17



1.4.1.1.	Principio.....	17
1.4.1.2.	Reactivos	18
1.4.1.3.	Procedimiento	19
1.4.2.	Método Bray II	19
1.4.2.1.	Principio.....	19
1.4.2.2.	Reactivos	20
1.4.2.3.	Procedimiento	20
1.5.	Metodología de medición de Cd en suelo	20
1.5.1.	EAA electrotérmica	20
1.5.1.1.	Principio y alcance	20
1.5.1.2.	Interferencias	21
1.5.1.3.	Equipos y materiales especiales	21
1.5.1.4.	Reactivos	21
1.5.1.5.	Procedimiento	22
1.5.1.6.	Cálculos	22
1.5.1.7.	Informes	23
1.6.	Metodología de medición de Zn en suelo	23
1.6.1.	EAA de llama aire – acetileno por aspiración directa.....	23
1.6.1.1.	Principio y alcance	23
1.6.1.2.	Interferencias	23
1.6.1.3.	Equipos y materiales especiales	24
1.6.1.4.	Reactivos	24
1.6.1.5.	Procedimiento	24
1.6.1.6.	Cálculos	25
1.6.1.7.	Informe.....	26
2.	Determinaciones de P, Zn y Cd en matriz vegetal.....	26
2.1.	Preparación de muestras vegetales: descontaminación, secado, molienda y almacenaje.....	26
2.1.1.	Principio	26
2.1.2.	Equipos y materiales especiales.....	27
2.1.3.	Reactivos.....	27



2.1.4.	Procedimiento.....	27
2.2.	Calcinación en mufla a 500°C	28
2.2.1.	Principio	28
2.2.2.	Equipos y materiales especiales.....	29
2.2.3.	Reactivos	29
2.2.4.	Procedimiento.....	29
2.3.	Metodología de medición de P por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato	30
2.3.1.	Principio	30
2.3.2.	Equipos y materiales especiales.....	30
2.3.3.	Reactivos	30
2.3.4.	Procedimiento.....	31
2.3.5.	Cálculos	31
2.3.6.	Informes.....	31
2.4.	Metodología de medición de Zn y Cd por espectrofotometría de AA.....	31
2.4.1.	Principio	31
2.4.2.	Equipos y materiales especiales.....	32
2.4.3.	Reactivos	32
2.4.4.	Procedimiento.....	32
2.4.5.	Cálculos	32
2.4.6.	Informes.....	33
3.	MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	33
	Discusión.....	33
	Conclusiones y recomendaciones.....	35
	Referencias Bibliográficas	36
	Anexo 1	39
	Instituciones participantes.....	40



INDICE CUADROS

Cuadro 1. Los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes encontrados en algunos análisis de suelo	17
---	----



ABSTRACT

Se realizó una compilación de diversas metodologías para la medición de fósforo, cadmio y cinc tanto en suelo como en la matriz vegetal. Se abordaron metodologías normalizadas y modificaciones documentadas en la bibliografía para establecer los parámetros metodológicos para cada laboratorio, desde la toma de muestra hasta los cálculos finales. Un aspecto muy importante es saber cuáles estándares serán utilizados y cuál es el rango de concentración con el que se estima trabajar. Por último, es necesario saber si hay interferentes o riesgos de pérdida de elementos, como también si las mediciones son realizadas a la longitud de onda correcta teniendo en cuenta la sensibilidad, la calidad de la medición y los factores críticos que enfrenta la metodología elegida al momento de analizar los resultados obtenidos en las mediciones analíticas. En este trabajo se documentaron las metodologías y se determinaron los parámetros de calidad para los principales elementos que están siendo utilizados en el proyecto titulado “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico” en el cual se utiliza un sistema fúngico (micorrízico-saprobio) modificador de la incorporación de cadmio en la planta de cacao.

A compilation of various methodologies was made for the measurement of phosphorus, cadmium and zinc both in soil and in plant matrix. Standardized methodologies with modifications documented in the bibliography were addressed. It is important to establish the methodological parameters for each laboratory, from sample collection to final calculations. An important aspect is to know which standards will be used and what is the concentration range with which it is estimated to work. Finally, it is necessary to know if there are interferences or risks of losing elements, as well as if the measurements are made at the correct wavelength, considering the sensitivity, the quality of the measurement and the critical factors faced by the chosen methodology when analyzing the results obtained in the analytical measurements. In this work, the methodologies were documented, and the quality parameters were determined for the main elements that are being used in the project entitled “Bioprocess that reduces the solubility of rhizospheric cadmium” in which a fungal system (mycorrhizal-saprobic) is used to modify the incorporation of cadmium in the cocoa plant.



RESUMEN EJECUTIVO

En este trabajo se abordó una recopilación de metodologías para la medición de fósforo, cadmio y cinc en suelo y biomasa (tejido vegetal). Existen diversas metodologías que comprenden los denominados métodos de screening y métodos de referencia. En este trabajo consideramos solo los métodos normalizados y modificados existentes en la bibliografía.

Se comienza con una exhaustiva descripción de la toma de muestra tanto desde aspectos técnicos como estadísticos con el fin de que la muestra sea representativa del total y no sufra cambios en su traslado y almacenamiento hasta llegar al laboratorio. El paso siguiente es la caracterización de la muestra aportando parámetros que permitan la elección de la metodología para el suelo y para biomasa. Un aspecto muy importante a considerar es tener en cuenta la cantidad de muestra antes de elegir la metodología. Un modo de independizarse de este factor es la digestión mediante diversos métodos, en los cuales obtenemos un lixiviado. En este punto es importante tener en cuenta las concentraciones sobre las que estimamos trabajar para que el lixiviado no ingrese bajo los límites de detección del método. Además, es importante tener de referencia patrones o estándares apropiados a la matriz con la cual se trabaja y que sean acordes con las concentraciones que queremos medir. Tras estas consideraciones que deben ser tenidas en cuenta previamente, luego se determina el equipamiento a utilizar y si se realizan las determinaciones por duplicado, triplicado o cuadruplicado según la variabilidad de la muestra.

Los elementos a medir en este trabajo son P, Zn y Cd ya que ellos son los principales analitos que nos permiten ajustar parámetros en el procedimiento aplicado en el proyecto Fontagro titulado “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico”. Para el caso del P y Zn se refirieron métodos conocidos y sus alternativas en cuanto a digestiones, equipamiento y estándares para control de calidad interno y externo. En el caso del cadmio, por la relevancia de la determinación para el proyecto se recopiló no solo la metodología de referencia sino la experiencia de especialistas en la problemática del cadmio en el cacao. Esta recopilación permite tener una guía para las metodologías a emplear desde el muestreo hasta la interpretación de los resultados para cada una de las matrices señaladas.

PALABRAS CLAVE:

CADMIO – CINC - FÓSFORO – SUELO – BIOMASA – METODOLOGÍA DE REFERENCIA



INTRODUCCIÓN

Existen muchas metodologías para las determinaciones de P, Zn y Cd. En esta recopilación se pone en valor las metodologías normatizadas y de referencia para poder ser utilizadas en el tratamiento previo de las muestras para las mediciones, teniendo en cuenta el tipo de matriz, en este caso: suelo y biomasa. Otros aspectos importantes a tener en cuenta son la cantidad de material, los estándares utilizados, la sensibilidad del método, los interferentes y los rangos de concentración sobre los cuales se trabajará para elegir la metodología.

En ese sentido se recopilaron metodologías de análisis que tenían una base bibliográfica y descripciones normatizadas como también las utilizadas por los laboratorios de referencia participantes en el proyecto *Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico*. En este proyecto se plantea un bioproceso empleando hongos micorrícicos y saprobios que interfieren en la bioacumulación de cadmio en la almendra del cacao. Los elementos P, Zn, y Cd son los principales que se necesitan determinar para ajustar la metodología del bioproceso. Cabe destacar que la problemática del cadmio en el cacao se debe a la bioacumulación del metal en la semilla que se utiliza para elaborar el chocolate. Según una disposición de la UE, la concentración del metal en la almendra no debe superar el límite de 0,8 mg/kg para la comercialización del cacao proveniente de la Región LAC, debido a los problemas de salud que ocasiona este elemento al acumularse en los tejidos.

Para identificar los efectos del bioproceso, se realizó una compilación de metodologías, enfatizando para cada elemento los puntos críticos. Dado que no existe una norma metodológica establecida, la elección del método y los procedimientos a ejecutar (desde el muestreo hasta los cálculos finales) es determinante para una interpretación correcta de los análisis de laboratorio.

El proceso comienza con la preparación de la muestra. En los tejidos vegetales la preparación es crítica para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, deben seguirse procedimientos estrictos en su limpieza, secado, molienda y almacenaje. En el caso de las muestras de suelo, además de la preparación de las muestras, hay que prestar especial atención al muestreo, ya que un muestreo deficiente (pocas muestras o no representativas) puede conducir a interpretaciones de resultados erróneos.

Los métodos de USEPA para suelos y biomasa, como también los métodos de Olsen (Olsen, 1954), fueron transcritos incorporando modificaciones de diversos autores, lo que brinda la posibilidad de elegir la metodología a aplicar según distintos métodos de digestión (mineralización), equipos existentes, cantidad de muestra disponible y rango de concentraciones esperadas. Adicionalmente, se recogió la información brindada por especialistas de la Plataforma Multiagencia Cacao 2030-2050 y otras experiencias de analistas de la región LAC.

Por último, se destaca la importancia de los distintos niveles de control de calidad, tanto internos como externos, en suelo y biomasa, en la determinación analítica y en la mineralización, de modo tal que se pueda detectar si el problema está ocurriendo en la determinación analítica o en el procedimiento de digestión. Asimismo, se hace referencia a



los estándares empleados, tanto comerciales como preparados en laboratorio, y a los cálculos de recuperabilidad para las matrices descritas: suelo, hojas, raíces, almendras etc.

OBJETIVOS

El objetivo general de este Producto es describir las diversas metodologías que se pueden aplicar para las determinaciones de P, Zn y Cd en suelo y matriz vegetal de modo tal de validar una metodología trazable, precisa y repetible.

RESULTADOS

1. DETERMINACIONES DE P, Zn y Cd EN SUELO

1.1. Muestreo

Lo más importante del muestreo de suelos es que las muestras sean representativas de la región a analizar, componiendo un todo homogéneo. En casos de alta variabilidad, se debe considerar hacer previamente un análisis de componentes principales abarcando todas las muestras y separarlas en clústeres, de modo tal que la variabilidad de la varianza de cada clúster sea adecuada en nuestras investigaciones (McKean, 1993).

La variabilidad que se encuentra en el campo no es solo vertical, sino también horizontal, pudiendo ser natural o inducida. Se han desarrollado varios procedimientos para recoger muestras representativas de esta variabilidad (Carrillo, 1985, James & Wells, 1990). El método más común es el de la muestra compuesta, donde se toman al azar de un área dentro del campo y se combinan para obtener una muestra compuesta mucho más representativa del promedio de lo que existe en el campo.

El número de submuestras debe estar entre 15 y 40. Un incremento del número aumenta la precisión y la exactitud, pero no de forma lineal. Normalmente, se toman las muestras a la profundidad de la zona de las raíces o de la capa arable, usando un barreno o un tubo después de quitar la hojarasca. Posteriormente, se mezclan y se envía toda la muestra compuesta, o una parte, al laboratorio. Todo el equipo de muestreo debe estar limpio y libre de contaminación. Es preferible evitar almacenar las muestras húmedas por mucho tiempo, en el caso que esto fuera necesario, se pueden guardar a 4 °C hasta su análisis

El muestreo debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. La profundidad del muestreo.
2. El número de muestras en el compuesto.
3. El tamaño del área para muestrear.
4. La influencia del cultivo.
5. La estación.

6. La frecuencia de muestreo.

Es crucial identificar adecuadamente las muestras de suelo antes de llevarlas al laboratorio.

1.2. Preparación de la muestra (Zagal & Sadzawka, 2007) (Martínez et al., 2023)

1.2.1. Principio

- i. El objetivo de la preparación es homogeneizar la muestra de suelo para ser usada en los análisis químicos y físicos. Estos análisis generalmente se realizan en la fracción fina de suelo (<2 mm, Malla # 10), la cual se ha secado a una temperatura no superior a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta alcanzar una masa constante, constituyendo lo que se denomina “suelo seco al aire”. Las ventajas de usar el suelo seco al aire consisten en que generalmente posee un contenido de humedad óptimo para manipularlo y procesarlo, la masa de suelo seco al aire permanece relativamente constante y la actividad microbiana es baja durante el almacenaje.

Nota 1: El secado de la muestra en una estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ es preferible al secado a temperatura ambiente porque el aumento en la velocidad de secado limita los cambios debidos a la actividad microbiana. Las temperaturas no deben ser muy elevadas porque esto puede cambiar algunas propiedades del suelo.

- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.
- iii. Después de secar y tamizar, la muestra se almacena en un recipiente limpio hasta el análisis.

1.2.2. Equipos y materiales

- i. Martillo de madera o de otra superficie suave, o tapón de goma.
- ii. Bandejas.
- iii. Láminas de plástico.
- iv. Estufa con circulación de aire capaz de mantener una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (no indispensable).
- v. Tamiz de acero inoxidable o de otro material inerte, con orificios de 2 mm.
- vi. Mortero y pistilo de porcelana.
- vii. Bolsas o frascos de plástico con tapa para almacenar las muestras.
- viii. Mortero y pistilo de ágata.
- ix. Tamiz de acero inoxidable o de otro material inerte, de orificios de 0,5 mm o de otro tamaño especificado en el método de análisis.

1.2.3. Procedimiento

- i. Homogeneizar bien la muestra de terreno, disgregando los terrones manualmente o mediante presión con un martillo de madera o un tapón de goma (1.2.2), eliminando las piedras y los residuos vegetales de mayor tamaño, tales como raíces gruesas.

Nota 2: En el caso de suelos arcillosos, secar previamente la muestra hasta alcanzar un grado de humedad que permita una fácil desintegración de los terrones.

- ii. Separar una fracción de al menos 500 g de la muestra de terreno (en adelante muestra de laboratorio o simplemente muestra de suelo) y esparcirla sobre una bandeja cubierta con una lámina de plástico. El espesor de la capa de muestra no debe ser superior a 15 mm.
- iii. Secar la muestra al aire, dejando la bandeja en un ambiente ventilado libre de contaminación, o bien en estufa a una temperatura no superior a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que la pérdida de masa no sea mayor del 5% en 24 h.
- iv. Tamizar la muestra a través del tamiz de 2 mm. Los terrones que no pasan por el tamiz se disgregan (no se muelen) en un mortero de porcelana y se tamizan nuevamente. Los fragmentos orgánicos y grava que permanecen en el tamiz se eliminan, a menos que se requiera conocer el porcentaje de grava.
- v. La muestra de fracción < 2 mm se homogeniza y se almacena en una bolsa o frasco plástico y constituye la muestra de suelo seco al aire que se somete a los procedimientos analíticos usuales. El remanente de la muestra de terreno se almacena en una bolsa plástica y permanece como contra muestra.

Nota 3: Si la cantidad de muestra es excesiva para almacenarla, obtener una submuestra mediante el sistema de cuarteo. Para ello, esparcir la muestra formando una capa delgada, dividirla en cuatro porciones iguales y combinar dos de las cuatro porciones diagonales, descartando las otras dos. Repetir este procedimiento hasta obtener la cantidad deseada de muestra de suelo.

- vi. Para el análisis del contenido total de metales, moler en un mortero de ágata alrededor de 5 a 10 g de muestra < 2 mm y pasarla **totalmente** a través de un tamiz de 0,5 mm.

1.3. Digestiones

1.3.1. Ácido nítrico-ácido perclórico (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.3.1.1. Principio y alcance

- i. La muestra seca y molida, de suelo, se digiere con ácido nítrico y ácido perclórico. En el digerido se pueden determinar las concentraciones de Cd y Zn, así como As, Cu, Ni, Pb, Se.
- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.

1.3.1.2. Equipos y materiales

- i. Digestor de tubos.
- ii. Tubos de digestión de vidrio de 250 mL de capacidad, con tapones de teflón y tubos refrigerantes para permitir la condensación de vapores.
- iii. Discos filtro de tamaño de poro $< 25 \mu\text{m}$.

1.3.1.3. Reactivos

- i. Deben usarse solamente reactivos de grado analítico o grado para trazas. Todas las referencias a “agua” se refieren a agua reactivo que debe cumplir los requisitos dados por ASTM D1193 (1999) Tipo I o ISO 3696 (1987) Grado 1 (CE máxima $0,06 - 0,1 \mu\text{S/cm}$ ($0,006 - 0,01 \text{ mS/m}$)).

- 
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 100%, densidad 1,52 kg/L.
 - iii. Ácido perclórico, HClO_4 70%, densidad 1,66 kg/L.
 - iv. Solución para fortificar: A un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - alrededor de 50 mL de agua,
 - 1 mL de ácido nítrico,
 - 1 mL de solución estándar de 10 mg/L de Cd (Método 1.5),
 - 1 mL de solución estándar de 1000 mg/L de Zn (Método 1.6),
 - agua hasta enrasar.
 - v. Esta solución para fortificar contiene:
 - 100 $\mu\text{g/L}$ de Cd,
 - 10 mg/L de Zn.

1.3.1.4. Procedimiento

- i. En tubos de digestión, pesar alrededor de 1 g (exactitud 0,01g) de muestra secada a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y $< 0,5$ mm de suelo (1.2.3 vi). Incluir 1 blanco, 1 muestra de referencia fortificada con 2 mL de solución para fortificar, 1 de las muestras de la tanda fortificada con 2 mL de solución para fortificar y 1 duplicado de esta muestra fortificada con 2 mL de solución para fortificar.
- ii. Agregar 25 mL de HNO_3 100% y agitar manualmente el matraz para homogenizar la muestra.
- iii. Colocar los tapones de teflón con los refrigerantes.
- iv. Digerir a 60°C durante la noche. Mezclar bien.
- v. Digerir a 120°C durante 1 h. Enfriar, mezclar y remover los refrigerantes.
- vi. Calentar a 140°C hasta que quede un volumen de alrededor de 5 mL.
- vii. Enfriar a menos de 60°C .
- viii. Agregar cuidadosamente 5 mL de HClO_4 70%, colocar nuevamente los refrigerantes y digerir a 220°C durante 30 min.

Nota 1: El período de predigestión, el uso de refrigerantes y el aumento progresivo del poder oxidante, combinando ácidos y temperaturas, ayudan a evitar la formación de compuesto volátiles de As y Se.

Nota 2: No debe usarse ácido perclórico en campanas de extracción de madera por el peligro de explosión.
- ix. Enfriar y lavar los refrigerantes y las paredes de los tubos con agua.
- x. Filtrar y enrasar con agua a 100 mL.

Nota 3: En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cd (Método 1.5) y Zn (Método 1.6).

1.3.2. Con ácido nítrico asistido con microondas (Zagal & Sadzawka, 2007) (Martínez et al., 2022)

1.3.2.1. Principio y alcance

- i. La muestra seca y molida, de suelo, se digiere con ácido nítrico usando una unidad de microondas. En el digerido se pueden determinar las concentraciones de: As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Se y Zn.
- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.

1.3.2.2. Equipos y materiales

- i. Sistema de digestión de microondas con las siguientes características:
 - potencia de 574 W programable en ± 10 W,
 - monitoreo y control de la presión o la temperatura,
 - cámara bien ventilada y resistente a la corrosión,
 - componentes eléctricos y electrónicos protegidos contra la corrosión,
 - vasos de digestión recubiertos de Teflón PFA, de 120 mL de capacidad y capaces de resistir presiones de hasta $15,3 \pm 1,7$ atm (225 ± 25 psi) y controlar la liberación de presión en caso de que excedan los 17,0 atm (250 psi),
 - plato giratorio de velocidad mínima de 3 rpm.
- ii. Discos filtro de tamaño de poro $< 25 \mu\text{m}$

1.3.2.3. Reactivos

- i. Deben usarse solamente reactivos de grado analítico o grado para metales traza.
- ii. Todas las referencias a “agua” se refieren a agua reactivo que debe cumplir los requisitos dados por ASTM D1193 (1999) Tipo I o ISO 3696 (1987) Grado 1 (CE máxima $0,06 - 0,1 \mu\text{S/cm}$ ($0,006 - 0,01 \text{ mS/m}$)).
- iii. Ácido nítrico, HNO_3 , 100%, densidad 1,52 kg/L.
- iv. Ácido nítrico, HNO_3 , 1+1: Diluir ácido nítrico 100% con igual volumen de agua.
- v. Solución para fortificar: a un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - alrededor de 50 mL de agua,
 - 1 mL de ácido nítrico (1.3.2.3 iii)
 - 0,5 mL de solución estándar de 10 mg/L de Cd (Método 1.5),
 - 0,5 mL de solución estándar de 1000 mg/L de Zn (Método 1.6).

Esta solución para fortificar contiene:

- 50 $\mu\text{g/L}$ de Cd,
- 5 mg/L de Zn.



1.3.2.4. Procedimiento

- i. Calibrar el digestor de microondas, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el método de calibración de 3 puntos o de múltiples puntos, dependiendo de si la unidad tiene o no una relación lineal exacta y precisa entre la potencia indicada y la potencia absorbida (EPA, 1994; TMECC, 2002).
- ii. Limpiar los vasos de digestión calentándolos con ácido nítrico 1:1 (1.3.2.3 iv) a una temperatura superior a 80°C, pero sin hervir, por un mínimo de 2 h, lavar con agua y secar en un ambiente limpio.
- iii. Lavar todo el material de plástico que tenga contacto con las muestras con ácidos diluidos (alrededor del 10%) apropiados para los plásticos específicos, enjuagar con agua y secar en un ambiente limpio.

Nota 1: Es recomendable mantener separados los materiales usados para concentraciones bajas de metales de aquellos usados para concentraciones altas.

- iv. Colocar alrededor de 0,2 g (exactitud 0,001 g) de muestra seca $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $< 0,5$ mm de suelo (1.2.3 vi) en un vaso de digestión. Incluir 1 blanco, 1 muestra de referencia fortificada con 2 mL de solución para fortificar (3.3), 1 de las muestras de la tanda fortificada con 2 mL de solución para fortificar (1.3.2.3 v) y 1 duplicado de esta muestra fortificada con 2 mL de solución para fortificar (1.3.2.3 v).
- v. Agregar 10 mL (exactitud 0,1 mL) de HNO_3 (1.3.2.3 iii) bajo campana y esperar hasta que cese la reacción.
- vi. Tapar el vaso y conectar el vaso de rebalse según las instrucciones del fabricante.
- vii. Pesar los vasos de digestión con exactitud 0,001 g.
- viii. Colocar en el plato giratorio del microondas.

Nota 2: Debe completarse la capacidad del microondas. Si el número de vasos es inferior al recomendado, completar con vasos con 10 mL de HNO_3 (3.1) que además sirven de blancos analíticos.

- ix. Irradiar con la potencia suficiente para que la temperatura de cada muestra suba a 175°C en menos de 5,5 min y permanezca entre 170 y 180°C durante 4,5 min.
- x. Dejar enfriar por un mínimo de 5 min y sacar los vasos del equipo.
- xi. Cuando los vasos alcancen la temperatura ambiente (aprox. 23°C) pesar con una exactitud de 0,001 g. Si la masa ha disminuido más de un 10%, lo que indica pérdida de material, corregir el problema y repetir desde el punto 1.3.2.4 iv.
- xii. Cuidadosamente destapar los vasos bajo campana, transferir a un matraz aforado de polietileno de 50 mL, lavado con ácido, y enrasar con agua.

Nota 3: Si el digerido contiene material en suspensión proceder según una de las siguientes alternativas:

- Centrifugar a 2000-3000 rpm por 10 min, o
- Dejar decantar durante la noche, o
- Filtrar usando un filtro fino y un aparato de filtración prelavado con HNO_3 .



Nota 4: En el digerido se pueden determinar las concentraciones de Cd (Método 1.5) y Zn (Método 1.6).

1.4. Metodología de medición de P en suelo

En función del pH del suelo se debe seleccionar el método apropiado para medición de fósforo.

Para suelos con pHs mayores a 6,8 se utiliza el método “Procedimiento de operación estándar para fósforo disponible, Método Olsen, y para pHs menores a 6,8 se utiliza el Bray II. En el Cuadro 1 se muestran los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes y pHs encontrados en algunos análisis de suelo (Landon, 1984).

Cuadro 1. Los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes encontrados en algunos análisis de suelo

	Unidades	Alto	Medio	Bajo
Ca:Mg		> 5:1	4:1	< 3:1
K:Mg			2:1	
Sat Al	%	> 85	30-85	< 30
CIC	meq/100g	25-40	15-25	5-15
Ca	meq/100g	> 10		< 4
Mg	meq/100g	> 4		< 0,5
K	meq/100g	> 0,6		< 0,2
Na	meq/100g	> 1		
pH		7,0 - 8,5	5,5 - 7,0	< 5,5
S	ug/g		6,0 - 12	
B	ug/g		1,5 - 3,0	
P Bray II	ug/g	> 50	15 - 30	< 15
P Olsen	ug/g	> 15	5 - 15	< 5
C Orgánico	%	> 10	4 - 10	< 4
N	%	> 0,5	0,2 - 0,5	< 0,2

1.4.1. Método Olsen (McKean, 1993)

1.4.1.1. Principio

Esta extracción usa una solución de bicarbonato de sodio a un pH de 8,50. En los suelos calcáreos o alcalinos los iones de bicarbonato causan la precipitación del calcio como CaCO_3 , y por lo tanto la actividad de calcio en la solución disminuye. Esto facilita la extracción de los fosfatos de calcio más solubles. En los suelos más ácidos los iones de bicarbonato, reemplazan a los fosfatos de aluminio y hierro. El incremento del pH de la solución facilita la extracción de fosfato de las superficies que tienen una carga dependiente del pH.

El método de la extracción con bicarbonato de sodio fue desarrollado por Olsen et al. (1954). Es un método que sirve para extraer fósforo de todos los tipos de suelo, tanto en suelos ácidos como alcalinos (Thomas et al., 1973).

1.4.1.2. Reactivos

- i. Solución de Superfloc o 'polyacrylamide gel' 0,05% p/v: Disuelva 0,5 g de Superfloc en 1 L de agua. Agite la solución por una hora para disolverla.
- ii. Hidróxido de sodio 1 M (NaOH): Disuelva 40 g NaOH en 1 L de agua.
- iii. Bicarbonato de sodio 0,5 M (NaHCO_3) pH 8,50: Disuelva 42 g de NaHCO_3 en agua, agregue 5 mL de la solución de Superfloc y mezcle bien. Diluya a un volumen de 1 L con agua y con NaOH 1 M ajuste el pH a 8,50. Se necesita 30 mL de esta solución por cada muestra y 100 mL por cada estándar.
- iv. Carbón activado lavado.
- v. Ácido sulfúrico 2,5 M (H_2SO_4): Añada 140 mL de H_2SO_4 , concentrado a 600 mL de agua. Deje enfriar y lleve a un volumen de 1 L. Se necesita 1 mL por cada muestra y estándar.
- vi. Solución de trabajo para el desarrollo de color
 - a. Reactivos
 - Molibdato de amonio ($[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
 - Tartrato de antimonio y potasio hemihidrato ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$).
 - Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
 - Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
 - b. Solución A
 - Disuelva 60 g de molibdato de amonio en 200 mL de agua.
 - Añada 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio y disuelva
 - Agregue lentamente y con agitación suave, 700 mL de ácido sulfúrico concentrado.
 - Deje enfriar y diluya con agua a un volumen de 1 L.
 - c. Solución B
 - Disuelva 132 g de ácido ascórbico en agua y complete a un volumen de 1 L.
 - d. IMPORTANTE: Guarde ambas soluciones en la heladera. Se prepara la solución de trabajo a partir de estas dos soluciones diariamente.
 - e. Tome 35 mL de solución A y agregue 800 mL de agua. Mezcle y añada 10 mL de solución B. Complete el volumen a 1 L con agua. Se necesitan 10 mL de esta solución por cada muestra y estándar.
- vii. Solución patrón de fósforo
 - a. Reactivo: Fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4).
 - b. Solución patrón de 50 $\mu\text{gP/mL}$
 - Seque unos gramos de KH_2PO_4 , en el horno por una hora a 105 $^\circ\text{C}$

- Pese 0,2195 g de KH_2PO_4 . y disuelva en agua.
- Complete a un volumen de 1 L con agua. A partir de esta solución se preparan los patrones de trabajo diariamente
- c. Guarde la solución en la heladera.

viii. Soluciones patrones.

- a. Solución patrón de 5 ugP/mL. Tome 10 mL de la solución patrón de 50 ug/mL y diluya a 100 mL con NaHCO_3 0,5 M (pH 8,5).
- b. A partir de esta solución de 5 ug/mL, prepare los patrones de trabajo. Tome alícuotas de 0 - 1 - 2 - 3 - 4 - 6 - 8 y 10 mL y diluya a 100 mL con NaHCO_3 0,5 M (pH 8,5). Estos patrones contienen 0 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,3 - 0,4 y 0,5 ug P/ mL.

1.4.1.3. Procedimiento

- i. En un tubo con tapa (50 mL), coloque 2,5 g de suelo y agregue 30 mL de 0,5 M NaHCO_3 (pH 8,50).
- ii. Agite por 30 min.
- iii. Filtre las muestras en tubos de ensayo. Pare la filtración después de 5 min. A veces es necesario usar carbón para quitar el color que aparece debido a la materia orgánica en el suelo. En estos casos coloque 0,5 g de carbón activado en cada papel filtro antes de la filtración. También es necesario hacer lo mismo con los patrones de trabajo.
- iv. Tome 5 mL de la solución filtrada o del patrón con una pipeta automática y añada 1 mL de H_2SO_4 (2,5 M). Agite bien para quitar las burbujas.
- v. Agregue 10 mL de la solución de trabajo para el desarrollo de color con una repipeta y espere 15 min.
- vi. Calibre el espectrofotómetro con los patrones a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
- vii. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en ug P/g de suelo.

1.4.2. Método Bray II (McKean, 1993)

1.4.2.1. Principio

La solución de Bray II (HCl 0,1 M y NH_4F 0,03 M) disuelve algunos fosfatos fácilmente solubles en ácido como los fosfatos de calcio y una parte de los fosfatos de hierro y aluminio. En la solución ácida, el NH_4F disuelve los fosfatos de hierro y aluminio por medio de la formación de complejos con el ion fluoruro.

El método de la extracción del fósforo por fluoruro - ácido diluidos fue desarrollado por Bray y Kurtz (1945). Es extensamente usado en suelos ácidos con bajos niveles de nutrientes. En los suelos calcáreos, el efecto del ácido es disminuido debido a su neutralización por el CaCO_3 , en el suelo. Por esta razón el método no es el indicado para suelos con un pH > 6,8.

1.4.2.2. Reactivos

i. Solución de Bray II.

Ácido clorhídrico (HCl 0,1 M) y fluoruro de amonio (NH_4F 0,03 M): Disuelva 1,11 g de NH_4F en 16,64 mL de HCl 6 M y complete el volumen a 1 L con agua. Se necesita 20 mL de esta solución por cada muestra.

ii. Solución de trabajo para desarrollo de color: la preparación de las soluciones patrones (A y B) está descrito en el punto 1.4.1.2 vi. La solución de trabajo tiene que ser preparada diariamente.

Tome 25 mL de la solución A y agregue 800 mL de agua. Mezcle y añada 10 mL de la solución B. Complete el volumen a 1 L con agua. Se necesita 18 mL de esta solución por cada muestra y patrón

iii. Soluciones patrones de trabajo.

La preparación de la solución estándar de fósforo (50 $\mu\text{g/mL}$) es descrita en el punto 1.4.1.2 vii. A partir de esta solución se prepara los patrones de trabajo.

Tome alícuotas de 0 - 1 - 2 - 4 - 8 - 12 y 16 mL y diluya a 100 mL con la solución de Bray II. Estos patrones contienen 0 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 y 8 $\mu\text{g P/mL}$.

1.4.2.3. Procedimiento

- i. Pese 2,85 g de suelo en un vaso de 50 mL.
- ii. Agregue 20 mL de la solución de Bray II.
- iii. Agite durante 40 seg.
- iv. Filtre la suspensión inmediatamente a través de papel filtro.
- v. Usando el dilutor (2/18), tome 2 mL del extracto o de patrón y añada 18 mL de la solución de trabajo para desarrollo de color. Mezcle bien y espere 15 min para el desarrollo del color.
- vi. Calibre el espectrofotómetro con los patrones a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
- vii. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en la muestra en $\mu\text{g P/g}$ de suelo.

1.5. Metodología de medición de Cd en suelo (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.5.1. EAA electrotérmica

1.5.1.1. Principio y alcance

- i. En el digerido proveniente del Método 1.3.1 o del Método 1.3.2 se determina la concentración de cadmio por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica (con horno de grafito).
- ii. Este método es aplicable en la determinación de cadmio en suelos.
- iii. Este método tiene un límite de detección instrumental de 0,1 $\mu\text{g/L}$ o menor y un rango óptimo de concentración de 0,5 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$ de Cd.

1.5.1.2. Interferencias

- i. Las principales interferencias se producen por absorción molecular y por la matriz.
- ii. Interferencia química o de matriz. Aunque el problema de la formación de óxidos está fuertemente reducido debido a que la atomización ocurre en una atmósfera inerte, esta técnica aún está sujeta a interferencia química, especialmente dependiendo de la composición de la matriz. Para detectar interferencias químicas o de matriz se puede usar la prueba de la dilución. Las muestras que indican interferencias pueden tratarse de una o varias de las siguientes maneras:
 - a. Diluir sucesivamente y reanalizar las muestras para eliminar la formación de óxidos o compuestos.
 - b. Modificar la matriz de la muestra ya sea eliminando los contaminantes y/o estabilizando el elemento. Por ejemplo, mediante, adición de nitrato de amonio para eliminar los cloruros alcalinos, adición de fosfato de amonio para reaccionar con el cadmio o mezclar hidrógeno con el gas inerte de purga como agente reductor y ayudante en la disociación molecular.
 - c. Analizar las muestras por el método de las adiciones de estándares, considerando las precauciones y limitaciones de su uso.
- iii. El análisis de cadmio por horno de grafito puede sufrir una severa absorción no específica y dispersión de la luz. Se requiere corrección de fondo.
- iv. Exceso de cloruro puede causar una volatilización prematura de cadmio, por lo que se debe usar un modificador de la matriz.

1.5.1.3. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito con lámpara de cadmio.

1.5.1.4. Reactivos

- i. Durante el análisis, usar solamente reactivos para análisis de trazas y agua reactivo Tipo I de ASTM D1193 (1999) o Grado 1 de ISO 3696 (1987) (CE máxima 0,06 – 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (0,006 – 0,01 mS/m)).
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 100%, $d=1,52 \text{ kg}/\text{L}$.
- iii. Solución de nitrato de paladio, 4 g/L de Pd: Disolver 8,89 g de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 1 L.
- iv. Solución de ácido cítrico, 4%. Disolver 40 g de ácido cítrico en agua y diluir a 1 L.
- v. Solución modificadora de la matriz. Mezclar volúmenes iguales de las soluciones de nitrato de paladio y de ácido cítrico.
- vi. Solución estándar de cadmio de 1000 mg/L de Cd: Disponible en el comercio.
- vii. Solución estándar de cadmio de 10 mg/L de Cd. A un matraz aforado de 1000 mL agregar:
 - a. 10 mL de la solución de 1000 mg/L de Cd

- 
- b. 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - viii. Solución estándar de cadmio de 50 $\mu\text{g/L}$ de Cd: A un matraz aforado de 200 mL agregar:
 - a. 1 mL de la solución de 10 mg/L de Cd,
 - b. 20 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - ix. Serie de soluciones estándares de cadmio. A seis matraces aforados de 100 mL agregar:
 - a. 0-1-2-5-10 y 20 mL de la solución de 50 $\mu\text{g/L}$ de Cd,
 - b. 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - d. Esta serie de estándares contiene: 0,0-0,5-1,0-2,5-5,0 y 10,0 $\mu\text{g/L}$ de Cd.

1.5.1.5. Procedimiento

- i. Montar, alinear el horno de grafito y seleccionar las condiciones de operación según las instrucciones del fabricante del espectrofotómetro. Usar corrección de fondo.
- ii. Calibrar el instrumento inyectando un volumen adecuado de cada una de las soluciones de la serie de estándares de Cd (1.5.1.4 ix) con un volumen igual de solución modificadora de la matriz (1.5.1.4 v). Leer a 228,8 nm cada solución estándar en triplicado para verificar la precisión del método.
- iii. Inyectar una alícuota, de volumen igual al usado con la serie de estándares, de los digeridos provenientes del Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii. Estos digeridos incluyen los de las muestras, del blanco, de la muestra de referencia fortificada, de una de las muestras fortificadas y del duplicado de esta muestra fortificada. Inyectar el mismo volumen de solución modificadora de la matriz (1.5.1.4 v).
- iv. Aplicar el programa seleccionado y repetir hasta obtener resultados reproducibles.

Nota 1: Si la concentración de la muestra es mayor que la de la solución estándar más alta, diluir manteniendo una concentración de ácido nítrico de 10% y reanalizar.
- v. Limpiar el tubo a intervalos regulares durante una serie de determinaciones cuando el blanco detecta efectos de memoria (contaminación cruzada), debido a que el elemento no se ha volatilizado totalmente durante la atomización.

1.5.1.6. Cálculos

- i. Examinar los valores obtenidos de concentración de Cd en los digeridos.

Nota 2: Si la concentración de Cd en el blanco es menor que el límite de detección del método o menor que el 10% de la concentración de la muestra más baja en Cd, entonces el blanco del método se puede considerar aceptable. Si no es así, volverlo a leer y si aún es inaceptable, todas las muestras analizadas después del último blanco del método aceptable deben repararse y reanalizarse.

Nota 3: La concentración de Cd en la muestra de referencia fortificada debe ser igual al valor de referencia más un valor entre 1,6 µg/L y 2,4 µg/L de Cd. Si esto no se cumple, volverla a leer. Si aún es inaceptable, todas las muestras después de la última muestra de referencia aceptable deben prepararse y reanalizarse

Nota 4: La recuperación de Cd en la muestra fortificada debe estar entre 80% y 120% (1,6 µg/L y 2,4 µg/L) y la diferencia relativa con el duplicado de la muestra fortificada debe ser menor del 20%. Si no es así, debe realizarse una de las pruebas de interferencia.

- ii. Calcular la concentración, expresada en mg/kg, de Cd total en base a muestra seca a 105°C±5°C, según:

$$\text{Cd (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times v \times d}{m \times 1000} \times Fh$$

donde:

a = concentración, en µg/L, de Cd en la muestra

b = concentración, en µg/L, de Cd en el blanco

v = volumen, en mL, de digerido (método 1.3.1.4, punto x o método 13.2.4, punto xii)

d = factor de dilución, si corresponde

m = masa, en g, de muestra

Fh = factor de corrección por humedad

1.5.1.7. Informes

- i. Informar el resultado obtenido en 6,2, en mg/kg con dos decimales, como:

Cadmio total = mg/kg de Cd, en base a muestra seca a 105°C±5°C

1.6. Metodología de medición de Zn en suelo (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.6.1. EAA de llama aire – acetileno por aspiración directa

1.6.1.1. Principio y alcance

- i. En el digerido proveniente del Método 1.3.1 o del Método 1.3.2 se determina la concentración de cinc por espectrofotometría de absorción atómica de llama aire – acetileno por aspiración directa.
- ii. Este método es aplicable en la determinación de cinc en lodos generados de plantas de tratamiento de aguas servidas y en suelos.
- iii. Este método tiene un límite de determinación instrumental de 0,02 mg/L o menor y un rango óptimo de concentración de 0,05 mg/L a 2 mg/L de Zn.

1.6.1.2. Interferencias

- i. Absorción no específica que requiere corrección de fondo.
- ii. Altas concentraciones de silicio, cobre o fosfato pueden interferir. La adición de 1500 mg/L de estroncio elimina las interferencias de cobre y fosfato.

1.6.1.3. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con los siguientes parámetros generales:
 - Lámpara de cinc,
 - Longitud de onda: 213,9 nm,
 - Combustible: acetileno,
 - Oxidante: aire,
 - Corrección de fondo: se requiere.

1.6.1.4. Reactivos

- i. Durante el análisis, usar solamente reactivos para análisis de trazas y agua reactivo Tipo I de ASTM D1193 (1999) o Grado 1 de ISO 3696 (1987) (CE máxima 0,06 – 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (0,006 – 0,01 mS/m)).
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 , 100%, $d=1,52 \text{ kg}/\text{L}$.
- iii. Solución estándar de cinc de 1000 mg/L de Zn: Disponible en el comercio.
- iv. Solución estándar de cinc de 10 mg/L de Zn: A un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - 1 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Zn,
 - 10 mL de ácido nítrico 100% (4.1),
 - agua hasta enrasar.
- v. Serie de estándares de cinc: a seis matraces aforados de 100 mL agregar:
 - 0-1-2-5-10 y 20 mL de la solución estándar de 10 mg/L de Zn,
 - 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene: 0,0-0,1-0,2-0,5-1,0 y 2,0 mg/L de Zn.

1.6.1.5. Procedimiento

- i. Seleccionar las condiciones de operación según las instrucciones del fabricante del espectrofotómetro. Usar corrección de fondo.
- ii. Calibrar a 213,9 nm con la serie de estándares de cinc (1.6.1.4 v).
- iii. Leer la concentración de cinc en los digeridos provenientes del Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii. Estos digeridos incluyen los de las muestras, del blanco, de la muestra de referencia fortificada, de una de las muestras fortificada y del duplicado de esta muestra fortificada.

Nota 1: Si la concentración en los digeridos es mayor que la de la solución estándar más alta, diluir manteniendo una concentración de ácido nítrico de 10% y reanalizar.

1.6.1.6. Cálculos

- i. Examinar los valores obtenidos de concentración de Zn en los digeridos.

Nota 2: Si la concentración de Zn en el blanco del método es menor que el límite de detección del método o menor que el 10% de la concentración de la muestra más baja en Zn, cualquiera sea mayor, entonces el blanco del método se puede considerar aceptable. Si no es así, volverlo a leer y si aún es inaceptable, todas las muestras después del último blanco del método aceptable deben prepararse y reanalizarse.

Nota 3: La concentración de Zn en la muestra de referencia fortificada debe ser igual al valor de referencia más un valor entre 0,16 mg/L y 0,24 mg/L de Zn. Si esto no se cumple, volverla a leer. Si aún es inaceptable, todas las muestras después de la última muestra de referencia aceptable deben prepararse y reanalizarse.

Nota 4: La recuperación de Zn en la muestra fortificada debe estar entre 80% y 120% (0,16 mg/L y 0,24 mg/L) y la diferencia relativa con el duplicado de la muestra fortificada debe ser menor del 20%. Si no es así, debe realizarse una de las pruebas de interferencia.

- ii. Calcular la concentración, expresada en mg/kg, de Zn total en base a muestra seca a 105°C±5°C, según:

$$\text{Zn (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times v \times d}{m} \times Fh$$

donde:

a = concentración, en mg/L, de Zn en la muestra

b = concentración, en mg/L, de Zn en el blanco

v = volumen, en mL, de digerido (Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii)

d = factor de dilución, si corresponde

m = masa, en g, de muestra (método 1.3.1.4, punto i o método 1.3.2.4, punto iv)

Fh = factor de corrección por humedad

- iii. Determinación de humedad (Martínez et al., 2022)

Los resultados de Cd podrán ser expresados de acuerdo con el fin previsto, en mg de Cd por kg de material en peso seco o peso fresco. La expresión del resultado será de acuerdo al servicio requerido y llevado a cabo, o de acuerdo con la normativa de comparación. A continuación, se describen los pasos a seguir si se desean expresar los resultados corregidos por la humedad:

Suelo: Posterior al proceso de secado a una temperatura < 40°C, molido y tamizado a 2 mm, tomar una fracción entre 5 a 20 g de suelo y, con ayuda de una estufa, secar el material durante 48 h a 105°C y luego registrar el peso inicial y final del suelo. Finalmente, proceder con el cálculo de humedad y la corrección del resultado de Cd aplicando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

Ecuación 1:

$$\% \text{ Humedad del suelo a } 105^{\circ}\text{C (h)} = \left[\frac{\text{peso del suelo seco a } 40^{\circ}\text{C} - \text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}}{\text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}} \right] \times 100$$

Ecuación 2:

$$\text{mg Cd/kgde suelo en peso seco} = \text{mg Cd/kg} * \left[\frac{(100 + h)}{100} \right]$$

1.6.1.7. Informe

- i. Informar el resultado obtenido, en mg/kg sin decimales, como:

Cinc total = mg/kg de Zn, en base a muestra seca a 105°C±5°C

2. DETERMINACIONES DE P, Zn y Cd EN MATRIZ VEGETAL

2.1. Preparación de muestras vegetales: descontaminación, secado, molienda y almacenaje (Sadzawka & Grez, 2004) (Martínez et al., 2022)

2.1.1. Principio

- i. La preparación de la muestra de tejidos vegetales es crítica para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, deben seguirse procedimientos adecuados para su descontaminación, secado, molienda y almacenaje.
- ii. Los tejidos vegetales a analizar deben estar limpios y libres de sustancias extraña como partículas de polvo y residuos de aplicaciones foliares que puedan influir en los resultados analíticos. Generalmente, los elementos más afectados por las partículas de polvo son Al, Fe, Mn y Si. Los residuos de aplicaciones foliares de nutrientes y fungicidas pueden afectar varios elementos y deben considerarse en la evaluación de los resultados analíticos. La descontaminación debe realizarse mientras se preserva la integridad de la muestra. Por lo tanto, el lavado debe realizarse solamente en muestras frescas y turgentes.
- iii. El secado de la muestra detiene los procesos enzimáticos y estabiliza la muestra.
- iv. La molienda asegura la homogenización de la muestra y facilita la destrucción de la materia orgánica. La molienda puede realizarse de modo mecánico 100% o incorporar temperatura de congelamiento como en la molienda criogénica que se realiza con nitrógeno líquido.
- v. Una vez molida y homogenizada la muestra, debe almacenarse en condiciones que minimicen su deterioro.
- vi. Para el Cd, en caso de ser necesario, cada matriz deberá ser lavada con agua de grifo y luego con agua destilada con el fin de eliminar cualquier partícula de suelo o material extraño adherido en la superficie y remover fertilizantes foliares. Las muestras lavadas deben de ser secadas con papel absorbente y luego ser colocadas en bolsas de papel para secarlas a 70± 5°C durante 48 h en la estufa o hasta evidenciar que el material se encuentre crocante. Las hojas secas se trituran utilizando morteros de porcelana o equipos como molinos de cuchillas, licuadoras o trituradores de laboratorio. La muestra pulverizada se tamiza a un tamaño <0,85 mm para asegurar una digestión completa.



Las almendras de cacao pueden llegar secas y fermentadas o en mazorca. Cuando llegan en mazorca, las almendras se colocan en un recipiente para retirar el mucílago manualmente. Una alternativa es utilizando un colador de plástico para lavarlas con agua de grifo y retirar la mayor cantidad de mucílago, o realizarlo manualmente almendra por almendra. Las almendras extraídas se secan a $70 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 72 h en la estufa. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se debe decidir si se retira o no la cascarilla o testa. Este trabajo adicional agrega tiempo a la entrega de los resultados, pero mejora la precisión analítica. Hay que tener en cuenta que la mayor concentración de Cd se encuentra en las capas externas de la almendra (Förste et al., 2023). Es muy importante incluir en el reporte si los resultados representan la concentración de Cd en almendras con o sin cascarilla.

Extender el material sobre un papel Kraft en un lugar limpio y libre de contaminación, formado un círculo, posteriormente dividir en cuatro secciones, tomar dos secciones transversales. Si la cantidad de material sigue siendo grande, con los dos cuadrantes seleccionados anteriormente, se debe realizar nuevamente el proceso de cuarteo, hasta obtener la cantidad necesaria

2.1.2. Equipos y materiales especiales

- i. Bolsas de papel
- ii. Esponja o cepillo con cerdas de nylon
- iii. Estufa con aire forzado capaz de mantener una temperatura de $70^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$.
- iv. Molino a cuchilla o molino criogénico.
- v. Tamices de tamaño de poro de 1,0 mm y 0,5 mm.
- vi. Refrigerador (no indispensable).

2.1.3. Reactivos

Durante el análisis, usar agua de clase 2 según la NCh426/2¹ ($\text{CE} < 0,5 \text{ mS/m}$ a 25°C).

- i. Solución de detergente: preparar una solución 0,1% a 0,3% a partir de un detergente no iónico (sin fosfato).

2.1.4. Procedimiento

Descontaminación

- i. Examinar las muestras frescas de tejidos vegetales y, si no se observan partículas extrañas, no es necesaria la descontaminación, excepto si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si.
- ii. Si se observan partículas de polvo, basta eliminarlas con un cepillo (2.1.2) para descontaminar la muestra, siempre que no sea de interés determinar los contenidos

¹ Norma Chilena Oficial: NCh 426/2 Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones

de Al, Fe, Mn o Si.

- iii. Si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si, las muestras deben lavarse con la solución de detergente (2.1.3) y enjuagarse con agua destilada o desionizada.
- iv. Después de la descontaminación, las muestras deben secarse inmediatamente para estabilizar el tejido y detener las reacciones enzimáticas.

Secado

- v. Introducir las muestras en bolsas de papel. Colocar las bolsas en una estufa con aire forzado (2.1.2) y secar a 70-80°C por 12 a 24 h.

Nota: Los tejidos con altos contenidos de carbohidratos pueden requerir otro tipo de procedimiento de secado.

Molienda

- vi. Una vez seca, moler la muestra en un molino mecánico hasta que pase a través de un tamiz de 1,0 mm si para el análisis se requiere una alícuota > 0,5 g o de un tamiz de 0,5 mm si se requiere una alícuota < 0,5 g.
- vii. La molienda de las muestras en molino criogénico requiere las siguientes fases:
 - Pre-enfriado: 5 min
 - Ciclos de molienda: 3 de 1 min por ciclo
 - Tiempo de reposo entre ciclos: 1 min
 - Ritmo: 10 impactos por seg
 - Una vez finalizado el proceso, se deja a T ambiente el tubo contenedor, se retira la muestra del mismo y se lo lleva a secar en estufa de vacío.
- viii. Después de la molienda, homogenizar la muestra y separar una porción de 5 a 10 g para los análisis y almacenaje.

Almacenaje

- ix. Colocar la porción de muestra representativa, molida y homogénea, en un recipiente hermético de plástico. Almacenar en un lugar oscuro, frío y seco.

Nota: Si los análisis no se realizan inmediatamente, almacenar en refrigerador (4°C). Las muestras molidas pueden almacenarse a temperatura ambiente, pero deben secarse a 65-70°C durante 2 h y luego enfriarse en desecador, antes de pesar para los análisis.

2.2. Calcinación en mufla a 500°C (Sadzawka & Grez, 2004)

2.2.1. Principio

- i. La muestra de tejido vegetal seca y molida se calcina a 500°C. Las cenizas se disuelven en HCl diluido y en la solución resultante se pueden determinar las concentraciones de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, **P y Zn**. Puede también utilizarse para Cd. (Barraza, 2020)

Nota: Este método no es adecuado para As, Hg, S y Se.



Los tejidos vegetales con altos contenidos de azúcares o aceites pueden requerir la adición de soluciones para facilitar la calcinación (H_2SO_4 10%, HNO_3 69% o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7%). Este método no es recomendado para tejidos vegetales altos en Si debido a la pobre recuperación de los micronutrientes, especialmente Zn y Fe.

2.2.2. Equipos y materiales especiales

- i. Crisoles o cápsulas de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad con tapa o vidrio de reloj.
- ii. Mufla.
- iii. Plancha calefactora.

2.2.3. Reactivos

- i. Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25 °C.
Nota: Usar agua de esta calidad en Reactivos (2.2.3) y Procedimiento (2.2.4).
- ii. Ácido clorhídrico, HCl.
- iii. HCl 37% d=1,19 kg/L
- iv. HCl 32% d=1,16 kg/L
- v. Ácido clorhídrico 2 mol/L: Diluir 166 mL de HCl 37% (o 197 mL de HCl 32%) con agua y llevar a 1 L.

2.2.4. Procedimiento

- i. Pesar 1 a 3 g (exactitud 0,01 g) de muestra de tejido vegetal seca y molida a 1 mm en un crisol de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
- ii. Colocar los crisoles en una mufla y lentamente subir la temperatura de manera de alcanzar los 500°C en dos h. Calcinar por 4-8 h a 500°C.
Nota: La temperatura no debe exceder de 500°C para evitar pérdidas potenciales de Al, B, Cu, Fe, K y Mn.
- iii. Dejar enfriar la mufla a temperatura ambiente, lentamente abrir la puerta, sacar los crisoles evitando disturbar las cenizas y taparlos con la tapa del crisol o con vidrio de reloj.
- iv. Entreabriendo la tapa, agregar cuidadosamente 1-2 mL de agua para humedecer las cenizas.
- v. Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 2 mol/L (2.2.3) y hervir en una plancha calefactora. Enfriar.
- vi. Filtrar el contenido del crisol a través de papel filtro de tamaño de poro $\leq 3 \mu\text{m}$, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 mL o 100 mL. Lavar y enrasar con agua.
- vii. En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de P (Método 2.3) y Zn (Método 2.4).

Nota: En el filtrado también se pueden medir Cu, Fe, Mn, Ca, Mg, K, Na, B y Al utilizando técnicas que no son parte de esta NT.

2.3. Metodología de medición de P por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato (Sadzawka & Grez, 2004)

2.3.1. Principio

- i. En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.2, se determina la concentración de P por colorimetría del complejo fosfo-vanadomolibdato.

2.3.2. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro visible con celdas de una longitud de paso de luz de 10 mm.

2.3.3. Reactivos

- i. Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25 °C y un pH mayor de 5,6.
- ii. Ácido clorhídrico, HCl.
 - a. HCl 37% d=1,19 kg/L
 - b. HCl 32% d=1,16 kg/L
- iii. Ácido clorhídrico 2 mol/L: Diluir 166 mL de HCl 37% (o 197 ml de HCl 32%) con agua y llevar a 1 L.
- iv. Ácido nítrico.
 - a. HNO₃ 69% d=1,41 kg/L
 - b. HNO₃ 100% d=1,52 kg/L.
- v. Solución de nitro-vanadomolibdato.
 - A Solución de vanadato de amonio, 0,9 g/L: Disolver 0,9 g de NH₄VO₃ en alrededor de 500 mL de agua hirviendo, enfriar y agregar 24 mL de HNO₃ 69% o 16 mL de HNO₃ 100%. Diluir con agua a 1 L.
 - B Solución de molibdato de amonio, 19 g/L: Disolver 19 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en agua a 50°C, enfriar y diluir a 1 L con agua.
 - C Ácido nítrico 1,5 mol/L: Diluir 97 ml de HNO₃ 69% o 62 ml de HNO₃ 100% con agua a 1 L.Mezclar las soluciones A, B y C en partes iguales,
- vi. Solución estándar de fósforo, 1000 mg/L de P.
 - a. Disponible en el comercio.
 - b. Preparado: Pesar 4,390 ± 0,001 g de fosfato dihidrógeno de potasio, KH₂PO₄, secado a 105 °C ± 1 °C durante 2 h, en un matraz aforado de 1000 mL. Disolver y enrasar con agua.
- vii. Serie de soluciones estándares de fósforo. A siete matraces aforados de 250 mL agregar:

- a. 05-10-15-20-25-50 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de P,
- b. 50 mL de HCl 2 mol/L,
- c. agua hasta enrasar.
- d. Esta serie de estándares contiene 0-20-40-60-80-100-200 mg/L de P

2.3.4. Procedimiento

- i. Tomar una alícuota de 1 mL de los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes de la calcinación (2.2.4 vii), y de la serie de estándares de P (2.3.3 vii d) en recipientes de vidrio.
- ii. Agregar 4 mL de la solución de nitro-vanado-molibdato (2.3.3 v) y mezclar.
- iii. Dejar reposar una hora.
- iv. Leer la absorbancia contra agua a 466 nm.
Nota: Puede usarse una longitud de onda entre 400 y 490 nm.

2.3.5. Cálculos

- i. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de P de la serie de estándares y calcular la ecuación de regresión.
Nota: El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las determinaciones
- ii. Calcular las concentraciones de P en los filtrados de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- iii. Calcular la concentración de P en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$P (\%) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 10.000}$$

$$P (g/kg) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 1000}$$

donde:

- a = mg/L de P en el filtrado de la muestra
- b = mg/L promedio de P en los filtrados de los blancos
- V = volumen final en mL (Método 2.2, punto 2.2.4 vi)
- m = masa en g de muestra (Método 2.2, punto 2.2.4 i)

2.3.6. Informes

Informar la concentración de P, en la muestra de tejido vegetal, en % con dos decimales o en g/kg con un decimal

2.4. Metodología de medición de Zn y Cd por espectrofotometría de absorción atómica (Sadzawka & Grez, 2004)

2.4.1. Principio

- i. En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.2, se determina la

concentración de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd por espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire-acetileno.

2.4.2. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con lámparas de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd.

2.4.3. Reactivos

- i. Ácido clorhídrico, HCl.
 - a. 3.1.1 HCl 37% d=1,19 kg/L
 - b. 3.1.2 HCl 32% d=1,16 kg/L
- ii. Solución estándar de cinc, 1000 mg/L de Zn: Disponible en el comercio.
- iii. Solución estándar de Zn diluida: a un matraz aforado de 200 mL agregar 5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Zn, agregar agua hasta enrasar. Esta solución contiene 25 mg/L de Zn.
- iv. Serie de estándares: a siete matraces aforados de 250 mL agregar:
→ 0-1-2-5-10-20-30 mL de la solución de estándar diluida (2.4.3 iii),
→ 8 mL de HCl 37% o 10 mL de HCl 32%,
→ agua hasta enrasar.
Esta serie de estándares contiene 0,0 - 0,1 - 0,2 - 0,5- 1,0 - 2,0 y 3,0 mg/L de Zn
Nota: Si por las características del EAA (2.4.2 i) es necesario utilizar otros rangos de concentración para que las lecturas se sitúen en el rango de linealidad, proceder a efectuar las diluciones que sean necesarias, siguiendo como referencia la técnica descrita.
- v. Estándares en matriz vegetal para Zn y Cd: se pueden utilizar los siguientes estándares comerciales
 - BCR CABBAGE 679: Elementos: Sb, As, Ba, B, Cd, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Sr, Tl, Zn.
 - Trace Elements in Spinach Leaves 1570a: Ca, P, K, Na, Al, As, B, Cd, Co, Cu, Mn.

2.4.4. Procedimiento

- i. En los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.2, punto 2.2.4 vi, y usando un espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire-acetileno y calibrado con la serie de estándares (2.4.3 iv), leer las concentraciones de Zn a 213,8 nm y de Cd a 228,8 nm.

2.4.5. Cálculos

- i. Calcular las concentraciones de Zn/Cd en la muestra, en mg/kg, según:

$$\text{Cd, Zn (mg/kg)} = ((a-b) \times V)/m$$

donde:

a = mg/L de Zn o Cd el filtrado de la muestra

b = mg/L promedio de Zn o Cd en los filtrados de los blancos

V = volumen final en mL (Método 2.2, punto 2.2.4 vi)

m = masa en g de muestra (Método 2.2, punto 2.2.4 i)

2.4.6. Informes

Informar las concentraciones de Zn o Cd en la muestra, en mg/kg.

3. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Se adjunta en ANEXO, la metodología estandarizada de US EPA 3050B, 3051 y 3052 para P, Zn y Cd en suelo y en matriz vegetal, como también metodologías aplicadas en cacao en grano y en polvo. Además, se referencia mediante link a “Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material de cacao (*Theobroma cacao* L.). Mariela Martínez A., Daniel Bravo, Yeni Rodríguez-Giraldo, Laura Ramírez, Elías García, Martha Hidalgo y Eduardo Chávez (2023) FONTAGRO. <https://www.fontagro.org/new/uploads/productos/17235 - Producto 4.pdf>

DISCUSIÓN

Las técnicas utilizadas para la cuantificación analítica son: Espectrometría de Absorción Atómica (AAS, por sus siglas en inglés), AAS con horno de grafito (GFAAS), Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Masas por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y, muy recientemente, Fluorescencia de Rayos X (XRF) (Förste et al., 2023).

AAS e ICP-OES han sido empleados para la medición de macro y micronutrientes, mientras que GF-AAS e ICP-MS se utilizan para la detección de metales pesados y elementos trazas. Sin embargo, dado que la problemática de Cd en almendras de cacao se presenta en concentraciones superiores a los 0,10 mg/kg, el ICP-OES puede ser empleado de forma precisa para la detección de valores superiores al mencionado anteriormente (Martínez et al., 2022). La pureza de los reactivos es fundamental; el agua ultrapura debe tener una conductividad no mayor a los 0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para evitar interferencias.

Con respecto a la solución de Cd para calibración, es necesario utilizar un estándar de Cd con concentración conocida, suministrado por proveedores acreditados en ISO/IEC 17034, lo que permitirá el uso de un material de referencia trazable metrológicamente a nivel internacional (Martínez et al., 2022). Barraza (2020) compara distintos estándares, marcando que son muy importantes tanto los estándares de medición del proceso de digestión (mineralización) como de análisis.

Con respecto al secado, puede realizarse por varios métodos o una combinación de ellos, como estufa de secado o campana de flujo laminar. El material debe conservarse sellada y protegido de la luz y luego refrigerarse o congelarse hasta su análisis.

Para el cadmio, Martínez et al (2022) indican que si el laboratorio cuenta con equipamiento de alta sensibilidad como ICP-MS, la cantidad de muestra puede ser de 100 mg (Argüello et al., 2019) o 300 mg (Rodríguez-Giraldo et al., 2022). Mientras que, si el laboratorio posee equipos menos sensibles como ICP-OES o AAS, se debe de incluir una mayor masa inicial, entre 350 y 500 mg para material vegetal y hasta 2 g para suelo (Chávez et al., 2015). El método más



común de digestión es el $\text{HNO}_3\text{:HCl}$ (3:1, v:v), también conocido como agua regia (Lo Dico et al., 2018). En otros casos, también se utiliza H_2O_2 en alguna de las etapas de la mineralización, sobre todo cuando se trabaja con almendras para solubilizar las grasas (Barraza et al., 2017). Algunos investigadores han utilizado solamente HNO_3 para mineralizar hojas, ya que es una matriz muy simple de digerir (Argüello et al., 2020).

En muestras de suelo, es común que los laboratorios realicen métodos de extracciones simples, que son menos laboriosos y peligrosos, y que pueden ser implementados a un mayor número de muestras por día (Chavez et al., 2015). Algunos de los más comunes son 0,01 M CaCl_2 , 1 M DTPA y Mehlich III. Sin embargo, existe discrepancia entre investigadores acerca del cual es el método mas apropiado para cacao (ver: Ramtahal et al., 2015; Chavez et al., 2016; Gramlich et al., 2018).

En general, el rango puede ir desde 1:20 a 1:60 (m:v) para ICP-OES y ICP-MS, respectivamente. Adicionalmente, la temperatura de digestión afectará el tiempo para evaporar el ácido adicionado a las muestras. En este sentido, usando temperaturas entre 80 – 100 °C se necesitarán entre 6 y 8 h para mineralizar las muestras, mientras que a temperaturas >120 °C requerirán menos tiempo para evaporar los ácidos, lo que se considera un indicador de la digestión de las muestras. Esto ocurrirá solo si las muestras son mineralizadas en un digestor abierto o en una plancha de calentamiento.

Es recomendable realizar la evaporación de los ácidos después de la digestión en microondas, destapar los tubos de teflón y el contenido trasvasarlo a los tubos de borosilicato, lavar el primer tubo con agua tipo 1 y trasvasarlo al segundo tubo. Luego, hacer la digestión en bloque abierto o en una placa de calentamiento hasta evaporación (volumen 1 mL), y así evitar acarrear un alto porcentaje de ácido a la cámara de nebulización del ICP-OES o ICP-MS. En algunas ocasiones, los investigadores proponen usar rampas de temperatura para la digestión de suelo; esto es muy común en las configuraciones de los digestores de microondas. Sin embargo, el uso de rampas no es obligatorio y se debe de considerar solo si no existiera una digestión correcta de las muestras.

Rodríguez Giraldo et al. (2022) validan metodologías aplicando ICP-MS y ICP-OES, encontrando que los límites de cuantificación de Cd mediante ICP-MS e ICP-OES fueron 0,005 mg/kg y 0,043 mg/kg-, respectivamente. Los porcentajes de recuperación de Cd con material de referencia certificado (chocolate para hornear NIST® SRM® 2384) para ICP-MS e ICP-OES fueron del 95% y 92%, respectivamente. Las incertidumbres estándar combinadas obtenidas para determinar el Cd utilizando ICP-MS e ICP-OES no superaron el 8%. Estos investigadores realizaron controles internos y externos con laboratorios de referencia y pudieron cuantificar Cd con valores inferiores y superiores a la cantidad mínima permitida por la regulación europea para productos derivados del cacao (0,1 mg/kg de Cd).

La digestión de material vegetal (raíz, tallos, hojas, mazorca, hojarasca, almendras o cascarilla) es mucho más homogénea que la digestión de los suelos. Las condiciones de digestión varían entre laboratorios, pero se recomienda el uso de temperaturas > 90 °C por un tiempo mínimo de 4 h. Como agente oxidante se recomienda el uso de HNO_3 en un ratio de 10-25:1 (ácido:muestra, v:m). Además, se puede emplear un único ciclo de digestión y una sola rampa



de temperatura.

En cuanto a los controles analíticos y de calidad, es recomendable estandarizar la utilización de sistemas de controles analíticos y de calidad (QA/QC) que permitan asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados reportados. Los controles de calidad son aquellos pasos que se implementan en la etapa de procesamiento de la muestra, mientras que los controles analíticos están orientados a asegurar la cuantificación correcta del analito en la solución. Resumiendo, los controles analíticos son muestras que forman parte del proceso de pesaje, digestión y disolución (Martínez et al, 2022).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Estos resultados demuestran que el uso de un método universal para determinar la concentración de Zn y P está disponible, quizás por sus concentraciones relativamente altas o su inocuidad sanitaria. Sin embargo, para el Cd (al menos el fitodisponible) hasta la fecha no ocurre lo mismo, ya que no ha sido reportado un método universal, y tal vez no sea posible tener uno, ya que probablemente el Cd fitodisponible varíe entre tipos de suelo y/o en el tipo de matriz a analizar.

En cuanto al equipamiento las determinaciones de P y Zn no presentan diferencias al momento de elegir el equipo, mientras que para el Cd, las concentraciones son tan bajas que utilizar un ICP-MS proporciona gran sensibilidad, aunque no están tan disponibles en la región. En el caso del Cd hay que poner especial cuidado en el almacenamiento de la biomasa para evitar el desarrollo fúngico-microbiano en el momento de las determinaciones. La forma de expresión de los resultados también es diferente en el caso del cadmio, siendo necesario tener en cuenta la humedad. Por último, la determinación de los parámetros de QA/QC es crucial para una correcta evaluación de los resultados. Algunos aspectos a mencionar son la adecuada elección de los estándares de proceso y de análisis, la determinación del límite de detección, los interferentes, los controles externos e internos y el límite de cuantificación.

Las muestras de cacao son complejas y difíciles de analizar debido a su alto contenido de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, fitoesteres, tocoferoles, azúcares, polifenoles, teobromina y cafeína (Mohamed et al., 2020). Es por ello que en la bibliografía se encuentran diversos métodos para la cuantificación del cadmio y otros elementos traza, sin embargo, en muchos casos se omite información sobre la validación de dichos métodos, tales como los límites de detección, cuantificación, rendimiento del material de referencia, precisión y reproducibilidad. Es importante notar que, aunque la Unión Europea haya fijado un valor máximo para el contenido de Cd en el chocolate, aún no existe un protocolo a seguir para la determinación de este elemento.

En el caso de los certificados del material de referencia (SRM, standard reference material) como el NIST 2384 Baking chocolate, encontramos información sobre cuáles fueron las diferentes técnicas de espectrofotometría utilizadas para el análisis de cada elemento: ICP-OES para elementos como el Ca, Cu, Fe, Zn e ICP-MS para el Pb y Cd, así como el tipo de digestión, en este caso, en microondas con HNO₃. En Perú, existe una norma técnica del



Instituto Nacional de Calidad (INACAL) para la determinación de Cd, Cu, Fe y Zn en chocolate y cacao (NTP 208.030 2015), donde primero se calcina la muestra antes de adicionar los ácidos (HNO_3 y HCl), y finalmente se procede a la lectura por AAS o GF-AAS

En cuanto a las muestras, el rango de concentración del analito es sumamente importante porque la masa de la muestra y la dilución final de la solución mineralizada afectarán los límites de detección de la técnica utilizada (LD). La mayoría de los elementos son solubles o estables en HNO_3 . En el caso del HCl , que es el segundo ácido más utilizado en las digestiones debido a que es corrosivo y volátil, puede dañar el sistema eléctrico de equipos como el ICP-MS, por ello, se recomienda reducir la exposición y preferiblemente no preparar diluciones con este ácido. La correcta elección de reactivos también es una etapa clave. Por ejemplo, en algunos casos el uso de H_2SO_4 puede formar sulfatos con algunos elementos, lo que interfiere cuando se usa el ICP-MS o el GF-AAS. Del mismo modo, una digestión ineficiente o incompleta genera interferencias (efecto matriz).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argüello, D., Chávez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: a nationwide survey in Ecuador. *Sci. Total Environ.*, 649:120-127, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>.
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., ... & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950-963.
- Barraza, F. (2020). Guía para la determinación de cadmio (Cd) en muestras de cacao en granos y en polvo. https://issuu.com/zentraagenciacreativa/docs/libro_final_versi_n_issuu
- Bray, R. H. & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science* 59:39-45.
- Carrillo, I. F. (1985). Manual de laboratorio de suelos. CENICAFE.
- Chávez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B. & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci. Total Environ.*, 533:205-214, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06>.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Dico, G. M. L., Galvano, F., Dugo, G., D'ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., ... & Ferrantelli, V. (2018). Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245, 1163-1168.



- Förste F., Bauer, L., Streeck, C., Radtke, M., Reinholz, U., Kadow, D., Keil, C. & Mantouvalou, I. (2023). Quantitative analysis and 2D/3D elemental imaging of cocoa beans using X-ray fluorescence techniques. *Analytical Chemistry* 2023 95 (13), 5627-5634. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c05370
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370-378
- James, D. W., & Wells, K. L. (1990). Soil sample collection and handling: Technique based on source and degree of field variability. *Soil testing and plant analysis*, 3:25-44.
- Landon, J. R. (1984). *Booker tropical manual. A handbook for soil survey and agricultural land evaluation in the tropics and subtropics*. Booker Agricultural International Ltd. UK.
- Martínez, M., Bravo, D., Rodríguez-Giraldo, Y., Ramírez, L., García, E., Hidalgo, M., & Chávez, E. (2022). Producto 4. Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- McKean, S. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías*. Centro Internacional de Agricultura Tropical· CIAT. Colombia.103pp.
- Mohamed, R., Zainudin, B. H. & Yaakob, A. S. (2020). Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave-assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 303, 125392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125392>.
- Olsen, S. R. (1954). Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (No. 939). US Department of Agriculture.
- U.S. EPA. (1996). "Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils," Revision 2. Washington, DC.
- U.S. EPA. (2007). "Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils," Revision 1. Washington, DC.
- U.S. EPA. (1996). "Method 3052 (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices". Washington, DC.
- Ramtahal, G., Chang Yen, I., Ahmad, N., Bekele, I., Bekele, F., Maharaj, K., ... Harrynanan, L. (2015). Prediction of Soil Cadmium Bioavailability to Cacao (*Theobroma cacao* L.) using Single-Step Extraction Procedures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(20), 2585–2594. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1089262>
- Rodríguez Giraldo, Y., Rodríguez Sánchez, E., Torre,s L. G., Montenegro, A. C. & Pichimata, M. A. (2022), Development of validation methods to determine cadmium in cocoa almond from the beans by ICP-MS and ICP-OES, *Talanta Open*, Volume 5, 100078, ISSN 2666-8319, <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100078>.
- Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, A., & Mora, M. L. (2004). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA) de la Sociedad Chilena de



la Ciencia del Suelo. Chile.

TMECC Method 04.12. 2002. Digestion techniques. In: The United States Composting Council. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, New York, USA.

Thomas, G. W., Peaslee, D. E., Walsh, L. M., & Beaton, J. D. (1973). Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America: Madison, WI.

Zagal, E. & Sadzawka, A. (2007). Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos. Universidad de Concepción, Servicio Agrícola y Ganadero: Santiago, Chile.



ANEXO 1

INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org



Producto 5: *Notas Técnicas* conteniendo 6 *Metodologías* diseñadas para la estandarización y normatización de los resultados de Laboratorio de P, Cd y Zn en suelo y matriz vegetal.

Gabriela Coria, Inmaculada García-Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre, Adalgisa Scotti

2024



Códigos JEL: Q16

ISBN: (Este registro lo realizarán los autores en caso de ser necesario, queda a criterio del líder del proyecto)

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Inmaculada García-Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre y Adalgisa Scotti

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract.....	7
Resumen EJECUTIVO	8
Palabras Clave:	8
Introducción.....	9
Objetivos.....	10
Resultados.....	10
1. Determinaciones de P, Zn y Cd en suelo	10
1.1. Muestreo.....	10
1.2. Preparación de la muestra	11
1.2.1. Principio.....	11
1.2.2. Equipos y materiales	11
1.2.3. Procedimiento	11
1.3. Digestiones.....	12
1.3.1. Ácido nítrico-ácido perclórico	12
1.3.1.1. Principio y alcance	12
1.3.1.2. Equipos y materiales.....	12
1.3.1.3. Reactivos.....	12
1.3.1.4. Procedimiento	13
1.3.2. Con ácido nítrico asistido con microondas	14
1.3.2.1. Principio y alcance	14
1.3.2.2. Equipos y materiales.....	14
1.3.2.3. Reactivos.....	14
1.3.2.4. Procedimiento	15
1.4. Metodología de medición de P en suelo	16
1.4.1. Método Olsen.....	17



1.4.1.1.	Principio	17
1.4.1.2.	Reactivos.....	18
1.4.1.3.	Procedimiento	19
1.4.2.	Método Bray II.....	19
1.4.2.1.	Principio	19
1.4.2.2.	Reactivos.....	20
1.4.2.3.	Procedimiento	20
1.5.	Metodología de medición de Cd en suelo	20
1.5.1.	EAA electrotérmica.....	20
1.5.1.1.	Principio y alcance	20
1.5.1.2.	Interferencias.....	21
1.5.1.3.	Equipos y materiales especiales	21
1.5.1.4.	Reactivos.....	21
1.5.1.5.	Procedimiento	22
1.5.1.6.	Cálculos	22
1.5.1.7.	Informes.....	23
1.6.	Metodología de medición de Zn en suelo	23
1.6.1.	EAA de llama aire – acetileno por aspiración directa	23
1.6.1.1.	Principio y alcance	23
1.6.1.2.	Interferencias.....	23
1.6.1.3.	Equipos y materiales especiales	24
1.6.1.4.	Reactivos.....	24
1.6.1.5.	Procedimiento	24
1.6.1.6.	Cálculos	25
1.6.1.7.	Informe	26
2.	Determinaciones de P, Zn y Cd en matriz vegetal.....	26
2.1.	Preparación de muestras vegetales: descontaminación, secado, molienda y almacenaje	26
2.1.1.	Principio.....	26
2.1.2.	Equipos y materiales especiales.....	27
2.1.3.	Reactivos	27

2.1.4. Procedimiento	27
2.2. Calcinación en mufla a 500°C.....	28
2.2.1. Principio.....	28
2.2.2. Equipos y materiales especiales.....	29
2.2.3. Reactivos	29
2.2.4. Procedimiento	29
2.3. Metodología de medición de P por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato.....	30
2.3.1. Principio.....	30
2.3.2. Equipos y materiales especiales.....	30
2.3.3. Reactivos	30
2.3.4. Procedimiento	31
2.3.5. Cálculos.....	31
2.3.6. Informes	31
2.4. Metodología de medición de Zn y Cd por espectrofotometría de AA	31
2.4.1. Principio.....	31
2.4.2. Equipos y materiales especiales.....	32
2.4.3. Reactivos	32
2.4.4. Procedimiento	32
2.4.5. Cálculos.....	32
2.4.6. Informes	33
3. MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	33
Discusión	33
Conclusiones y recomendaciones.....	35
Referencias Bibliográficas.....	36
Anexo 1.....	39
Instituciones participantes	40



INDICE CUADROS

Cuadro 1. Los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes encontrados en algunos análisis de suelo	17
---	----



ABSTRACT

Se realizó una compilación de diversas metodologías para la medición de fósforo, cadmio y cinc tanto en suelo como en la matriz vegetal. Se abordaron metodologías normalizadas y modificaciones documentadas en la bibliografía para establecer los parámetros metodológicos para cada laboratorio, desde la toma de muestra hasta los cálculos finales. Un aspecto muy importante es saber cuáles estándares serán utilizados y cuál es el rango de concentración con el que se estima trabajar. Por último, es necesario saber si hay interferentes o riesgos de pérdida de elementos, como también si las mediciones están realizadas a la longitud de onda correcta teniendo en cuenta la sensibilidad, la calidad de la medición y los factores críticos que enfrenta la metodología elegida al momento de analizar los resultados obtenidos en las mediciones analíticas. En este trabajo se documentaron las metodologías y se determinaron los parámetros de calidad para los principales elementos que están siendo utilizados en el proyecto titulado “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico” en el cual se utiliza un sistema fúngico (micorrízico-saprobio) modificador de la incorporación de cadmio en la planta de cacao.

A compilation of various methodologies was made for the measurement of phosphorus, cadmium and zinc both in soil and in plant matrix. Standardized methodologies with modifications documented in the bibliography, were addressed. It is important to establish the methodological parameters for each laboratory, from sample collection to final calculations. An important aspect is known which standards will be used and what is the concentration range with which it is estimated to work. Finally, it is necessary to know if there are interferences or risks of losing elements. As well as knowing if the measurements are made at the correct wavelength and taking into account the sensitivity, the quality of the measurement and the critical factors faced by the chosen methodology when analyzing the results obtained in the analytical measurements. In this work, the methodologies were documented and the quality parameters were determined for the main elements that are being used in the project entitled “Bioprocess that reduces the solubility of rhizospheric cadmium” in which a fungal system (mycorrhizal-saprobic) is used to modify the incorporation of cadmium in the cocoa plant.



RESUMEN EJECUTIVO

En este trabajo se abordó una recopilación de metodologías para la medición de fósforo, cadmio y cinc en suelo y biomasa (tejido vegetal). Existen diversas metodologías que comprenden los denominados métodos de screening y métodos de referencia. En este trabajo consideramos solo los métodos normalizados y modificados existentes en la bibliografía.

Se comienza con una exhaustiva descripción de la toma de muestra tanto desde aspectos técnicos como estadísticos con el fin de que la muestra sea representativa del total y no sufra cambios en su traslado y almacenamiento hasta llegar al laboratorio. El paso siguiente es la caracterización de la muestra aportando parámetros que permitan la elección de la metodología para el suelo y para biomasa. Un aspecto muy importante a considerar es tener en cuenta la cantidad de muestra antes de elegir la metodología. Un modo de independizarse de este factor es la digestión mediante diversos métodos, en los cuales obtenemos un lixiviado. En este punto es importante tener en cuenta las concentraciones sobre las que estimamos estando trabajando para que el lixiviado no ingrese bajo los límites de detección del método. Además, es importante tener de referencia patrones o estándares apropiados a la matriz con la cual se trabaja y que sean acordes con las concentraciones que queremos medir. Tras estas consideraciones que deben ser tenidas en cuenta previamente, luego se determina el equipamiento a utilizar y si se realizan las determinaciones por duplicado, triplicado o cuadruplicado según la variabilidad de la muestra.

Los elementos a medir en este trabajo son P, Zn y Cd ya que ellos son los principales analitos que nos permiten ajustar parámetros en el procedimiento aplicado en el proyecto Fontagro titulado “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico”. Para el caso del P y Zn se refirieron métodos conocidos y sus alternativas en cuanto a digestiones, equipamiento y estándares para control de calidad interno y externo. En el caso del cadmio, por la relevancia de la determinación para el proyecto se recopiló no solo la metodología de referencia sino la experiencia de especialistas en la problemática del cadmio en el cacao. Esta recopilación permite tener una guía para las metodologías a emplear desde el muestreo hasta la interpretación de los resultados para cada una de las matrices señaladas.

PALABRAS CLAVE:

CADMIO – CINC - FÓSFORO – SUELO – BIOMASA – METODOLOGÍA DE REFERENCIA



INTRODUCCIÓN

Existen muchas metodologías para las determinaciones de P, Zn y Cd. En esta recopilación se pone en valor las metodologías normatizadas y de referencia para poder ser utilizadas en el tratamiento previo de las muestras para las mediciones, teniendo en cuenta el tipo de matriz, en este caso: suelo y biomasa. Otros aspectos importantes a tener en cuenta son la cantidad de material, los estándares utilizados, la sensibilidad del método, los interferentes y los rangos de concentración sobre los cuales se trabajará para elegir la metodología.

En ese sentido se recopilaron metodologías de análisis que tenían una base bibliográfica y descripciones normatizadas como también las utilizadas por los laboratorios de referencia participantes en el proyecto *Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico*. En este proyecto se plantea un bioproceso empleando hongos micorrícicos y saprobios que interfieren en la bioacumulación de cadmio en la almendra del cacao. Los elementos P, Zn, y Cd son los principales que se necesitan determinar para ajustar la metodología del bioproceso. Cabe destacar que la problemática del cadmio en el cacao se debe a la bioacumulación del metal en la semilla que se utiliza para elaborar el chocolate. Según una disposición de la UE, la concentración del metal en la almendra no debe superar el límite de 0,8 mg/kg para la comercialización del cacao proveniente de la Región LAC, debido a los problemas de salud que ocasiona este elemento al acumularse en los tejidos.

Para identificar los efectos del bioproceso, se realizó una compilación de metodologías, enfatizando para cada elemento los puntos críticos. Dado que no existe una norma metodológica establecida, la elección del método y los procedimientos a ejecutar (desde el muestreo hasta los cálculos finales) es determinante para una interpretación correcta de los análisis de laboratorio.

El proceso comienza con la preparación de la muestra. En los tejidos vegetales la preparación es crítica para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, deben seguirse procedimientos estrictos en su limpieza, secado, molienda y almacenaje. En el caso de las muestras de suelo, además de la preparación de las muestras, hay que prestar especial atención al muestreo, ya que un muestreo deficiente (pocas muestras o no representativas) puede conducir a interpretaciones de resultados erróneos.

Los métodos de USEPA para suelos y biomasa, como también los métodos de Olsen (Olsen, 1954), fueron transcritos incorporando modificaciones de diversos autores, lo que brinda la posibilidad de elegir la metodología a aplicar según distintos métodos de digestión (mineralización), equipos existentes, cantidad de muestra disponible y rango de concentraciones esperadas. Adicionalmente, se recogió la información brindada por especialistas de la Plataforma Multiagencia Cacao 2030-2050 y otras experiencias de analistas de la región LAC.

Por último, se destaca la importancia de los distintos niveles de control de calidad, tanto internos como externos, en suelo y biomasa, en la determinación analítica y en la mineralización, de modo tal que se pueda detectar si el problema está ocurriendo en la determinación analítica o en el procedimiento de digestión. Asimismo, se hace referencia a



los estándares empleados, tanto comerciales como preparados en laboratorio, y a los cálculos de recuperabilidad para las matrices descritas: suelo, hojas, raíces, almendras etc.

OBJETIVOS

El objetivo general de este Producto es describir las diversas metodologías que se pueden aplicar para las determinaciones de P, Zn y Cd en suelo y matriz vegetal de modo tal de validar una metodología trazable, precisa y repetible.

RESULTADOS

1. DETERMINACIONES DE P, Zn y Cd EN SUELO

1.1. Muestreo

Lo más importante del muestreo de suelos es que las muestras sean representativas de la región a analizar, componiendo un todo homogéneo. En casos de alta variabilidad, se debe considerar hacer previamente un análisis de componentes principales abarcando todas las muestras y separarlas en clústeres, de modo tal que la variabilidad de la varianza de cada cluster sea adecuada en nuestras investigaciones (McKean, 1993).

La variabilidad que se encuentra en el campo no es solo vertical, sino también horizontal, pudiendo ser natural o inducida. Se han desarrollado varios procedimientos para recoger muestras representativas de esta variabilidad (Carrillo, 1985, James & Wells, 1990). El método más común es el de la muestra compuesta, donde se toman al azar de un área dentro del campo y se combinan para obtener una muestra compuesta mucho más representativa del promedio de lo que existe en el campo.

El número de submuestras debe estar entre 15 y 40. Un incremento del número aumenta la precisión y la exactitud, pero no de forma lineal. Normalmente, se toman las muestras a la profundidad de la zona de las raíces o de la capa arable, usando un barreno o un tubo después de quitar la hojarasca. Posteriormente, se mezclan y se envía toda la muestra compuesta, o una parte, al laboratorio. Todo el equipo de muestreo debe estar limpio y libre de contaminación. Es preferible evitar almacenar las muestras húmedas por mucho tiempo, en el caso que esto fuera necesario, se pueden guardar a 4 °C hasta su análisis

El muestreo debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. La profundidad del muestreo.
2. El número de muestras en el compuesto.
3. El tamaño del área para muestrear.
4. La influencia del cultivo.
5. La estación.



6. La frecuencia de muestreo.

Es crucial identificar adecuadamente las muestras de suelo antes de llevarlas al laboratorio.

1.2. Preparación de la muestra (Zagal & Sadzawka, 2007) (Martínez et al., 2023)

1.2.1. Principio

- i. El objetivo de la preparación es homogeneizar la muestra de suelo para ser usada en los análisis químicos y físicos. Estos análisis generalmente se realizan en la fracción fina de suelo (<2 mm, Malla # 10), la cual se ha secado a una temperatura no superior a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta alcanzar una masa constante, constituyendo lo que se denomina “suelo seco al aire”. Las ventajas de usar el suelo seco al aire consisten en que generalmente posee un contenido de humedad óptimo para manipularlo y procesarlo, la masa de suelo seco al aire permanece relativamente constante y la actividad microbiana es baja durante el almacenaje.

Nota 1: El secado de la muestra en una estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ es preferible al secado a temperatura ambiente porque el aumento en la velocidad de secado limita los cambios debidos a la actividad microbiana. Las temperaturas no deben ser muy elevadas porque esto puede cambiar algunas propiedades del suelo.

- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.
- iii. Después de secar y tamizar, la muestra se almacena en un recipiente limpio hasta el análisis.

1.2.2. Equipos y materiales

- i. Martillo de madera o de otra superficie suave, o tapón de goma.
- ii. Bandejas.
- iii. Láminas de plástico.
- iv. Estufa con circulación de aire capaz de mantener una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (no indispensable).
- v. Tamiz de acero inoxidable o de otro material inerte, con orificios de 2 mm.
- vi. Mortero y pistilo de porcelana.
- vii. Bolsas o frascos de plástico con tapa para almacenar las muestras.
- viii. Mortero y pistilo de ágata.
- ix. Tamiz de acero inoxidable o de otro material inerte, de orificios de 0,5 mm o de otro tamaño especificado en el método de análisis.

1.2.3. Procedimiento

- i. Homogeneizar bien la muestra de terreno, disgregando los terrones manualmente o mediante presión con un martillo de madera o un tapón de goma (1.2.2), eliminando las piedras y los residuos vegetales de mayor tamaño, tales como raíces gruesas.

Nota 2: En el caso de suelos arcillosos, secar previamente la muestra hasta alcanzar un grado de humedad que permita una fácil desintegración de los terrones.

- 
- ii. Separar una fracción de al menos 500 g de la muestra de terreno (en adelante muestra de laboratorio o simplemente muestra de suelo) y esparcirla sobre una bandeja cubierta con una lámina de plástico. El espesor de la capa de muestra no debe ser superior a 15 mm.
 - iii. Secar la muestra al aire, dejando la bandeja en un ambiente ventilado libre de contaminación, o bien en estufa a una temperatura no superior a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que la pérdida de masa no sea mayor del 5% en 24 h.
 - iv. Tamizar la muestra a través del tamiz de 2 mm. Los terrones que no pasan por el tamiz se disgregan (no se muelen) en un mortero de porcelana y se tamizan nuevamente. Los fragmentos orgánicos y grava que permanecen en el tamiz se eliminan, a menos que se requiera conocer el porcentaje de grava.
 - v. La muestra de fracción < 2 mm se homogeniza y se almacena en una bolsa o frasco plástico y constituye la muestra de suelo seco al aire que se somete a los procedimientos analíticos usuales. El remanente de la muestra de terreno se almacena en una bolsa plástica y permanece como contra muestra.
- Nota 3: Si la cantidad de muestra es excesiva para almacenarla, obtener una submuestra mediante el sistema de cuarteo. Para ello, esparcir la muestra formando una capa delgada, dividirla en cuatro porciones iguales y combinar dos de las cuatro porciones diagonales, descartando las otras dos. Repetir este procedimiento hasta obtener la cantidad deseada de muestra de suelo.
- vi. Para el análisis del contenido total de metales, moler en un mortero de ágata alrededor de 5 a 10 g de muestra < 2 mm y pasarla **totalmente** a través de un tamiz de 0,5 mm.

1.3. Digestiones

1.3.1. Ácido nítrico-ácido perclórico (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.3.1.1. Principio y alcance

- i. La muestra seca y molida, de suelo, se digiere con ácido nítrico y ácido perclórico. En el digerido se pueden determinar las concentraciones de Cd y Zn, así como As, Cu, Ni, Pb, Se.
- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.

1.3.1.2. Equipos y materiales

- i. Digestor de tubos.
- ii. Tubos de digestión de vidrio de 250 mL de capacidad, con tapones de teflón y tubos refrigerantes para permitir la condensación de vapores.
- iii. Discos filtro de tamaño de poro $< 25 \mu\text{m}$.

1.3.1.3. Reactivos

- i. Deben usarse solamente reactivos de grado analítico o grado para trazas. Todas las referencias a “agua” se refieren a agua reactivo que debe cumplir los requisitos dados por ASTM D1193 (1999) Tipo I o ISO 3696 (1987) Grado 1 (CE máxima $0,06 - 0,1 \mu\text{S/cm}$ ($0,006 - 0,01 \text{ mS/m}$)).

- 
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 100%, densidad 1,52 kg/L.
 - iii. Ácido perclórico, HClO_4 70%, densidad 1,66 kg/L.
 - iv. Solución para fortificar: A un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - alrededor de 50 mL de agua,
 - 1 mL de ácido nítrico,
 - 1 mL de solución estándar de 10 mg/L de Cd (Método 1.5),
 - 1 mL de solución estándar de 1000 mg/L de Zn (Método 1.6),
 - agua hasta enrasar.
 - v. Esta solución para fortificar contiene:
 - 100 $\mu\text{g/L}$ de Cd,
 - 10 mg/L de Zn.

1.3.1.4. Procedimiento

- i. En tubos de digestión, pesar alrededor de 1 g (exactitud 0,01g) de muestra secada a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y $< 0,5$ mm de suelo (1.2.3 vi). Incluir 1 blanco, 1 muestra de referencia fortificada con 2 mL de solución para fortificar, 1 de las muestras de la tanda fortificada con 2 mL de solución para fortificar y 1 duplicado de esta muestra fortificada con 2 mL de solución para fortificar.
- ii. Agregar 25 mL de HNO_3 100% y agitar manualmente el matraz para homogenizar la muestra.
- iii. Colocar los tapones de teflón con los refrigerantes.
- iv. Digerir a 60°C durante la noche. Mezclar bien.
- v. Digerir a 120°C durante 1 h. Enfriar, mezclar y remover los refrigerantes.
- vi. Calentar a 140°C hasta que quede un volumen de alrededor de 5 mL.
- vii. Enfriar a menos de 60°C .
- viii. Agregar cuidadosamente 5 mL de HClO_4 70%, colocar nuevamente los refrigerantes y digerir a 220°C durante 30 min.

Nota 1: El período de predigestión, el uso de refrigerantes y el aumento progresivo del poder oxidante, combinando ácidos y temperaturas, ayudan a evitar la formación de compuesto volátiles de As y Se.

Nota 2: No debe usarse ácido perclórico en campanas de extracción de madera por el peligro de explosión.

- ix. Enfriar y lavar los refrigerantes y las paredes de los tubos con agua.
- x. Filtrar y enrasar con agua a 100 mL.

Nota 3: En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cd (Método 1.5) y Zn (Método 1.6).

1.3.2. Con ácido nítrico asistido con microondas (Zagal & Sadzawka, 2007) (Martínez et al., 2022)

1.3.2.1. Principio y alcance

- i. La muestra seca y molida, de suelo, se digiere con ácido nítrico usando una unidad de microondas. En el digerido se pueden determinar las concentraciones de: As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Se y Zn.
- ii. Este procedimiento es aplicable a todos los tipos de suelos.

1.3.2.2. Equipos y materiales

- i. Sistema de digestión de microondas con las siguientes características:
 - potencia de 574 W programable en ± 10 W,
 - monitoreo y control de la presión o la temperatura,
 - cámara bien ventilada y resistente a la corrosión,
 - componentes eléctricos y electrónicos protegidos contra la corrosión,
 - vasos de digestión recubiertos de Teflón PFA, de 120 mL de capacidad y capaces de resistir presiones de hasta $15,3 \pm 1,7$ atm (225 ± 25 psi) y controlar la liberación de presión en caso de que excedan los 17,0 atm (250 psi),
 - plato giratorio de velocidad mínima de 3 rpm.
- ii. Discos filtro de tamaño de poro $< 25 \mu\text{m}$

1.3.2.3. Reactivos

- i. Deben usarse solamente reactivos de grado analítico o grado para metales traza.
- ii. Todas las referencias a “agua” se refieren a agua reactivo que debe cumplir los requisitos dados por ASTM D1193 (1999) Tipo I o ISO 3696 (1987) Grado 1 (CE máxima $0,06 - 0,1 \mu\text{S/cm}$ ($0,006 - 0,01 \text{ mS/m}$)).
- iii. Ácido nítrico, HNO_3 , 100%, densidad 1,52 kg/L.
- iv. Ácido nítrico, HNO_3 , 1+1: Diluir ácido nítrico 100% con igual volumen de agua.
- v. Solución para fortificar: a un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - alrededor de 50 mL de agua,
 - 1 mL de ácido nítrico (1.3.2.3 iii)
 - 0,5 mL de solución estándar de 10 mg/L de Cd (Método 1.5),
 - 0,5 mL de solución estándar de 1000 mg/L de Zn (Método 1.6).

Esta solución para fortificar contiene:

- 50 $\mu\text{g/L}$ de Cd,
- 5 mg/L de Zn.



1.3.2.4. Procedimiento

- i. Calibrar el digestor de microondas, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el método de calibración de 3 puntos o de múltiples puntos, dependiendo de si la unidad tiene o no una relación lineal exacta y precisa entre la potencia indicada y la potencia absorbida (EPA, 1994; TMECC, 2002).
- ii. Limpiar los vasos de digestión calentándolos con ácido nítrico 1:1 (1.3.2.3 iv) a una temperatura superior a 80°C, pero sin hervir, por un mínimo de 2 h, lavar con agua y secar en un ambiente limpio.
- iii. Lavar todo el material de plástico que tenga contacto con las muestras con ácidos diluidos (alrededor del 10%) apropiados para los plásticos específicos, enjuagar con agua y secar en un ambiente limpio.

Nota 1: Es recomendable mantener separados los materiales usados para concentraciones bajas de metales de aquellos usados para concentraciones altas.

- iv. Colocar alrededor de 0,2 g (exactitud 0,001 g) de muestra seca 40°C±2°C y < 0,5 mm de suelo (1.2.3 vi) en un vaso de digestión. Incluir 1 blanco, 1 muestra de referencia fortificada con 2 mL de solución para fortificar (3.3), 1 de las muestras de la tanda fortificada con 2 mL de solución para fortificar (1.3.2.3 v) y 1 duplicado de esta muestra fortificada con 2 mL de solución para fortificar (1.3.2.3 v).
- v. Agregar 10 mL (exactitud 0,1 mL) de HNO₃ (1.3.2.3 iii) bajo campana y esperar hasta que cese la reacción.
- vi. Tapar el vaso y conectar el vaso de rebalse según las instrucciones del fabricante.
- vii. Pesar los vasos de digestión con exactitud 0,001 g.
- viii. Colocar en el plato giratorio del microondas.

Nota 2: Debe completarse la capacidad del microondas. Si el número de vasos es inferior al recomendado, completar con vasos con 10 mL de HNO₃ (3.1) que además sirven de blancos analíticos.

- ix. Irradiar con la potencia suficiente para que la temperatura de cada muestra suba a 175°C en menos de 5,5 min y permanezca entre 170 y 180°C durante 4,5 min.
- x. Dejar enfriar por un mínimo de 5 min y sacar los vasos del equipo.
- xi. Cuando los vasos alcancen la temperatura ambiente (aprox. 23°C) pesar con una exactitud de 0,001 g. Si la masa ha disminuido más de un 10%, lo que indica pérdida de material, corregir el problema y repetir desde el punto 1.3.2.4 iv.
- xii. Cuidadosamente destapar los vasos bajo campana, transferir a un matraz aforado de polietileno de 50 mL, lavado con ácido, y enrasar con agua.

Nota 3: Si el digerido contiene material en suspensión proceder según una de las siguientes alternativas:

- Centrifugar a 2000-3000 rpm por 10 min, o
- Dejar decantar durante la noche, o
- Filtrar usando un filtro fino y un aparato de filtración prelavado con HNO₃.



Nota 4: En el digerido se pueden determinar las concentraciones de Cd (Método 1.5) y Zn (Método 1.6).

1.4. Metodología de medición de P en suelo

En función del pH del suelo se debe seleccionar el método apropiado para medición de fósforo.

Para suelos con pHs mayores a 6,8 se utiliza el método “Procedimiento de operación estándar para fósforo disponible, Método Olsen, y para pHs menores a 6,8 se utiliza el Bray II. En el Cuadro 1 se muestran los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes y pHs encontrados en algunos análisis de suelo (Landon, 1984).

Cuadro 1. Los rangos y la clasificación de los niveles de nutrientes encontrados en algunos análisis de suelo

	Unidades	Alto	Medio	Bajo
Ca:Mg		> 5:1	4:1	< 3:1
K:Mg			2:1	
Sat Al	%	> 85	30-85	< 30
CIC	meq/100g	25-40	15-25	5-15
Ca	meq/100g	> 10		< 4
Mg	meq/100g	> 4		< 0,5
K	meq/100g	> 0,6		< 0,2
Na	meq/100g	> 1		
pH		7,0 - 8,5	5,5 - 7,0	< 5,5
S	ug/g		6,0 - 12	
B	ug/g		1,5 - 3,0	
P Bray II	ug/g	> 50	15 - 30	< 15
P Olsen	ug/g	> 15	5 - 15	< 5
C Orgánico	%	> 10	4 - 10	< 4
N	%	> 0,5	0,2 - 0,5	< 0,2

1.4.1. Método Olsen (McKean, 1993)

1.4.1.1. Principio

Esta extracción usa una solución de bicarbonato de sodio a un pH de 8,50. En los suelos calcáreos o alcalinos los iones de bicarbonato causan la precipitación del calcio como CaCO_3 , y por lo tanto la actividad de calcio en la solución disminuye. Esto facilita la extracción de los fosfatos de calcio más solubles. En los suelos más ácidos los iones de bicarbonato, reemplazan a los fosfatos de aluminio y hierro. El incremento del pH de la solución facilita la extracción de fosfato de las superficies que tienen una carga dependiente del pH.

El método de la extracción con bicarbonato de sodio fue desarrollado por Olsen et al. (1954). Es un método que sirve para extraer fósforo de todos los tipos de suelo, tanto en suelos ácidos como alcalinos (Thomas et al., 1973).

1.4.1.2. Reactivos

- i. Solución de Superfloc o 'polyacrylamide gel' 0,05% p/v: Disuelva 0,5 g de Superfloc en 1 L de agua. Agite la solución por una hora para disolverla.
- ii. Hidróxido de sodio 1 M (NaOH): Disuelva 40 g NaOH en 1 L de agua.
- iii. Bicarbonato de sodio 0,5 M (NaHCO_3) pH 8,50: Disuelva 42 g de NaHCO_3 en agua, agregue 5 mL de la solución de Superfloc y mezcle bien. Diluya a un volumen de 1 L con agua y con NaOH 1 M ajuste el pH a 8,50. Se necesita 30 mL de esta solución por cada muestra y 100 mL por cada estándar.
- iv. Carbón activado lavado.
- v. Ácido sulfúrico 2,5 M (H_2SO_4): Añada 140 mL de H_2SO_4 , concentrado a 600 mL de agua. Deje enfriar y lleve a un volumen de 1 L. Se necesita 1 mL por cada muestra y estándar.
- vi. Solución de trabajo para el desarrollo de color
 - a. Reactivos
 - Molibdato de amonio ($[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
 - Tartrato de antimonio y potasio hemihidrato ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$).
 - Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
 - Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
 - b. Solución A
 - Disuelva 60 g de molibdato de amonio en 200 mL de agua.
 - Añada 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio y disuelva
 - Agregue lentamente y con agitación suave, 700 mL de ácido sulfúrico concentrado.
 - Deje enfriar y diluya con agua a un volumen de 1 L.
 - c. Solución B
 - Disuelva 132 g de ácido ascórbico en agua y complete a un volumen de 1 L.
 - d. IMPORTANTE: Guarde ambas soluciones en la heladera. Se prepara la solución de trabajo a partir de estas dos soluciones diariamente.
 - e. Tome 35 mL de solución A y agregue 800 mL de agua. Mezcle y añada 10 mL de solución B. Complete el volumen a 1 L con agua. Se necesitan 10 mL de esta solución por cada muestra y estándar.
- vii. Solución patrón de fósforo
 - a. Reactivo: Fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4).
 - b. Solución patrón de 50 ugP/mL
 - Seque unos gramos de KH_2PO_4 , en el horno por una hora a 105 °C

- Pese 0,2195 g de KH_2PO_4 . y disuelva en agua.
 - Complete a un volumen de 1 L con agua. A partir de esta solución se preparan los patrones de trabajo diariamente
 - c. Guarde la solución en la heladera.
- viii. Soluciones patrones.
- a. Solución patrón de 5 ugP/mL. Tome 10 mL de la solución patrón de 50 ug/mL y diluya a 100 mL con NaHCO_3 0,5 M (pH 8,5).
 - b. A partir de esta solución de 5 ug/mL, prepare los patrones de trabajo. Tome alicuotas de 0 - 1 - 2 - 3 - 4 - 6 - 8 y 10 mL y diluya a 100 mL con NaHCO_3 0,5 M (pH 8,5). Estos patrones contienen 0 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,3 - 0,4 y 0,5 ug P/ mL.

1.4.1.3. Procedimiento

- i. En un tubo con tapa (50 mL), coloque 2,5 g de suelo y agregue 30 mL de 0,5 M NaHCO_3 (pH 8,50).
- ii. Agite por 30 min.
- iii. Filtre las muestras en tubos de ensayo. Pare la filtración después de 5 min. A veces es necesario usar carbón para quitar el color que aparece debido a la materia orgánica en el suelo. En estos casos coloque 0,5 g de carbón activado en cada papel filtro antes de la filtración. También es necesario hacer lo mismo con los patrones de trabajo.
- iv. Tome 5 mL de la solución filtrada o del patrón con una pipeta automática y añada 1 mL de H_2SO_4 (2,5 M). Agite bien para quitar las burbujas.
- v. Agregue 10 mL de la solución de trabajo para el desarrollo de color con una repipeta y espere 15 min.
- vi. Calibre el espectrofotómetro con los patrones a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
- vii. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en ug P/g de suelo.

1.4.2. Método Bray II (McKean, 1993)

1.4.2.1. Principio

La solución de Bray II (HCl 0,1 M y NH_4F 0,03 M) disuelve algunos fosfatos fácilmente solubles en ácido como los fosfatos de calcio y una parte de los fosfatos de hierro y aluminio. En la solución ácida, el NH_4F disuelve los fosfatos de hierro y aluminio por medio de la formación de complejos con el ion fluoruro.

El método de la extracción del fósforo por fluoruro - ácido diluidos fue desarrollado por Bray y Kurtz (1945). Es extensamente usado en suelos ácidos con bajos niveles de nutrientes. En los suelos calcáreos, el efecto del ácido es disminuido debido a su neutralización por el CaCO_3 , en el suelo. Por esta razón el método no es el indicado para suelos con un pH > 6,8.



1.4.2.2. Reactivos

- i. Solución de Bray II.

Ácido clorhídrico (HCl 0,1 M) y fluoruro de amonio (NH_4F 0,03 M): Disuelva 1,11 g de NH_4F en 16,64 mL de HCl 6 M y complete el volumen a 1 L con agua. Se necesita 20 mL de esta solución por cada muestra.

- ii. Solución de trabajo para desarrollo de color: la preparación de las soluciones patrones (A y B) está descrito en el punto 1.4.1.2 vi. La solución de trabajo tiene que ser preparada diariamente.

Tome 25 mL de la solución A y agregue 800 mL de agua. Mezcle y añada 10 mL de la solución B. Complete el volumen a 1 L con agua. Se necesita 18 mL de esta solución por cada muestra y patrón

- iii. Soluciones patrones de trabajo.

La preparación de la solución estándar de fósforo (50 $\mu\text{g/mL}$) es descrita en el punto 1.4.1.2 vii. A partir de esta solución se prepara los patrones de trabajo.

Tome alícuotas de 0 - 1 - 2 - 4 - 8 - 12 y 16 mL y diluya a 100 mL con la solución de Bray II. Estos patrones contienen 0 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 y 8 $\mu\text{g P/mL}$.

1.4.2.3. Procedimiento

- i. Pese 2,85 g de suelo en un vaso de 50 mL.
- ii. Agregue 20 mL de la solución de Bray II.
- iii. Agite durante 40 seg.
- iv. Filtre la suspensión inmediatamente a través de papel filtro.
- v. Usando el dilutor (2/18), tome 2 mL del extracto o de patrón y añada 18 mL de la solución de trabajo para desarrollo de color. Mezcle bien y espere 15 min para el desarrollo del color.
- vi. Calibre el espectrofotómetro con los patrones a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
- vii. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en la muestra en $\mu\text{g P/g}$ de suelo.

1.5. Metodología de medición de Cd en suelo (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.5.1. EAA electrotérmica

1.5.1.1. Principio y alcance

- i. En el digerido proveniente del Método 1.3.1 o del Método 1.3.2 se determina la concentración de cadmio por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica (con horno de grafito).
- ii. Este método es aplicable en la determinación de cadmio en suelos.
- iii. Este método tiene un límite de detección instrumental de 0,1 $\mu\text{g/L}$ o menor y un rango óptimo de concentración de 0,5 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$ de Cd.



1.5.1.2. Interferencias

- i. Las principales interferencias se producen por absorción molecular y por la matriz.
- ii. Interferencia química o de matriz. Aunque el problema de la formación de óxidos está fuertemente reducido debido a que la atomización ocurre en una atmósfera inerte, esta técnica aún está sujeta a interferencia química, especialmente dependiendo de la composición de la matriz. Para detectar interferencias químicas o de matriz se puede usar la prueba de la dilución. Las muestras que indican interferencias pueden tratarse de una o varias de las siguientes maneras:
 - a. Diluir sucesivamente y reanalizar las muestras para eliminar la formación de óxidos o compuestos.
 - b. Modificar la matriz de la muestra ya sea eliminando los contaminantes y/o estabilizando el elemento. Por ejemplo, mediante, adición de nitrato de amonio para eliminar los cloruros alcalinos, adición de fosfato de amonio para reaccionar con el cadmio o mezclar hidrógeno con el gas inerte de purga como agente reductor y ayudante en la disociación molecular.
 - c. Analizar las muestras por el método de las adiciones de estándares, considerando las precauciones y limitaciones de su uso.
- iii. El análisis de cadmio por horno de grafito puede sufrir una severa absorción no específica y dispersión de la luz. Se requiere corrección de fondo.
- iv. Exceso de cloruro puede causar una volatilización prematura de cadmio, por lo que se debe usar un modificador de la matriz.

1.5.1.3. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito con lámpara de cadmio.

1.5.1.4. Reactivos

- i. Durante el análisis, usar solamente reactivos para análisis de trazas y agua reactivo Tipo I de ASTM D1193 (1999) o Grado 1 de ISO 3696 (1987) (CE máxima 0,06 – 0,1 $\mu\text{S/cm}$ (0,006 – 0,01 mS/m)).
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 100%, $d=1,52 \text{ kg/L}$.
- iii. Solución de nitrato de paladio, 4 g/L de Pd: Disolver 8,89 g de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 1 L.
- iv. Solución de ácido cítrico, 4%. Disolver 40 g de ácido cítrico en agua y diluir a 1 L.
- v. Solución modificadora de la matriz. Mezclar volúmenes iguales de las soluciones de nitrato de paladio y de ácido cítrico.
- vi. Solución estándar de cadmio de 1000 mg/L de Cd: Disponible en el comercio.
- vii. Solución estándar de cadmio de 10 mg/L de Cd. A un matraz aforado de 1000 mL agregar:
 - a. 10 mL de la solución de 1000 mg/L de Cd

- 
- b. 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - viii. Solución estándar de cadmio de 50 µg/L de Cd: A un matraz aforado de 200 mL agregar:
 - a. 1 mL de la solución de 10 mg/L de Cd,
 - b. 20 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - ix. Serie de soluciones estándares de cadmio. A seis matraces aforados de 100 mL agregar:
 - a. 0-1-2-5-10 y 20 mL de la solución de 50 µg/L de Cd,
 - b. 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - c. agua hasta enrasar.
 - d. Esta serie de estándares contiene: 0,0-0,5-1,0-2,5-5,0 y 10,0 µg/L de Cd.

1.5.1.5. Procedimiento

- i. Montar, alinear el horno de grafito y seleccionar las condiciones de operación según las instrucciones del fabricante del espectrofotómetro. Usar corrección de fondo.
- ii. Calibrar el instrumento inyectando un volumen adecuado de cada una de las soluciones de la serie de estándares de Cd (1.5.1.4 ix) con un volumen igual de solución modificadora de la matriz (1.5.1.4 v). Leer a 228,8 nm cada solución estándar en triplicado para verificar la precisión del método.
- iii. Inyectar una alícuota, de volumen igual al usado con la serie de estándares, de los digeridos provenientes del Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii. Estos digeridos incluyen los de las muestras, del blanco, de la muestra de referencia fortificada, de una de las muestras fortificadas y del duplicado de esta muestra fortificada. Inyectar el mismo volumen de solución modificadora de la matriz (1.5.1.4 v).
- iv. Aplicar el programa seleccionado y repetir hasta obtener resultados reproducibles.

Nota 1: Si la concentración de la muestra es mayor que la de la solución estándar más alta, diluir manteniendo una concentración de ácido nítrico de 10% y reanalizar.
- v. Limpiar el tubo a intervalos regulares durante una serie de determinaciones cuando el blanco detecta efectos de memoria (contaminación cruzada), debido a que el elemento no se ha volatilizado totalmente durante la atomización.

1.5.1.6. Cálculos

- i. Examinar los valores obtenidos de concentración de Cd en los digeridos.

Nota 2: Si la concentración de Cd en el blanco es menor que el límite de detección del método o menor que el 10% de la concentración de la muestra más baja en Cd, entonces el blanco del método se puede considerar aceptable. Si no es así, volverlo a leer y si aún es inaceptable, todas las muestras analizadas después del último blanco del método aceptable deben repararse y reanalizarse.

Nota 3: La concentración de Cd en la muestra de referencia fortificada debe ser igual al valor de referencia más un valor entre 1,6 µg/L y 2,4 µg/L de Cd. Si esto no se cumple, volverla a leer. Si aún es inaceptable, todas las muestras después de la última muestra de referencia aceptable deben prepararse y reanalizarse

Nota 4: La recuperación de Cd en la muestra fortificada debe estar entre 80% y 120% (1,6 µg/L y 2,4 µg/L) y la diferencia relativa con el duplicado de la muestra fortificada debe ser menor del 20%. Si no es así, debe realizarse una de las pruebas de interferencia.

- ii. Calcular la concentración, expresada en mg/kg, de Cd total en base a muestra seca a 105°C±5°C, según:

$$\text{Cd (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times v \times d}{m \times 1000} \times Fh$$

donde:

a = concentración, en µg/L, de Cd en la muestra

b = concentración, en µg/L, de Cd en el blanco

v = volumen, en mL, de digerido (método 1.3.1.4, punto x o método 13.2.4, punto xii)

d = factor de dilución, si corresponde

m = masa, en g, de muestra

Fh = factor de corrección por humedad

1.5.1.7. Informes

- i. Informar el resultado obtenido en 6,2, en mg/kg con dos decimales, como:

Cadmio total = mg/kg de Cd, en base a muestra seca a 105°C±5°C

1.6. Metodología de medición de Zn en suelo (Zagal & Sadzawka, 2007)

1.6.1. EAA de llama aire – acetileno por aspiración directa

1.6.1.1. Principio y alcance

- i. En el digerido proveniente del Método 1.3.1 o del Método 1.3.2 se determina la concentración de cinc por espectrofotometría de absorción atómica de llama aire – acetileno por aspiración directa.
- ii. Este método es aplicable en la determinación de cinc en lodos generados de plantas de tratamiento de aguas servidas y en suelos.
- iii. Este método tiene un límite de determinación instrumental de 0,02 mg/L o menor y un rango óptimo de concentración de 0,05 mg/L a 2 mg/L de Zn.

1.6.1.2. Interferencias

- i. Absorción no específica que requiere corrección de fondo.
- ii. Altas concentraciones de silicio, cobre o fosfato pueden interferir. La adición de 1500 mg/L de estroncio elimina las interferencias de cobre y fosfato.

1.6.1.3. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con los siguientes parámetros generales:
 - Lámpara de cinc,
 - Longitud de onda: 213,9 nm,
 - Combustible: acetileno,
 - Oxidante: aire,
 - Corrección de fondo: se requiere.

1.6.1.4. Reactivos

- i. Durante el análisis, usar solamente reactivos para análisis de trazas y agua reactivo Tipo I de ASTM D1193 (1999) o Grado 1 de ISO 3696 (1987) (CE máxima 0,06 – 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (0,006 – 0,01 mS/m)).
- ii. Ácido nítrico, HNO_3 , 100%, $d=1,52 \text{ kg}/\text{L}$.
- iii. Solución estándar de cinc de 1000 mg/L de Zn: Disponible en el comercio.
- iv. Solución estándar de cinc de 10 mg/L de Zn: A un matraz aforado de 100 mL agregar:
 - 1 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Zn,
 - 10 mL de ácido nítrico 100% (4.1),
 - agua hasta enrasar.
- v. Serie de estándares de cinc: a seis matraces aforados de 100 mL agregar:
 - 0-1-2-5-10 y 20 mL de la solución estándar de 10 mg/L de Zn,
 - 10 mL de ácido nítrico 100%,
 - agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene: 0,0-0,1-0,2-0,5-1,0 y 2,0 mg/L de Zn.

1.6.1.5. Procedimiento

- i. Seleccionar las condiciones de operación según las instrucciones del fabricante del espectrofotómetro. Usar corrección de fondo.
- ii. Calibrar a 213,9 nm con la serie de estándares de cinc (1.6.1.4 v).
- iii. Leer la concentración de cinc en los digeridos provenientes del Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii. Estos digeridos incluyen los de las muestras, del blanco, de la muestra de referencia fortificada, de una de las muestras fortificada y del duplicado de esta muestra fortificada.

Nota 1: Si la concentración en los digeridos es mayor que la de la solución estándar más alta, diluir manteniendo una concentración de ácido nítrico de 10% y reanalizar.



1.6.1.6. Cálculos

- i. Examinar los valores obtenidos de concentración de Zn en los digeridos.

Nota 2: Si la concentración de Zn en el blanco del método es menor que el límite de detección del método o menor que el 10% de la concentración de la muestra más baja en Zn, cualquiera sea mayor, entonces el blanco del método se puede considerar aceptable. Si no es así, volverlo a leer y si aún es inaceptable, todas las muestras después del último blanco del método aceptable deben prepararse y reanalizarse.

Nota 3: La concentración de Zn en la muestra de referencia fortificada debe ser igual al valor de referencia más un valor entre 0,16 mg/L y 0,24 mg/L de Zn. Si esto no se cumple, volverla a leer. Si aún es inaceptable, todas las muestras después de la última muestra de referencia aceptable deben prepararse y reanalizarse.

Nota 4: La recuperación de Zn en la muestra fortificada debe estar entre 80% y 120% (0,16 mg/L y 0,24 mg/L) y la diferencia relativa con el duplicado de la muestra fortificada debe ser menor del 20%. Si no es así, debe realizarse una de las pruebas de interferencia.

- ii. Calcular la concentración, expresada en mg/kg, de Zn total en base a muestra seca a 105°C±5°C, según:

$$\text{Zn (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times v \times d}{m} \times Fh$$

donde:

a = concentración, en mg/L, de Zn en la muestra

b = concentración, en mg/L, de Zn en el blanco

v = volumen, en mL, de digerido (Método 1.3.1.4, punto x, o del Método 1.3.2.4, punto xii)

d = factor de dilución, si corresponde

m = masa, en g, de muestra (método 1.3.1.4, punto i o método 1.3.2.4, punto iv)

Fh = factor de corrección por humedad

- iii. Determinación de humedad (Martínez et al., 2022)

Los resultados de Cd podrán ser expresados de acuerdo con el fin previsto, en mg de Cd por kg de material en peso seco o peso fresco. La expresión del resultado será de acuerdo al servicio requerido y llevado a cabo, o de acuerdo con la normativa de comparación. A continuación, se describen los pasos a seguir si se desean expresar los resultados corregidos por la humedad:

Suelo: Posterior al proceso de secado a una temperatura < 40°C, molido y tamizado a 2 mm, tomar una fracción entre 5 a 20 g de suelo y, con ayuda de una estufa, secar el material durante 48 h a 105°C y luego registrar el peso inicial y final del suelo. Finalmente, proceder con el cálculo de humedad y la corrección del resultado de Cd aplicando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

Ecuación 1:

$$\% \text{ Humedad del suelo a } 105^{\circ}\text{C (h)} = \left[\frac{\text{peso del suelo seco a } 40^{\circ}\text{C} - \text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}}{\text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}} \right] \times 100$$

Ecuación 2:

$$\text{mg Cd/kg de suelo en peso seco} = \text{mg Cd/kg} * \left[\frac{(100 + h)}{100} \right]$$

1.6.1.7. Informe

- i. Informar el resultado obtenido, en mg/kg sin decimales, como:

Cinc total = mg/kg de Zn, en base a muestra seca a 105°C±5°C

2. DETERMINACIONES DE P, Zn y Cd EN MATRIZ VEGETAL

2.1. Preparación de muestras vegetales: descontaminación, secado, molienda y almacenaje (Sadzawka & Grez, 2004) (Martínez et al., 2022)

2.1.1. Principio

- i. La preparación de la muestra de tejidos vegetales es crítica para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, deben seguirse procedimientos adecuados para su descontaminación, secado, molienda y almacenaje.
- ii. Los tejidos vegetales a analizar deben estar limpios y libres de sustancias extraña como partículas de polvo y residuos de aplicaciones foliares que puedan influir en los resultados analíticos. Generalmente, los elementos más afectados por las partículas de polvo son Al, Fe, Mn y Si. Los residuos de aplicaciones foliares de nutrientes y fungicidas pueden afectar varios elementos y deben considerarse en la evaluación de los resultados analíticos. La descontaminación debe realizarse mientras se preserva la integridad de la muestra. Por lo tanto, el lavado debe realizarse solamente en muestras frescas y turgentes.
- iii. El secado de la muestra detiene los procesos enzimáticos y estabiliza la muestra.
- iv. La molienda asegura la homogenización de la muestra y facilita la destrucción de la materia orgánica. La molienda puede realizarse de modo mecánico 100% o incorporar temperatura de congelamiento como en la molienda criogénica que se realiza con nitrógeno líquido.
- v. Una vez molida y homogenizada la muestra, debe almacenarse en condiciones que minimicen su deterioro.
- vi. Para el Cd, en caso de ser necesario, cada matriz deberá ser lavada con agua de grifo y luego con agua destilada con el fin de eliminar cualquier partícula de suelo o material extraño adherido en la superficie y remover fertilizantes foliares. Las muestras lavadas deben de ser secadas con papel absorbente y luego ser colocadas en bolsas de papel para secarlas a 70± 5°C durante 48 h en la estufa o hasta evidenciar que el material se encuentre crocante. Las hojas secas se trituran utilizando morteros de porcelana o equipos como molinos de cuchillas, licuadoras o trituradores de laboratorio. La muestra pulverizada se tamiza a un tamaño <0,85 mm para asegurar una digestión completa.



Las almendras de cacao pueden llegar secas y fermentadas o en mazorca. Cuando llegan en mazorca, las almendras se colocan en un recipiente para retirar el mucílago manualmente. Una alternativa es utilizando un colador de plástico para lavarlas con agua de grifo y retirar la mayor cantidad de mucílago, o realizarlo manualmente almendra por almendra. Las almendras extraídas se secan a $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 72 h en la estufa. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se debe decidir si se retira o no la cascarilla o testa. Este trabajo adicional agrega tiempo a la entrega de los resultados, pero mejora la precisión analítica. Hay que tener en cuenta que la mayor concentración de Cd se encuentra en las capas externas de la almendra (Förste et al., 2023). Es muy importante incluir en el reporte si los resultados representan la concentración de Cd en almendras con o sin cascarilla.

Extender el material sobre un papel Kraft en un lugar limpio y libre de contaminación, formado un círculo, posteriormente dividir en cuatro secciones, tomar dos secciones transversales. Si la cantidad de material sigue siendo grande, con los dos cuadrantes seleccionados anteriormente, se debe realizar nuevamente el proceso de cuarteo, hasta obtener la cantidad necesaria

2.1.2. Equipos y materiales especiales

- i. Bolsas de papel
- ii. Esponja o cepillo con cerdas de nylon
- iii. Estufa con aire forzado capaz de mantener una temperatura de $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- iv. Molino a cuchilla o molino criogénico.
- v. Tamices de tamaño de poro de 1,0 mm y 0,5 mm.
- vi. Refrigerador (no indispensable).

2.1.3. Reactivos

Durante el análisis, usar agua de clase 2 según la NCh426/2¹ ($\text{CE} < 0,5 \text{ mS/m}$ a 25°C).

- i. Solución de detergente: preparar una solución 0,1% a 0,3% a partir de un detergente no iónico (sin fosfato).

2.1.4. Procedimiento

Descontaminación

- i. Examinar las muestras frescas de tejidos vegetales y, si no se observan partículas extrañas, no es necesaria la descontaminación, excepto si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si.
- ii. Si se observan partículas de polvo, basta eliminarlas con un cepillo (2.1.2) para descontaminar la muestra, siempre que no sea de interés determinar los contenidos

¹ Norma Chilena Oficial: NCh 426/2 Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones

de Al, Fe, Mn o Si.

- iii. Si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si, las muestras deben lavarse con la solución de detergente (2.1.3) y enjuagarse con agua destilada o desionizada.
- iv. Después de la descontaminación, las muestras deben secarse inmediatamente para estabilizar el tejido y detener las reacciones enzimáticas.

Secado

- v. Introducir las muestras en bolsas de papel. Colocar las bolsas en una estufa con aire forzado (2.1.2) y secar a 70-80°C por 12 a 24 h.

Nota: Los tejidos con altos contenidos de carbohidratos pueden requerir otro tipo de procedimiento de secado.

Molienda

- vi. Una vez seca, moler la muestra en un molino mecánico hasta que pase a través de un tamiz de 1,0 mm si para el análisis se requiere una alícuota > 0,5 g o de un tamiz de 0,5 mm si se requiere una alícuota < 0,5 g.
- vii. La molienda de las muestras en molino criogénico requiere las siguientes fases:
 - Pre-enfriado: 5 min
 - Ciclos de molienda: 3 de 1 min por ciclo
 - Tiempo de reposo entre ciclos: 1 min
 - Ritmo: 10 impactos por seg
 - Una vez finalizado el proceso, se deja a T ambiente el tubo contenedor, se retira la muestra del mismo y se lo lleva a secar en estufa de vacío.
- viii. Después de la molienda, homogenizar la muestra y separar una porción de 5 a 10 g para los análisis y almacenaje.

Almacenaje

- ix. Colocar la porción de muestra representativa, molida y homogénea, en un recipiente hermético de plástico. Almacenar en un lugar oscuro, frío y seco.

Nota: Si los análisis no se realizan inmediatamente, almacenar en refrigerador (4°C). Las muestras molidas pueden almacenarse a temperatura ambiente, pero deben secarse a 65-70°C durante 2 h y luego enfriarse en desecador, antes de pesar para los análisis.

2.2. Calcinación en mufla a 500°C (Sadzawka & Grez, 2004)

2.2.1. Principio

- i. La muestra de tejido vegetal seca y molida se calcina a 500°C. Las cenizas se disuelven en HCl diluido y en la solución resultante se pueden determinar las concentraciones de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, **P y Zn**. Puede también utilizarse para Cd. (Barraza, 2020)

Nota: Este método no es adecuado para As, Hg, S y Se.



Los tejidos vegetales con altos contenidos de azúcares o aceites pueden requerir la adición de soluciones para facilitar la calcinación (H_2SO_4 10%, HNO_3 69% o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.2\text{H}_2\text{O}$ 7%).

Este método no es recomendado para tejidos vegetales altos en Si debido a la pobre recuperación de los micronutrientes, especialmente Zn y Fe.

2.2.2. Equipos y materiales especiales

- i. Crisoles o cápsulas de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad con tapa o vidrio de reloj.
- ii. Mufla.
- iii. Plancha calefactora.

2.2.3. Reactivos

- i. Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25 °C.
Nota: Usar agua de esta calidad en Reactivos (2.2.3) y Procedimiento (2.2.4).
- ii. Ácido clorhídrico, HCl.
- iii. HCl 37% d=1,19 kg/L
- iv. HCl 32% d=1,16 kg/L
- v. Ácido clorhídrico 2 mol/L: Diluir 166 mL de HCl 37% (o 197 mL de HCl 32%) con agua y llevar a 1 L.

2.2.4. Procedimiento

- i. Pesar 1 a 3 g (exactitud 0,01 g) de muestra de tejido vegetal seca y molida a 1 mm en un crisol de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
- ii. Colocar los crisoles en una mufla y lentamente subir la temperatura de manera de alcanzar los 500°C en dos h. Calcinar por 4-8 h a 500°C.
Nota: La temperatura no debe exceder de 500°C para evitar pérdidas potenciales de Al, B, Cu, Fe, K y Mn.
- iii. Dejar enfriar la mufla a temperatura ambiente, lentamente abrir la puerta, sacar los crisoles evitando disturbar las cenizas y taparlos con la tapa del crisol o con vidrio de reloj.
- iv. Entreabriendo la tapa, agregar cuidadosamente 1-2 mL de agua para humedecer las cenizas.
- v. Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 2 mol/L (2.2.3) y hervir en una plancha calefactora. Enfriar.
- vi. Filtrar el contenido del crisol a través de papel filtro de tamaño de poro $\leq 3 \mu\text{m}$, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 mL o 100 mL. Lavar y enrasar con agua.
- vii. En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de P (Método 2.3) y Zn (Método 2.4).



Nota: En el filtrado también se pueden medir Cu, Fe, Mn, Ca, Mg, K, Na, B y Al utilizando técnicas que no son parte de esta NT.

2.3. Metodología de medición de P por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato (Sadzawka & Grez, 2004)

2.3.1. Principio

- i. En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.2, se determina la concentración de P por colorimetría del complejo fosfo-vanadomolibdato.

2.3.2. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro visible con celdas de una longitud de paso de luz de 10 mm.

2.3.3. Reactivos

- i. Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25 °C y un pH mayor de 5,6.
- ii. Ácido clorhídrico, HCl.
 - a. HCl 37% d=1,19 kg/L
 - b. HCl 32% d=1,16 kg/L
- iii. Ácido clorhídrico 2 mol/L: Diluir 166 mL de HCl 37% (o 197 ml de HCl 32%) con agua y llevar a 1 L.
- iv. Ácido nítrico.
 - a. HNO₃ 69% d=1,41 kg/L
 - b. HNO₃ 100% d=1,52 kg/L.
- v. Solución de nitro-vanadomolibdato.
 - A Solución de vanadato de amonio, 0,9 g/L: Disolver 0,9 g de NH₄VO₃ en alrededor de 500 mL de agua hirviendo, enfriar y agregar 24 mL de HNO₃ 69% o 16 mL de HNO₃ 100%. Diluir con agua a 1 L.
 - B Solución de molibdato de amonio, 19 g/L: Disolver 19 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en agua a 50°C, enfriar y diluir a 1 L con agua.
 - C Ácido nítrico 1,5 mol/L: Diluir 97 ml de HNO₃ 69% o 62 ml de HNO₃ 100% con agua a 1 L.Mezclar las soluciones A, B y C en partes iguales,
- vi. Solución estándar de fósforo, 1000 mg/L de P.
 - a. Disponible en el comercio.
 - b. Preparado: Pesar 4,390 ± 0,001 g de fosfato dihidrógeno de potasio, KH₂PO₄, secado a 105 °C ± 1 °C durante 2 h, en un matraz aforado de 1000 mL. Disolver y enrasar con agua.
- vii. Serie de soluciones estándares de fósforo. A siete matraces aforados de 250 mL agregar:

- a. 05-10-15-20-25-50 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de P,
- b. 50 mL de HCl 2 mol/L,
- c. agua hasta enrasar.
- d. Esta serie de estándares contiene 0-20-40-60-80-100-200 mg/L de P

2.3.4. Procedimiento

- i. Tomar una alícuota de 1 mL de los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes de la calcinación (2.2.4 vii), y de la serie de estándares de P (2.3.3 vii d) en recipientes de vidrio.
- ii. Agregar 4 mL de la solución de nitro-vanado-molibdato (2.3.3 v) y mezclar.
- iii. Dejar reposar una hora.
- iv. Leer la absorbancia contra agua a 466 nm.
Nota: Puede usarse una longitud de onda entre 400 y 490 nm.

2.3.5. Cálculos

- i. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de P de la serie de estándares y calcular la ecuación de regresión.
Nota: El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las determinaciones
- ii. Calcular las concentraciones de P en los filtrados de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- iii. Calcular la concentración de P en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$P (\%) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 10.000}$$

$$P (g/kg) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 1000}$$

donde:

- a = mg/L de P en el filtrado de la muestra
- b = mg/L promedio de P en los filtrados de los blancos
- V = volumen final en mL (Método 2.2, punto 2.2.4 vi)
- m = masa en g de muestra (Método 2.2, punto 2.2.4 i)

2.3.6. Informes

Informar la concentración de P, en la muestra de tejido vegetal, en % con dos decimales o en g/kg con un decimal

2.4. Metodología de medición de Zn y Cd por espectrofotometría de absorción atómica (Sadzawka & Grez, 2004)

2.4.1. Principio

- i. En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.2, se determina la

concentración de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd por espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire-acetileno.

2.4.2. Equipos y materiales especiales

- i. Espectrofotómetro de absorción atómica con lámparas de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd.

2.4.3. Reactivos

- i. Ácido clorhídrico, HCl.
 - a. 3.1.1 HCl 37% d=1,19 kg/L
 - b. 3.1.2 HCl 32% d=1,16 kg/L
- ii. Solución estándar de cinc, 1000 mg/L de Zn: Disponible en el comercio.
- iii. Solución estándar de Zn diluida: a un matraz aforado de 200 mL agregar 5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Zn, agregar agua hasta enrasar. Esta solución contiene 25 mg/L de Zn.
- iv. Serie de estándares: a siete matraces aforados de 250 mL agregar:
→ 0-1-2-5-10-20-30 mL de la solución de estándar diluida (2.4.3 iii),
→ 8 mL de HCl 37% o 10 mL de HCl 32%,
→ agua hasta enrasar.
Esta serie de estándares contiene 0,0 - 0,1 - 0,2 - 0,5- 1,0 - 2,0 y 3,0 mg/L de Zn
Nota: Si por las características del EAA (2.4.2 i) es necesario utilizar otros rangos de concentración para que las lecturas se sitúen en el rango de linealidad, proceder a efectuar las diluciones que sean necesarias, siguiendo como referencia la técnica descrita.
- v. Estándares en matriz vegetal para Zn y Cd: se pueden utilizar los siguientes estándares comerciales
 - BCR CABBAGE 679: Elementos: Sb, As, Ba, B, Cd, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Sr, Tl, Zn.
 - Trace Elements in Spinach Leaves 1570a: Ca, P, K, Na, Al, As, B, Cd, Co, Cu, Mn.

2.4.4. Procedimiento

- i. En los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.2, punto 2.2.4 vi, y usando un espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire-acetileno y calibrado con la serie de estándares (2.4.3 iv), leer las concentraciones de Zn a 213,8 nm y de Cd a 228,8 nm.

2.4.5. Cálculos

- i. Calcular las concentraciones de Zn/Cd en la muestra, en mg/kg, según:

$$\text{Cd, Zn (mg/kg)} = ((a-b) \times V)/m$$

donde:

a = mg/L de Zn o Cd el filtrado de la muestra

b = mg/L promedio de Zn o Cd en los filtrados de los blancos

V = volumen final en mL (Método 2.2, punto 2.2.4 vi)

m = masa en g de muestra (Método 2.2, punto 2.2.4 i)

2.4.6. Informes

Informar las concentraciones de Zn o Cd en la muestra, en mg/kg.

3. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Se adjunta en ANEXO, la metodología estandarizada de US EPA 3050B, 3051 y 3052 para P, Zn y Cd en suelo y en matriz vegetal, como también metodologías aplicadas en cacao en grano y en polvo. Además, se referencia mediante link a “Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material de cacao (*Theobroma cacao* L.). Mariela Martínez A., Daniel Bravo, Yeni Rodríguez-Giraldo, Laura Ramírez, Elías García, Martha Hidalgo y Eduardo Chávez (2023) FONTAGRO. https://www.fontagro.org/new/uploads/productos/17235 - Producto_4.pdf

DISCUSIÓN

Las técnicas utilizadas para la cuantificación analítica son: Espectrometría de Absorción Atómica (AAS, por sus siglas en inglés), AAS con horno de grafito (GFAAS), Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Masas por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y, muy recientemente, Fluorescencia de Rayos X (XRF) (Förste et al., 2023).

AAS e ICP-OES han sido empleados para la medición de macro y micronutrientes, mientras que GF-AAS e ICP-MS se utilizan para la detección de metales pesados y elementos trazas. Sin embargo, dado que la problemática de Cd en almendras de cacao se presenta en concentraciones superiores a los 0,10 mg/kg, el ICP-OES puede ser empleado de forma precisa para la detección de valores superiores al mencionado anteriormente (Martínez et al., 2022). La pureza de los reactivos es fundamental; el agua ultrapura debe tener una conductividad no mayor a los 0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para evitar interferencias.

Con respecto a la solución de Cd para calibración, es necesario utilizar un estándar de Cd con concentración conocida, suministrado por proveedores acreditados en ISO/IEC 17034, lo que permitirá el uso de un material de referencia trazable metrológicamente a nivel internacional (Martínez et al., 2022). Barraza (2020) compara distintos estándares, marcando que son muy importantes tanto los estándares de medición del proceso de digestión (mineralización) como de análisis.

Con respecto al secado, puede realizarse por varios métodos o una combinación de ellos, como estufa de secado o campana de flujo laminar. El material debe conservarse sellada y protegido de la luz y luego refrigerarse o congelarse hasta su análisis.

Para el cadmio, Martínez et al (2022) indican que si el laboratorio cuenta con equipamiento de alta sensibilidad como ICP-MS, la cantidad de muestra puede ser de 100 mg (Argüello et al., 2019) o 300 mg (Rodríguez-Giraldo et al., 2022). Mientras que, si el laboratorio posee equipos menos sensibles como ICP-OES o AAS, se debe de incluir una mayor masa inicial, entre 350 y 500 mg para material vegetal y hasta 2 g para suelo (Chávez et al., 2015). El método más



común de digestión es el $\text{HNO}_3\text{:HCl}$ (3:1, v:v), también conocido como agua regia (Lo Dico et al., 2018). En otros casos, también se utiliza H_2O_2 en alguna de las etapas de la mineralización, sobre todo cuando se trabaja con almendras para solubilizar las grasas (Barraza et al., 2017). Algunos investigadores han utilizado solamente HNO_3 para mineralizar hojas, ya que es una matriz muy simple de digerir (Argüello et al., 2020).

En muestras de suelo, es común que los laboratorios realicen métodos de extracciones simples, que son menos laboriosos y peligrosos, y que pueden ser implementados a un mayor número de muestras por día (Chavez et al., 2015). Algunos de los más comunes son 0,01 M CaCl_2 , 1 M DTPA y Mehlich III. Sin embargo, existe discrepancia entre investigadores acerca del cual es el método mas apropiado para cacao (ver: Ramtahal et al., 2015; Chavez et al., 2016; Gramlich et al., 2018).

En general, el rango puede ir desde 1:20 a 1:60 (m:v) para ICP-OES y ICP-MS, respectivamente. Adicionalmente, la temperatura de digestión afectará el tiempo para evaporar el ácido adicionado a las muestras. En este sentido, usando temperaturas entre 80 – 100 °C se necesitarán entre 6 y 8 h para mineralizar las muestras, mientras que a temperaturas >120 °C requerirán menos tiempo para evaporar los ácidos, lo que se considera un indicador de la digestión de las muestras. Esto ocurrirá solo si las muestras son mineralizadas en un digestor abierto o en una plancha de calentamiento.

Es recomendable realizar la evaporación de los ácidos después de la digestión en microondas, destapar los tubos de teflón y el contenido trasvasarlo a los tubos de borosilicato, lavar el primer tubo con agua tipo 1 y trasvasarlo al segundo tubo. Luego, hacer la digestión en bloque abierto o en una placa de calentamiento hasta evaporación (volumen 1 mL), y así evitar acarrear un alto porcentaje de ácido a la cámara de nebulización del ICP-OES o ICP-MS. En algunas ocasiones, los investigadores proponen usar rampas de temperatura para la digestión de suelo; esto es muy común en las configuraciones de los digestores de microondas. Sin embargo, el uso de rampas no es obligatorio y se debe de considerar solo si no existiera una digestión correcta de las muestras.

Rodríguez Giraldo et al. (2022) validan metodologías aplicando ICP-MS y ICP-OES, encontrando que los límites de cuantificación de Cd mediante ICP-MS e ICP-OES fueron 0,005 mg/kg y 0,043 mg/kg-, respectivamente. Los porcentajes de recuperación de Cd con material de referencia certificado (chocolate para hornear NIST® SRM® 2384) para ICP-MS e ICP-OES fueron del 95% y 92%, respectivamente. Las incertidumbres estándar combinadas obtenidas para determinar el Cd utilizando ICP-MS e ICP-OES no superaron el 8%. Estos investigadores realizaron controles internos y externos con laboratorios de referencia y pudieron cuantificar Cd con valores inferiores y superiores a la cantidad mínima permitida por la regulación europea para productos derivados del cacao (0,1 mg/kg de Cd).

La digestión de material vegetal (raíz, tallos, hojas, mazorca, hojarasca, almendras o cascarilla) es mucho más homogénea que la digestión de los suelos. Las condiciones de digestión varían entre laboratorios, pero se recomienda el uso de temperaturas > 90 °C por un tiempo mínimo de 4 h. Como agente oxidante se recomienda el uso de HNO_3 en un ratio de 10-25:1 (ácido:muestra, v:m). Además, se puede emplear un único ciclo de digestión y una sola rampa



de temperatura.

En cuanto a los controles analíticos y de calidad, es recomendable estandarizar la utilización de sistemas de controles analíticos y de calidad (QA/QC) que permitan asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados reportados. Los controles de calidad son aquellos pasos que se implementan en la etapa de procesamiento de la muestra, mientras que los controles analíticos están orientados a asegurar la cuantificación correcta del analito en la solución. Resumiendo, los controles analíticos son muestras que forman parte del proceso de pesaje, digestión y disolución (Martínez et al, 2022).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Estos resultados demuestran que el uso de un método universal para determinar la concentración de Zn y P está disponible, quizás por sus concentraciones relativamente altas o su inocuidad sanitaria. Sin embargo, para el Cd (al menos el fitodisponible) hasta la fecha no ocurre lo mismo, ya que no ha sido reportado un método universal, y tal vez no sea posible tener uno, ya que probablemente el Cd fitodisponible varíe entre tipos de suelo y/o en el tipo de matriz a analizar.

En cuanto al equipamiento las determinaciones de P y Zn no presentan diferencias al momento de elegir el equipo, mientras que para el Cd, las concentraciones son tan bajas que utilizar un ICP-MS proporciona gran sensibilidad, aunque no están tan disponibles en la región. En el caso del Cd hay que poner especial cuidado en el almacenamiento de la biomasa para evitar el desarrollo fúngico-microbiano en el momento de las determinaciones. La forma de expresión de los resultados también es diferente en el caso del cadmio, siendo necesario tener en cuenta la humedad. Por último, la determinación de los parámetros de QA/QC es crucial para una correcta evaluación de los resultados. Algunos aspectos a mencionar son la adecuada elección de los estándares de proceso y de análisis, la determinación del límite de detección, los interferentes, los controles externos e internos y el límite de cuantificación.

Las muestras de cacao son complejas y difíciles de analizar debido a su alto contenido de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, fitoesteres, tocoferoles, azúcares, polifenoles, teobromina y cafeína (Mohamed et al., 2020). Es por ello que en la bibliografía se encuentran diversos métodos para la cuantificación del cadmio y otros elementos traza, sin embargo, en muchos casos se omite información sobre la validación de dichos métodos, tales como los límites de detección, cuantificación, rendimiento del material de referencia, precisión y reproducibilidad. Es importante notar que, aunque la Unión Europea haya fijado un valor máximo para el contenido de Cd en el chocolate, aún no existe un protocolo a seguir para la determinación de este elemento.

En el caso de los certificados del material de referencia (SRM, standard reference material) como el NIST 2384 Baking chocolate, encontramos información sobre cuáles fueron las diferentes técnicas de espectrofotometría utilizadas para el análisis de cada elemento: ICP-OES para elementos como el Ca, Cu, Fe, Zn e ICP-MS para el Pb y Cd, así como el tipo de digestión, en este caso, en microondas con HNO₃. En Perú, existe una norma técnica del



Instituto Nacional de Calidad (INACAL) para la determinación de Cd, Cu, Fe y Zn en chocolate y cacao (NTP 208.030 2015), donde primero se calcina la muestra antes de adicionar los ácidos (HNO_3 y HCl), y finalmente se procede a la lectura por AAS o GF-AAS

En cuanto a las muestras, el rango de concentración del analito es sumamente importante porque la masa de la muestra y la dilución final de la solución mineralizada afectarán los límites de detección de la técnica utilizada (LD). La mayoría de los elementos son solubles o estables en HNO_3 . En el caso del HCl , que es el segundo ácido más utilizado en las digestiones debido a que es corrosivo y volátil, puede dañar el sistema eléctrico de equipos como el ICP-MS, por ello, se recomienda reducir la exposición y preferiblemente no preparar diluciones con este ácido. La correcta elección de reactivos también es una etapa clave. Por ejemplo, en algunos casos el uso de H_2SO_4 puede formar sulfatos con algunos elementos, lo que interfiere cuando se usa el ICP-MS o el GF-AAS. Del mismo modo, una digestión ineficiente o incompleta genera interferencias (efecto matriz).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argüello, D., Chávez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: a nationwide survey in Ecuador. *Sci. Total Environ.*, 649:120-127, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>.
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., ... & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950-963.
- Barraza, F. (2020). Guía para la determinación de cadmio (Cd) en muestras de cacao en granos y en polvo. https://issuu.com/zentraagenciacreativa/docs/libro_final_versi_n_issuu
- Bray, R. H. & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science* 59:39-45.
- Carrillo, I. F. (1985). Manual de laboratorio de suelos. CENICAFE.
- Chávez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B. & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci. Total Environ.*, 533:205-214, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06>.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Dico, G. M. L., Galvano, F., Dugo, G., D'ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., ... & Ferrantelli, V. (2018). Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245, 1163-1168.



- Förste F., Bauer, L., Streeck, C., Radtke, M., Reinholz, U., Kadow, D., Keil, C. & Mantouvalou, I. (2023). Quantitative analysis and 2D/3D elemental imaging of cocoa beans using X-ray fluorescence techniques. *Analytical Chemistry* 2023 95 (13), 5627-5634. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c05370
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulín, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370-378
- James, D. W., & Wells, K. L. (1990). Soil sample collection and handling: Technique based on source and degree of field variability. *Soil testing and plant analysis*, 3:25-44.
- Landon, J. R. (1984). *Booker tropical manual. A handbook for soil survey and agricultural land evaluation in the tropics and subtropics*. Booker Agricultural International Ltd. UK.
- Martínez, M., Bravo, D., Rodríguez-Giraldo, Y., Ramírez, L., García, E., Hidalgo, M., & Chávez, E. (2022). Producto 4. Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- McKean, S. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías*. Centro Internacional de Agricultura Tropical· CIAT. Colombia.103pp.
- Mohamed, R., Zainudin, B. H. & Yaakob, A. S. (2020). Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave-assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 303, 125392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125392>.
- Olsen, S. R. (1954). Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (No. 939). US Department of Agriculture.
- U.S. EPA. (1996). "Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils," Revision 2. Washington, DC.
- U.S. EPA. (2007). "Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils," Revision 1. Washington, DC.
- U.S. EPA. (1996). "Method 3052 (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices". Washington, DC.
- Ramtahal, G., Chang Yen, I., Ahmad, N., Bekele, I., Bekele, F., Maharaj, K., ... Harrynanan, L. (2015). Prediction of Soil Cadmium Bioavailability to Cacao (*Theobroma cacao* L.) using Single-Step Extraction Procedures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(20), 2585–2594. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1089262>
- Rodríguez Giraldo, Y., Rodríguez Sánchez, E., Torres, L. G., Montenegro, A. C. & Pichimata, M. A. (2022), Development of validation methods to determine cadmium in cocoa almond from the beans by ICP-MS and ICP-OES, *Talanta Open*, Volume 5, 100078, ISSN 2666-8319, <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100078>.
- Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, A., & Mora, M. L. (2004). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA) de la Sociedad Chilena de



- la Ciencia del Suelo. Chile.
- TMECC Method 04.12. 2002. Digestion techniques. In: The United States Composting Council. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, New York, USA.
- Thomas, G. W., Peaslee, D. E., Walsh, L. M., & Beaton, J. D. (1973). Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America: Madison, WI.
- Zagal, E. & Sadzawka, A. (2007). Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos. Universidad de Concepción, Servicio Agrícola y Ganadero: Santiago, Chile.



ANEXO 1

METHOD 3050B

ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, AND SOILS

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This method has been written to provide two separate digestion procedures, one for the preparation of sediments, sludges, and soil samples for analysis by flame atomic absorption spectrometry (FLAA) or inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and one for the preparation of sediments, sludges, and soil samples for analysis of samples by Graphite Furnace AA (GFAA) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The extracts from these two procedures are not interchangeable and should only be used with the analytical determinations outlined in this section. Samples prepared by this method may be analyzed by ICP-AES or GFAA for all the listed metals as long as the detection limits are adequate for the required end-use of the data. Alternative determinative techniques may be used if they are scientifically valid and the QC criteria of the method, including those dealing with interferences, can be achieved. Other elements and matrices may be analyzed by this method if performance is demonstrated for the analytes of interest, in the matrices of interest, at the concentration levels of interest (See Section 8.0). The recommended determinative techniques for each element are listed below:

<u>FLAA/ICP-AES</u>		<u>GFAA/ICP-MS</u>
Aluminum	Magnesium	Arsenic
Antimony	Manganese	Beryllium
Barium	Molybdenum	Cadmium
Beryllium	Nickel	Chromium
Cadmium	Potassium	Cobalt
Calcium	Silver	Iron
Chromium	Sodium	Lead
Cobalt	Thallium	Molybdenum
Copper	Vanadium	Selenium
Iron	Zinc	Thallium
Lead		
Vanadium		

1.2 This method is not a total digestion technique for most samples. It is a very strong acid digestion that will dissolve almost all elements that could become "environmentally available." By design, elements bound in silicate structures are not normally dissolved by this procedure as they are not usually mobile in the environment. If absolute total digestion is required use Method 3052.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 For the digestion of samples, a representative 1-2 gram (wet weight) or 1 gram (dry weight) sample is digested with repeated additions of nitric acid (HNO₃) and hydrogen peroxide (H₂O₂).

2.2 For GFAA or ICP-MS analysis, the resultant digestate is reduced in volume while heating and then diluted to a final volume of 100 mL.

2.3 For ICP-AES or FLAA analyses, hydrochloric acid (HCl) is added to the initial digestate and the sample is refluxed. In an optional step to increase the solubility of some metals (see Section 7.3.1: NOTE), this digestate is filtered and the filter paper and residues are rinsed, first

with hot HCl and then hot reagent water. Filter paper and residue are returned to the digestion flask, refluxed with additional HCl and then filtered again. The digestate is then diluted to a final volume of 100 mL.

2.4 If required, a separate sample aliquot shall be dried for a total percent solids determination.

3.0 INTERFERENCES

3.1 Sludge samples can contain diverse matrix types, each of which may present its own analytical challenge. Spiked samples and any relevant standard reference material should be processed in accordance with the quality control requirements given in Sec. 8.0 to aid in determining whether Method 3050B is applicable to a given waste.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Digestion Vessels - 250-mL.

4.2 Vapor recovery device (e.g., ribbed watch glasses, appropriate refluxing device, appropriate solvent handling system).

4.3 Drying ovens - able to maintain $30^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

4.4 Temperature measurement device capable of measuring to at least 125°C with suitable precision and accuracy (e.g., thermometer, IR sensor, thermocouple, thermister, etc.)

4.5 Filter paper - Whatman No. 41 or equivalent.

4.6 Centrifuge and centrifuge tubes.

4.7 Analytical balance - capable of accurate weighings to 0.01 g.

4.8 Heating source - Adjustable and able to maintain a temperature of $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$. (e.g., hot plate, block digester, microwave, etc.)

4.9 Funnel or equivalent.

4.10 Graduated cylinder or equivalent volume measuring device.

4.11 Volumetric Flasks - 100-mL.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination. If the purity of a reagent is questionable, analyze the reagent to determine the level of impurities. The reagent blank must be less than the MDL in order to be used.

5.2 Reagent Water. Reagent water will be interference free. All references to water in the method refer to reagent water unless otherwise specified. Refer to Chapter One for a definition of reagent water.

5.3 Nitric acid (concentrated), HNO_3 . Acid should be analyzed to determine level of impurities. If method blank is < MDL, the acid can be used.

5.4 Hydrochloric acid (concentrated), HCl . Acid should be analyzed to determine level of impurities. If method blank is < MDL, the acid can be used.

5.5 Hydrogen peroxide (30%), H_2O_2 . Oxidant should be analyzed to determine level of impurities. If method blank is < MDL, the peroxide can be used.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

6.1 All samples must have been collected using a sampling plan that addresses the considerations discussed in Chapter Nine of this manual.

6.2 All sample containers must be demonstrated to be free of contamination at or below the reporting limit. Plastic and glass containers are both suitable. See Chapter Three, Section 3.1.3, for further information.

6.3 Nonaqueous samples should be refrigerated upon receipt and analyzed as soon as possible.

6.4 It can be difficult to obtain a representative sample with wet or damp materials. Wet samples may be dried, crushed, and ground to reduce subsample variability as long as drying does not affect the extraction of the analytes of interest in the sample.

7.0 PROCEDURE

7.1 Mix the sample thoroughly to achieve homogeneity and sieve, if appropriate and necessary, using a USS #10 sieve. All equipment used for homogenization should be cleaned according to the guidance in Sec. 6.0 to minimize the potential of cross-contamination. For each digestion procedure, weigh to the nearest 0.01 g and transfer a 1-2 g sample (wet weight) or 1 g sample (dry weight) to a digestion vessel. For samples with high liquid content, a larger sample size may be used as long as digestion is completed.

NOTE: All steps requiring the use of acids should be conducted under a fume hood by properly trained personnel using appropriate laboratory safety equipment. The use of an acid vapor scrubber system for waste minimization is encouraged.

7.2 For the digestion of samples for analysis by GFAA or ICP-MS, add 10 mL of 1:1 HNO_3 , mix the slurry, and cover with a watch glass or vapor recovery device. Heat the sample to $95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ and reflux for 10 to 15 minutes without boiling. Allow the sample to cool, add 5 mL of concentrated HNO_3 , replace the cover, and reflux for 30 minutes. If brown fumes are generated, indicating oxidation of the sample by HNO_3 , repeat this step (addition of 5 mL of conc. HNO_3) over and over until no brown fumes are given off by the sample indicating the complete reaction with HNO_3 . Using a ribbed watch glass or vapor recovery system, either allow the solution to evaporate to approximately 5 mL without boiling or heat at $95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ without boiling for two hours. Maintain a covering of solution over the bottom of the vessel at all times.

NOTE: Alternatively, for direct energy coupling devices, such as a microwave, digest samples for analysis by GFAA or ICP-MS by adding 10 mL of 1:1 HNO₃, mixing the slurry and then covering with a vapor recovery device. Heat the sample to 95°C ± 5°C and reflux for 5 minutes at 95°C ± 5°C without boiling. Allow the sample to cool for 5 minutes, add 5 mL of concentrated HNO₃, heat the sample to 95°C ± 5°C and reflux for 5 minutes at 95°C ± 5°C. If brown fumes are generated, indicating oxidation of the sample by HNO₃, repeat this step (addition of 5 mL concentrated HNO₃) until no brown fumes are given off by the sample indicating the complete reaction with HNO₃. Using a vapor recovery system, heat the sample to 95°C ± 5°C and reflux for 10 minutes at 95°C ± 5°C without boiling.

7.2.1 After the step in Section 7.2 has been completed and the sample has cooled, add 2 mL of water and 3 mL of 30% H₂O₂. Cover the vessel with a watch glass or vapor recovery device and return the covered vessel to the heat source for warming and to start the peroxide reaction. Care must be taken to ensure that losses do not occur due to excessively vigorous effervescence. Heat until effervescence subsides and cool the vessel.

NOTE: Alternatively, for direct energy coupled devices: After the Sec. 7.2 "NOTE" step has been completed and the sample has cooled for 5 minutes, add slowly 10 mL of 30% H₂O₂. Care must be taken to ensure that losses do not occur due to excessive vigorous effervescence. Go to Section 7.2.3.

7.2.2 Continue to add 30% H₂O₂ in 1-mL aliquots with warming until the effervescence is minimal or until the general sample appearance is unchanged.

NOTE: Do not add more than a total of 10 mL 30% H₂O₂.

7.2.3 Cover the sample with a ribbed watch glass or vapor recovery device and continue heating the acid-peroxide digestate until the volume has been reduced to approximately 5 mL or heat at 95°C ± 5°C without boiling for two hours. Maintain a covering of solution over the bottom of the vessel at all times.

NOTE: Alternatively, for direct energy coupled devices: Heat the acid-peroxide digestate to 95°C ± 5°C in 6 minutes and remain at 95°C ± 5°C without boiling for 10 minutes.

7.2.4 After cooling, dilute to 100 mL with water. Particulates in the digestate should then be removed by filtration, by centrifugation, or by allowing the sample to settle. The sample is now ready for analysis by GFAA or ICP-MS.

7.2.4.1 Filtration - Filter through Whatman No. 41 filter paper (or equivalent).

7.2.4.2 Centrifugation - Centrifugation at 2,000-3,000 rpm for 10 minutes is usually sufficient to clear the supernatant.

7.2.4.3 The diluted digestate solution contains approximately 5% (v/v) HNO₃. For analysis, withdraw aliquots of appropriate volume and add any required reagent or matrix modifier.

7.3 For the analysis of samples for FLAA or ICP-AES, add 10 mL conc. HCl to the sample digest from 7.2.3 and cover with a watch glass or vapor recovery device. Place the sample on/in the heating source and reflux at 95°C ± 5°C for 15 minutes.

NOTE: Alternatively, for direct energy coupling devices, such as a microwave, digest samples for analysis by FLAA and ICP-AES by adding 5 mL HCl and 10 mL H₂O to the sample digest from 7.2.3 and heat the sample to 95°C ± 5°C, Reflux at 95°C ± 5°C without boiling for 5 minutes.

7.4 Filter the digestate through Whatman No. 41 filter paper (or equivalent) and collect filtrate in a 100-mL volumetric flask. Make to volume and analyze by FLAA or ICP-AES.

NOTE: Section 7.5 may be used to improve the solubilities and recoveries of antimony, barium, lead, and silver when necessary. These steps are optional and are not required on a routine basis.

7.5 Add 2.5 mL conc. HNO₃ and 10 mL conc. HCl to a 1-2 g sample (wet weight) or 1 g sample (dry weight) and cover with a watchglass or vapor recovery device. Place the sample on/in the heating source and reflux for 15 minutes.

7.5.1 Filter the digestate through Whatman No. 41 filter paper (or equivalent) and collect filtrate in a 100-mL volumetric flask. Wash the filter paper, while still in the funnel, with no more than 5 mL of hot (~95°C) HCl, then with 20 mL of hot (~95°C) reagent water. Collect washings in the same 100-mL volumetric flask.

7.5.2 Remove the filter and residue from the funnel, and place them back in the vessel. Add 5 mL of conc. HCl, place the vessel back on the heating source, and heat at 95°C ± 5°C until the filter paper dissolves. Remove the vessel from the heating source and wash the cover and sides with reagent water. Filter the residue and collect the filtrate in the same 100-mL volumetric flask. Allow filtrate to cool, then dilute to volume.

NOTE: High concentrations of metal salts with temperature-sensitive solubilities can result in the formation of precipitates upon cooling of primary and/or secondary filtrates. If precipitation occurs in the flask upon cooling, do not dilute to volume.

7.5.3 If a precipitate forms on the bottom of a flask, add up to 10 mL of concentrated HCl to dissolve the precipitate. After precipitate is dissolved, dilute to volume with reagent water. Analyze by FLAA or ICP-AES.

7.6 Calculations

7.6.1 The concentrations determined are to be reported on the basis of the actual weight of the sample. If a dry weight analysis is desired, then the percent solids of the sample must also be provided.

7.6.2 If percent solids is desired, a separate determination of percent solids must be performed on a homogeneous aliquot of the sample.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 All quality control measures described in Chapter One should be followed.

8.2 For each batch of samples processed, a method blank should be carried throughout the entire sample preparation and analytical process according to the frequency described in Chapter One. These blanks will be useful in determining if samples are being contaminated. Refer to Chapter One for the proper protocol when analyzing method blanks.

8.3 Spiked duplicate samples should be processed on a routine basis and whenever a new sample matrix is being analyzed. Spiked duplicate samples will be used to determine precision and bias. The criteria of the determinative method will dictate frequency, but 5% (one per batch) is recommended or whenever a new sample matrix is being analyzed. Refer to Chapter One for the proper protocol when analyzing spiked replicates.

8.4 Limitations for the FLAA and ICP-AES optional digestion procedure. Analysts should be aware that the upper linear range for silver, barium, lead, and antimony may be exceeded with some samples. If there is a reasonable possibility that this range may be exceeded, or if a sample's analytical result exceeds this upper limit, a smaller sample size should be taken through the entire procedure and re-analyzed to determine if the linear range has been exceeded. The approximate linear upper ranges for a 2 gram sample size:

Ag	2,000 mg/kg
As	1,000,000 mg/kg
Ba	2,500 mg/kg
Be	1,000,000 mg/kg
Cd	1,000,000 mg/kg
Co	1,000,000 mg/kg
Cr	1,000,000 mg/kg
Cu	1,000,000 mg/kg
Mo	1,000,000 mg/kg
Ni	1,000,000 mg/kg
Pb	200,000 mg/kg
Sb	200,000 mg/kg
Se	1,000,000 mg/kg
Tl	1,000,000 mg/kg
V	1,000,000 mg/kg
Zn	1,000,000 mg/kg

NOTE: These ranges will vary with sample matrix, molecular form, and size.

9.0 METHOD PERFORMANCE

9.1 In a single laboratory, the recoveries of the three matrices presented in Table 2 were obtained using the digestion procedure outlined for samples prior to analysis by FLAA and ICP-AES. The spiked samples were analyzed in duplicate. Tables 3-5 represents results of analysis of NIST Standard Reference Materials that were obtained using both atmospheric pressure microwave digestion techniques and hot-plate digestion procedures.

10.0 REFERENCES

1. Rohrbough, W.G.; et al. Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications, 7th ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1986.
2. 1985 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.01; "Standard Specification for Reagent Water"; ASTM: Philadelphia, PA, 1985; D1193-77.
3. Edgell, K.; USEPA Method Study 37 - SW-846 Method 3050 Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. EPA Contract No. 68-03-3254, November 1988.

4. Kimbrough, David E., and Wakakuwa, Janice R. Acid Digestion for Sediments, Sludges, Soils, and Solid Wastes. A Proposed Alternative to EPA SW 846 Method 3050, Environmental Science and Technology, Vol. 23, Page 898, July 1989.
5. Kimbrough, David E., and Wakakuwa, Janice R. Report of an Interlaboratory Study Comparing EPA SW 846 Method 3050 and an Alternative Method from the California Department of Health Services, Fifth Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium, Volume I, July 1989. Reprinted in Solid Waste Testing and Quality Assurance: Third Volume, ASTM STP 1075, Page 231, C.E. Tatsch, Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1991.
6. Kimbrough, David E., and Wakakuwa, Janice R. A Study of the Linear Ranges of Several Acid Digestion Procedures, Environmental Science and Technology, Vol. 26, Page 173, January 1992. Presented Sixth Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium, July 1990.
7. Kimbrough, David E., and Wakakuwa, Janice R. A Study of the Linear Ranges of Several Acid Digestion Procedures, Sixth Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium, Reprinted in Solid Waste Testing and Quality Assurance: Fourth Volume, ASTM STP 1076, Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1992.
8. NIST published leachable concentrations. Found in addendum to certificate of analysis for SRMs 2709, 2710, 2711 - August 23, 1993.
9. Kingston, H.M. Haswell, S.J. ed., Microwave Enhanced Chemistry, Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, D.C., Chapter 3, 1997.

TABLE 1
STANDARD RECOVERY (%) COMPARISON FOR
METHODS 3050A AND 3050B^a

Analyte	METHOD 3050A ^a	METHOD 3050B w/option ^a
Ag	9.5	98
As	86	102
Ba	97	103
Be	96	102
Cd	101	99
Co	99	105
Cr	98	94
Cu	87	94
Mo	97	96
Ni	98	92
Pb	97	95
Sb	87	88
Se	94	91
Tl	96	96
V	93	103
Zn	99	95

^a All values are percent recovery. Samples: 4 mL of 100 mg/mL multistandard; n = 3.

TABLE 2
PERCENT RECOVERY COMPARISON FOR METHODS 3050A AND 3050B

Analyte	Percent Recovery ^{a,c}							
	<u>Sample 4435</u>		<u>Sample 4766</u>		<u>Sample HJ</u>		<u>Average</u>	
	<u>3050A</u>	<u>3050B</u>	<u>3050A</u>	<u>3050B</u>	<u>3050A</u>	<u>3050B</u>	<u>3050A</u>	<u>3050B</u>
Ag	9.8	103	15	89	56	93	27	95
As	70	102	80	95	83	102	77	100
Ba	85	94	78	95	b	b	81	94
Be	94	102	108	98	99	94	99	97
Cd	92	88	91	95	95	97	93	94
Co	90	94	87	95	89	93	89	94
Cr	90	95	89	94	72	101	83	97
Cu	81	88	85	87	70	106	77	94
Mo	79	92	83	98	87	103	83	98
Ni	88	93	93	100	87	101	92	98
Pb	82	92	80	91	77	91	81	91
Sb	28	84	23	77	46	76	32	79
Se	84	89	81	96	99	96	85	94
Tl	88	87	69	95	66	67	74	83
V	84	97	86	96	90	88	87	93
Zn	96	106	78	75	b	b	87	99

a - Samples: 4 mL of 100 mg/mL multi-standard in 2 g of sample. Each value is percent recovery and is the average of duplicate spikes.

b - Unable to accurately quantitate due to high background values.

c - Method 3050B using optional section.

Table 3
Results of Analysis of Nist Standard Reference Material 2704
"River Sediment" Using Method 3050B ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)

Element	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Power Control	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (gas-bulb)	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (IR-sensor)	Hot-Plate	NIST Certified Values for Total Digestion ($\mu\text{g/g} \pm 95\% \text{ CI}$)
Cu	101 $\pm$ 7	89 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1.4	100 $\pm$ 2	98.6 $\pm$ 5.0
Pb	160 $\pm$ 2	145 $\pm$ 6	145 $\pm$ 7	146 $\pm$ 1	161 $\pm$ 17
Zn	427 $\pm$ 2	411 $\pm$ 3	405 $\pm$ 14	427 $\pm$ 5	438 $\pm$ 12
Cd	NA	3.5 $\pm$ 0.66	3.7 $\pm$ 0.9	NA	3.45 $\pm$ 0.22
Cr	82 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2	85 $\pm$ 4	89 $\pm$ 1	135 $\pm$ 5
Ni	42 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	38 $\pm$ 4	44 $\pm$ 2	44.1 $\pm$ 3.0

NA - Not Available

Table 4
Results of Analysis of NIST Standard Reference Material 2710
"Montana Soil (Highly Elevated Trace Element Concentrations)" Using Method 3050B
($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)

Element	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Power Control	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (gas-bulb)	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (IR-sensor)	Hot-Plate	NIST Leachable Concentrations Using Method 3050	NIST Certified Values for Total Digestion ($\mu\text{g/g} \pm 95\% \text{ CI}$)
Cu	2640 $\pm$ 60	2790 $\pm$ 41	2480 $\pm$ 33	2910 $\pm$ 59	2700	2950 $\pm$ 130
Pb	5640 $\pm$ 117	5430 $\pm$ 72	5170 $\pm$ 34	5720 $\pm$ 280	5100	5532 $\pm$ 80
Zn	6410 $\pm$ 74	5810 $\pm$ 34	6130 $\pm$ 27	6230 $\pm$ 115	5900	6952 $\pm$ 91
Cd	NA	20.3 $\pm$ 1.4	20.2 $\pm$ 0.4	NA	20	21.8 $\pm$ 0.2
Cr	20 $\pm$ 1.6	19 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2.4	23 $\pm$ 0.5	19	39*
Ni	7.8 $\pm$ 0.29	10 $\pm$ 1	9.1 $\pm$ 1.1	7 $\pm$ 0.44	10.1	14.3 $\pm$ 1.0

NA - Not Available

* Non-certified values, for information only.

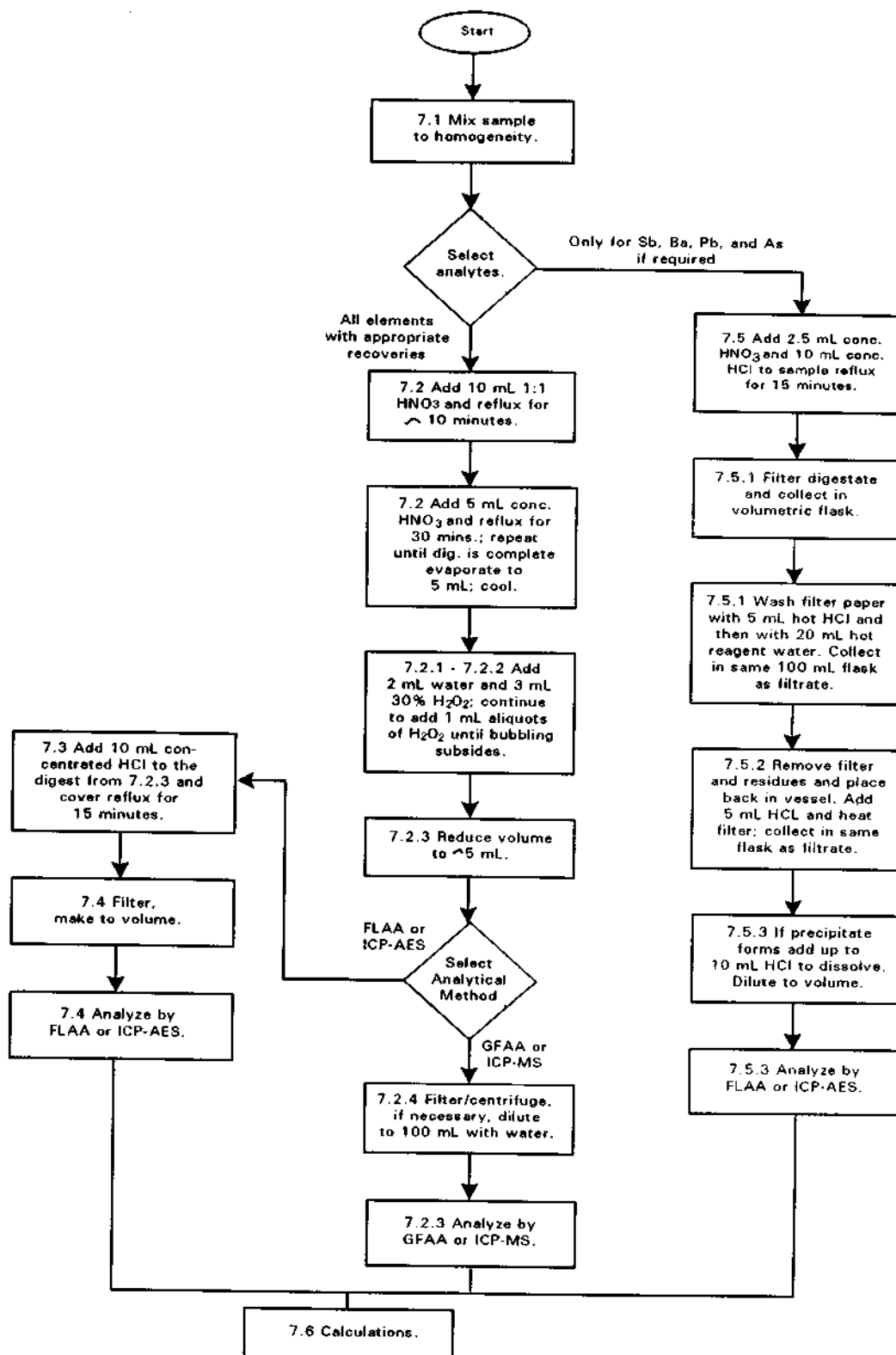
Table 5
Results of Analysis of NIST Standard Reference Material 2711
"Montana Soil (Moderately Elevated Trace Element Concentrations)" Using Method 3050B
($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)

Element	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Power Control	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (gas-bulb)	Atm. Pressure Microwave Assisted Method with Temperature Control (IR-sensor)	Hot-Plate	NIST Leachable Concentrations Using Method 3050	NIST Certified Values for Total Digestion ($\mu\text{g/g} \pm 95\% \text{ CI}$)
Cu	107 ± 4.6	98 ± 5	98 ± 3.8	111 ± 6.4	100	114 ± 2
Pb	1240 ± 68	1130 ± 20	1120 ± 29	1240 ± 38	1100	1162 ± 31
Zn	330 ± 17	312 ± 2	307 ± 12	340 ± 13	310	350.4 ± 4.8
Cd	NA	39.6 ± 3.9	40.9 ± 1.9	NA	40	41.7 ± 0.25
Cr	22 ± 0.35	21 ± 1	15 ± 1.1	23 ± 0.9	20	47*
Ni	15 ± 0.2	17 ± 2	15 ± 1.6	16 ± 0.4	16	20.6 ± 1.1

NA - Not Available

* Non-certified values, for information only.

METHOD 3050B
ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, AND SOILS



METHOD 3051A

MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS

SW-846 is not intended to be an analytical training manual. Therefore, method procedures are written based on the assumption that they will be performed by analysts who are formally trained in at least the basic principles of chemical analysis and in the use of the subject technology.

In addition, SW-846 methods, with the exception of required method use for the analysis of method-defined parameters, are intended to be guidance methods which contain general information on how to perform an analytical procedure or technique which a laboratory can use as a basic starting point for generating its own detailed Standard Operating Procedure (SOP), either for its own general use or for a specific project application. The performance data included in this method are for guidance purposes only, and are not intended to be and must not be used as absolute QC acceptance criteria for purposes of laboratory accreditation.

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This microwave extraction method is designed to mimic extraction using conventional heating with nitric acid (HNO_3), or alternatively, nitric acid and hydrochloric acid (HCl), according to EPA Method 200.2 and Method 3050. Since this method is not intended to accomplish total decomposition of the sample, the extracted analyte concentrations may not reflect the total content in the sample. This method is applicable to the microwave-assisted acid extraction/dissolution[†] of sediments, sludges, soils, and oils for the following elements:

Element		CAS Registry No. ^a
*Aluminum	(Al)	7429-90-5
*Antimony	(Sb)	7440-36-0
Arsenic	(As)	7440-38-2
*Barium	(Ba)	7440-39-3
*Beryllium	(Be)	7440-41-7
Boron	(B)	7440-42-8
Cadmium	(Cd)	7440-43-9
Calcium	(Ca)	7440-70-2
*Chromium	(Cr)	7440-47-3
Cobalt	(Co)	7440-48-4
Copper	(Cu)	7440-50-8
*Iron	(Fe)	7439-89-6

Element		CAS Registry No. ^a
Lead	(Pb)	7439-92-1
*Magnesium	(Mg)	7439-95-4
Manganese	(Mn)	7439-96-5
Mercury	(Hg)	7439-97-6
Molybdenum	(Mo)	7439-98-7
Nickel	(Ni)	7440-02-0
Potassium	(K)	7440-09-7
Selenium	(Se)	7782-49-2
*Silver	(Ag)	7440-22-4
Sodium	(Na)	7440-23-5
Strontium	(Sr)	7440-24-6
Thallium	(Tl)	7440-28-0
*Vanadium	(V)	7440-62-2
Zinc	(Zn)	7440-66-6

^a Chemical Abstract Service Registry Number

*Indicates elements which typically require the addition of HCl to achieve equivalent results with Method 3050, as noted in Ref. 3.

‡Note: For matrices such as certain types of oils, this method may or may not provide total sample dissolution. For other matrices, such as soils and sediments, it should be considered an extraction method. Other elements and matrices may be analyzed by this method if performance is demonstrated for the analyte of interest, in the matrices of interest, at the concentration levels of interest (see Sec. 9.0).

1.2 This method is provided as an alternative to EPA Method 200.2 and Method 3050. This method provides options for improving the performance for certain analytes, such as antimony, iron, aluminum, and silver by the addition of hydrochloric acid, when necessary. It is intended to provide a rapid multi-element acid extraction or dissolution prior to analysis so that decisions can be made about materials and site cleanup levels, the need for TCLP testing of a waste (see Method 1311), and whether a BDAT process is providing acceptable performance. Digests produced by the method are suitable for analysis by flame atomic absorption spectrophotometry (FLAA), graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAA), inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). However, the addition of HCl may limit the quantitation methods, or increase the difficulties of quantitation with some techniques.

Due to the rapid advances in microwave technology, consult your manufacturer's recommended instructions for guidance on their microwave digestion system.

1.3 Prior to employing this method, analysts are advised to consult the determinative method that may be employed in the overall analysis for additional information on quality control procedures, development of QC acceptance criteria, calculations, and general guidance. Analysts also should consult the disclaimer statement at the front of the manual and the information in Chapter Two for guidance on the intended flexibility in the choice of methods, apparatus, materials, reagents, and supplies, and on the responsibilities of the analyst for demonstrating that the techniques employed are appropriate for the analytes of interest, in the matrix of interest, and at the levels of concern.

In addition, analysts and data users are advised that, except where explicitly specified in a regulation, the use of SW-846 methods is *not* mandatory in response to Federal testing requirements. The information contained in this method is provided by EPA as guidance to be used by the analyst and the regulated community in making judgments necessary to generate results that meet the data quality objectives for the intended application.

1.4 Use of this method is restricted to use by, or under supervision of, properly personnel experienced and trained in the use of microwave digestion systems. Each analyst must demonstrate the ability to generate acceptable results with this method.

2.0 SUMMARY OF METHOD

A representative sample is extracted and/or dissolved in concentrated nitric acid, or alternatively, concentrated nitric acid and concentrated hydrochloric acid using microwave heating with a suitable laboratory microwave unit. The sample and acid(s) are placed in a fluorocarbon polymer (PFA or TFM) or quartz microwave vessel or vessel liner. The vessel is sealed and heated in the microwave unit for a specified period of time. After cooling, the vessel contents are filtered, centrifuged, or allowed to settle and then diluted to volume and analyzed by the appropriate determinative method.

3.0 DEFINITIONS

Refer to Chapter One, Chapter Three and the manufacturer's instructions for definitions that may be relevant to this procedure.

4.0 INTERFERENCES

4.1 Solvents, reagents, glassware, and other sample processing hardware may yield artifacts and/or interferences to sample analysis. All of these materials must be demonstrated to be free from interferences under the conditions of the analysis by analyzing method blanks. Specific selection of reagents and purification of solvents by distillation in all-glass systems may be necessary. Refer to each method to be used for specific guidance on quality control procedures and to Chapter Three for general guidance on the cleaning of glassware. Also refer to the determinative methods to be used for a discussion of interferences.

4.2 Very reactive samples or volatile materials may create high pressures due to the evolution of gaseous digestion products. This may cause venting of the vessels with potential loss of sample and/or analytes. The complete decomposition of either carbonates, or carbon based samples, may produce enough pressure to vent the vessel if the sample size is greater than 0.25 g (depending on the pressure capability of the vessel). Variations of the method to accommodate very reactive materials are specifically addressed in Sec. 11.3.3.

4.3 Many types of samples will be dissolved by this method. A few refractory sample matrix compounds, such as quartz, silicates, titanium dioxide, alumina, and other oxides may not be dissolved and in some cases may sequester target analyte elements. These bound elements are considered non-mobile in the environment and are excluded from most aqueous transport mechanisms of pollution.

4.4 Samples that are highly reactive or contaminated may require dilution before analysis. If samples are diluted, then any dilutions must be accounted for in all subsequent calculations. Highly reactive samples may also require pre-digestion in a hood to minimize the danger of thermal runaway and excessively vigorous reactions.

5.0 SAFETY

5.1 This method does not address all safety issues associated with its use. The laboratory is responsible for maintaining a safe work environment and a current awareness file of OSHA regulations regarding the safe handling of the chemicals listed in this method. A reference file of material safety data sheets (MSDSs) should be available to all personnel involved in these analyses.

5.2 The microwave unit cavity must be corrosion resistant and well ventilated. All electronics must be protected against corrosion for safe operation.

CAUTION: There are many safety and operational recommendations specific to the model and manufacturer of the microwave equipment used in individual laboratories. A listing of these specific suggestions is beyond the scope of this method. The analyst is advised to consult the equipment manual, the equipment manufacturer, and other appropriate literature for proper and safe operation of the microwave equipment and vessels. For further details and a review of safety methods during microwave sample preparation, see Ref. 3 and the document of Sec. 13.3.1.

5.3 This method requires microwave transparent and reagent resistant materials such as fluorocarbon polymers (examples are PFA or TFM) or quartz to contain acids and samples. For higher pressure capabilities the vessel may be contained within layers of different microwave transparent materials for strength, durability, and safety. The internal volume of the vessel should be at least 45 mL, and the vessel must be capable of withstanding pressures of at least 30 atm (435 psi), and capable of controlled pressure relief. These specifications are to provide an appropriate, safe, and durable reaction vessel of which there are many adequate designs by many suppliers.

WARNING: The reagent combination (9 mL nitric acid to 3 mL hydrochloric acid) results in greater pressures than those resulting from the use of only nitric acid. As demonstrated in Figures 1 and 2, pressures of approximately 12 atm have been reached during the heating of the acid mixture alone (no sample in the vessel). Pressures reached during the actual decomposition of a sediment sample (SRM 2704, a matrix with low organic content) have more than doubled when using the 9 mL nitric and 3 mL hydrochloric acid mixture. These higher pressures necessitate the use of vessels having higher pressure capabilities (30 atm or 435 psi). Matrices having large organic content, such as oils, can produce approximately 25 atm of pressure inside the vessel (as described in Method 3052).

WARNING: The outer layers of vessels are frequently not as acid or reagent resistant as the liner material. In order to retain the specified performance and safety requirements, these outer layers must not be chemically degraded or physically damaged. Routine examination of the vessel materials is necessary to ensure their safe use.

WARNING: Another safety concern relates to the use of sealed containers without pressure relief devices. Temperature is the important variable controlling the reaction. Pressure is needed to attain elevated temperatures, but must be safely contained. Some digestion vessels constructed from certain fluorocarbons may crack, burst, or explode in the unit under certain pressures. Only vessels approved by the manufacturer of the microwave system being used are considered acceptable.

WARNING: When acids such as nitric and hydrochloric are used to effect sample digestion in microwave units in open vessel(s), or sealed vessel(s), there is the potential for any released acid vapors to corrode the safety devices that prevent the microwave magnetron from shutting off when the door is opened. This can result in operator exposure to microwave energy. Use of a laboratory-grade microwave equipment system with isolated and corrosion resistant safety devices prevents this from occurring. Use of laboratory-grade microwave equipment is needed to prevent safety hazards. For further details, consult Ref. 3 and the document listed in Sec. 13.3.1.

Users are therefore advised not to use domestic (kitchen) type microwave ovens or sealed containers which are not equipped with controlled pressure relief mechanisms for microwave acid digestions by this method.

6.0 EQUIPMENT AND SUPPLIES

The mention of trade names or commercial products in this manual is for illustrative purposes only, and does not constitute an EPA endorsement or exclusive recommendation for use. The products and instrument settings cited in SW-846 methods represent those products and settings used during method development or subsequently evaluated by the Agency. Glassware, reagents, supplies, equipment, and settings other than those listed in this manual may be employed provided that method performance appropriate for the intended application has been demonstrated and documented.

This section does not list common laboratory glassware (e.g., beakers and flasks).

6.1 Microwave apparatus requirements

6.1.1 The temperature performance requirements necessitate the microwave decomposition system to sense the temperature to within ± 2.5 EC and automatically adjust the microwave field output power within 2 seconds of sensing. Temperature sensors should be accurate to ± 2 EC (including the final reaction temperature of 175 ± 5 EC). Temperature feedback control provides the primary performance mechanism for the method. Due to the variability in sample matrix types and microwave digestion equipment (i.e., different vessel types and microwave oven designs), temperature feedback control is preferred for reproducible microwave heating. For further details consult Ref. 3.

Alternatively, for a specific vessel type, specific set of reagent(s), and sample type, a calibration control mechanism can be developed. Through calibration of the microwave

power for a specific number and type of vessels, vessel load, and heat loss characteristics of a specific vessel series, the reaction temperature profile described in Sec. 11.3.5 can be reproduced. The calibration settings are specific for the number and type of vessels and microwave system being used, in addition to the specific reagent combination being used. Therefore, no specific calibration settings are provided in this method. These settings may be developed by using temperature monitoring equipment for each specific set of microwave equipment and vessel type. They may be used as previously described in such methods as Methods 3015 and 3052. In this circumstance, the microwave system provides programmable power, which can be programmed to within ± 12 W of the required power. Typical systems provide a nominal 600 W to 1200 W of power. Calibration control provides backward compatibility with older laboratory microwave systems which may not be equipped for temperature monitoring or feedback control and with lower cost microwave systems for some repetitive analyses. Older vessels with lower pressure capabilities may not be compatible (see Refs. 1, 2, and 3 and the documents listed in Secs. 13.3.3 and 13.3.5).

6.1.2 The accuracy of the temperature measurement system should be periodically validated at an elevated temperature. This can be done using a container of silicon oil (a high temperature oil) and an external, calibrated temperature measurement system. The oil should be adequately stirred to ensure a homogeneous temperature, and both the microwave temperature sensor and the external temperature sensor placed into the oil. After heating the oil to a constant temperature of 180 ± 5 EC, the temperature should be measured using both sensors. If the measured temperatures vary by more than 1 to 2 EC, the microwave temperature measurement system should be calibrated. Consult the microwave manufacturer's instructions about the specific temperature sensor calibration procedure.

6.1.3 A rotating turntable is employed to ensure the homogeneous distribution of microwave radiation within the unit. The speed of the turntable should be a minimum of 3 rpm. Other types of equipment that are used to assist in achieving uniformity of the microwave field may also be appropriate.

6.2 Filter paper, qualitative or equivalent.

6.3 Filter funnel, glass, polypropylene, or other appropriate material.

6.4 Analytical balance, of appropriate capacity and resolution meeting data quality objectives.

7.0 REAGENTS AND STANDARDS

7.1 Reagent-grade chemicals must be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

7.2 All acids should be sub-boiling distilled where possible to minimize the blank levels due to metallic contamination. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficient purity to permit its use without decreasing the accuracy of the determination. If the purity of a reagent is questionable, the reagent should be analyzed to

determine the level of impurities. The reagent blank must be less than the lower level of quantitation in order to be used.

7.2.1 Concentrated nitric acid (HNO_3) -- The acid should be analyzed to determine levels of impurity. If the method blank is less than the lower level of quantitation, the acid can be used.

7.2.2 Concentrated hydrochloric acid (HCl) -- The acid should be analyzed to determine levels of impurity. If the method blank is less than the lower level of quantitation, the acid can be used.

7.3 Reagent water -- Reagent water must be interference free. All references to water in this method refer to reagent water unless otherwise specified. For further details, consult the document listed in Sec. 13.3.2.

8.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND STORAGE

8.1 See the introductory material to Chapter Three, "Inorganic Analytes."

8.2 All sample containers must be prewashed with acids and water, and metal-free detergents, if necessary, depending on the history of use of the container (Ref. 3). Plastic and glass containers are both suitable. For further information, see Chapter Three.

9.0 QUALITY CONTROL

9.1 Refer to Chapter One for additional guidance on quality assurance (QA) and quality control (QC) protocols. When inconsistencies exist between QC guidelines, method-specific QC criteria take precedence over both technique-specific criteria and those criteria given in Chapter One, and technique-specific QC criteria take precedence over the criteria in Chapter One. Any effort involving the collection of analytical data should include development of a structured and systematic planning document, such as a Quality Assurance Project Plan (QAPP) or a Sampling and Analysis Plan (SAP), which translates project objectives and specifications into directions for those that will implement the project and assess the results. Each laboratory should maintain a formal quality assurance program. The laboratory should also maintain records to document the quality of the data generated. All data sheets and quality control data should be maintained for reference or inspection.

9.2 Initial demonstration of proficiency

Each laboratory must demonstrate initial proficiency with each sample preparation and determinative method combination it utilizes by generating data of acceptable accuracy and precision for target analytes in a clean reference matrix. This will include a combination of the sample extraction method and the determinative method (a 6000 or 7000 series method). The laboratory must also repeat the demonstration of proficiency whenever new staff are trained or significant changes in instrumentation are made.

9.2.1 Prepare the reference samples from a spiking solution containing each analyte of interest. The reference sample concentrate (spiking solution) may be prepared from pure standard materials, or purchased as certified solutions. If prepared by the laboratory, the reference sample concentrate should be made using stock standards prepared independently from those used for calibration.

9.2.2 The procedure for preparation of the reference sample concentrate is dependent upon the method being evaluated. Guidance for reference sample concentrations for certain methods is listed in Sec. 9.2.4. In other cases, the determinative methods may contain guidance on preparing the reference sample concentrate and the reference sample. In the absence of any other guidance, consult Sec. 9.3.3 and prepare the spiking solution accordingly.

The concentration of target analytes in the reference sample may be adjusted to more accurately reflect the concentrations that will be analyzed by the laboratory. If the concentration of an analyte is being evaluated relative to a regulatory limit or action level, see Sec. 9.3.3 for information on selecting an appropriate spiking level.

9.2.3 To evaluate the performance of the total analytical process, the reference samples must be handled in exactly the same manner as actual samples. See the note in Sec. 9.3.1 for important information regarding spiking samples.

9.2.4 Preparation of reference samples for specific determinative methods

The following sections provide guidance on the QC reference sample concentrates for many determinative methods. The concentration of the target analytes in the QC reference sample for the methods listed below may need to be adjusted to more accurately reflect the concentrations of interest in different samples or projects. If the concentration of an analyte is being evaluated relative to a regulatory limit or action level, see Sec. 9.3.3 for information on selecting an appropriate spiking level. In addition, the analyst may vary the concentration of the spiking solution and the volume of solution spiked into the sample. However, because of concerns about the effects of the spiking solution solvent on the sample, the total volume spiked into a sample should generally be held to no more than 1 mL. For any determinative method not listed below, the analyst should consult Sec. 9.3.3 and is free to choose analytes and spiking concentrations appropriate for the intended application. See the note in Sec. 9.3.1 for important information regarding spiking samples.

NOTE: All of the concentrations listed below refer to the concentration of the spiking solution itself, not the concentration of the spiked sample.

9.2.4.1 Method 6010, Inorganic Elements by ICP-AES -- The QC reference sample concentrate should contain each analyte at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate type(s) and volume(s) of acid(s). See Method 6010.

9.2.4.2 Method 6020, Inorganic Elements by ICP-MS -- The QC reference sample concentrate should contain each analyte at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate type(s) and volume(s) of acid(s). See Method 6020.

9.2.4.2 Method 7000, Inorganic Elements by Flame AAS -- The QC reference sample concentrate should contain each analyte at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate type(s) and volume(s) of acid(s). See Method 7000.

9.2.4.3 Method 7010, Inorganic Elements by Graphite Furnace AAS -- The QC reference sample concentrate should contain each analyte at 1,000 mg/L

in reagent water with appropriate type(s) and volume(s) of acid(s). See Method 7010.

9.2.4.4 Method 7061, Arsenic by AA, Gaseous Hydride -- The QC reference sample concentrate should contain arsenic at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. See Method 7061.

9.2.4.5 Method 7062, Antimony and Arsenic by AA, Borohydride Reduction -- The QC reference sample concentrate should contain each analyte at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. See Method 7062.

9.2.4.5 Method 7063, Arsenic by ASV -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7063.

9.2.4.6 Method 7470, Mercury in Liquid Waste by Manual Cold-Vapor Technique -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are also commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7470.

9.2.4.7 Method 7471, Mercury in Solid or Semisolid Waste by Manual Cold-Vapor Technique -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are also commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7471.

9.2.4.8 Method 7472, Mercury by ASV -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are also commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7472.

9.2.4.9 Method 7473, Mercury by Thermal, Decomposition, Amalgamation, and AA -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are also commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7473.

9.2.4.10 Method 7474, Mercury by Atomic Fluorescence -- The QC reference sample concentrate should contain mercury at 1,000 mg/L in reagent water with appropriate volume of concentrated nitric acid. Stock solutions are also commercially available as spectrophotometric standards. See Method 7474.

9.2.4.11 Method 7741, Selenium by AA, Gaseous Reduction -- The QC reference sample concentrate should contain selenium at 1,000 mg/L in reagent water. See Method 7741.

9.2.4.12 Method 7742, Selenium by AA, Borohydride Reduction -- The QC reference sample concentrate should contain selenium at 1,000 mg/L in reagent water. See Method 7742.

9.2.5 Analyze at least four replicate aliquots of the well-mixed reference samples by the same procedures used to analyze actual samples. This will include a combination of the sample preparation method and the determinative method (a 6000 or 7000 series method). Follow the guidance on data calculation and interpretation presented in the determinative method.

9.3 Sample quality control for preparation and analysis

9.3.1 Documenting the effect of the matrix should include the analysis of at least one matrix spike and one duplicate unspiked sample or one matrix spike/matrix spike duplicate pair per analytical batch. The decision on whether to prepare and analyze duplicate samples or a matrix spike/matrix spike duplicate must be based on a knowledge of the samples in the sample batch. If samples are expected to contain target analytes, laboratories may use one matrix spike and a duplicate analysis of an unspiked field sample. If samples are not expected to contain target analytes, then laboratories should use a matrix spike and matrix spike duplicate pair. The consideration as to which sample for a given batch is selected for QC analyses should be decided during the project planning process and documented in an approved sampling and analysis plan. The actual sample selected for QC analyses should be representative of the entire matrix composition for a given extraction batch, since data quality assumptions will likely be applied to all batch samples based on compliance to the stated data quality objectives and meeting the recommended precision and accuracy criteria. Therefore, it is inappropriate to combine dissimilar matrices in a single sample preparatory batch and expect to use a single set of QC samples. Sec. 9.3.3 provides guidance on establishing the concentration of the matrix spike compounds in the sample chosen for spiking.

The choice of analytes to be spiked should reflect the analytes of interest for the specific project. Thus, if only a subset of the list of target analytes provided in a determinative method are of interest, then these would be the analytes of interest for the project. In the absence of project-specific analytes of interest, it is suggested that the laboratory periodically change the analytes that are spiked with the goal of obtaining matrix spike data for most, if not all, of the analytes in a given determinative method. If these compounds are not target analytes for a specific project, or if other compounds are known to be of greater concern at a given site, then other matrix spike compounds should be employed.

CAUTION: The utility of the data for the matrix spike compounds depends on the degree to which the spiked compounds mimic the compounds already present in a field sample. Therefore, it is CRITICAL that any compounds added to a sample are added to the sample aliquot PRIOR TO any additional processing steps. It is also CRITICAL that the spiked compounds be in the same chemical form as the target compounds.

9.3.2 A laboratory control sample (LCS) should be included with each analytical batch. The LCS consists of an aliquot of a clean (control) matrix similar to the sample matrix and of the same weight or volume: e.g., reagent water for the water matrix or sand or soil for the solid matrix. The LCS is spiked with the same analytes at the same concentrations as the matrix spike, when appropriate. When the results of the matrix spike analysis indicate a potential problem due to the sample matrix itself, the LCS results are used to verify that the laboratory can perform the analysis in a clean matrix.

9.3.3 The concentration of the matrix spike sample and/or the LCS should be determined as described in the following sections.

9.3.3.1 If, as in compliance monitoring, the concentration of a specific analyte in the sample is being checked against a regulatory limit or action level, the spike should be at or below the regulatory limit or action level, or 1 - 5 times the background concentration (if historical data are available), whichever concentration is higher.

9.3.3.2 If historical data are not available, it is suggested that an uncontaminated sample of the same matrix from the site be submitted for matrix spiking purposes to ensure that high concentrations of target analytes and/or interferences will not prevent calculation of recoveries.

9.3.3.3 If the concentration of a specific analyte in a sample is not being checked against a limit specific to that analyte, then the concentration of the matrix spike should be at the same concentration as the reference sample (Sec. 9.2.4), near the middle of calibration range, or approximately 10 times the quantitation limit in the matrix of interest. It is again suggested that a background sample of the same matrix from the site be submitted as a sample for matrix spiking purposes.

9.3.4 Analyze these QC samples (the LCS and the matrix spikes or the optional matrix duplicates) following the procedures in the determinative method. Calculate and evaluate the QC data as outlined in the determinative method.

9.3.5 Blanks -- The preparation and analysis of method blanks and other blanks are necessary to track potential contamination of samples during the extraction and analysis processes. Refer to Chapter One for specific quality control procedures.

9.4 The laboratory must also have procedures for documenting the effect of the matrix on method performance. Refer to Chapter One and each determinative method for specific guidance on developing method performance data.

9.5 Periodically, the accuracy of the temperature measurement system used to control the microwave equipment should be validated per Sec. 6.1.2.

9.6 (This step is not necessary if using temperature feedback control.) Each day that samples are extracted, the microwave-power calibration should be verified by heating 1 kg of ASTM Type II water (at 22 ± 3 EC) in a covered, microwave-transparent vessel for 2 min at the setting for 490 W and measuring the water temperature after heating per Sec. 10.5. If the power calculated (according to Sec. 12.0) differs from 490 W by more than ± 10 W, the microwave settings should be recalibrated according to Sec. 10.0.

9.7 The choice of an acid or acid mixture for digestion will depend on the analytes of interest and no single acid or acid mixture is universally applicable to all analyte groups. Whatever acid or acid mixture is employed, including those specifically listed in this method, the analyst must demonstrate adequate performance for the analytes of interest, at the levels of interest. At a minimum, such a demonstration will encompass the initial demonstration of proficiency described in Method 3500, using a clean reference matrix. Method 8000 describes procedures that may be used to develop performance criteria for such demonstrations as well as for matrix spike and laboratory control sample results.

10.0 CALIBRATION AND STANDARDIZATION

The following sections provide information regarding the calibration of microwave equipment.

NOTE: If the microwave unit uses temperature feedback control to control the performance specifications of the method, then performing the calibration procedure is not necessary.

10.1 Calibration is the normalization and reproduction of a microwave field strength to permit reagent and energy coupling in a predictable and reproducible manner. It balances reagent heating and heat loss from the vessels and is equipment dependent due to the heat retention and loss characteristics of the specific vessel. Available power is evaluated to permit the microwave field output in watts to be transferred from one microwave system to another.

Use of calibration to control this reaction requires balancing output power, coupled energy, and heat loss to reproduce the temperature heating profile given in Sec. 11.3.5. The conditions for each acid mixture and each batch containing the same specified number of vessels must be determined individually. Only identical acid mixtures and vessel models and specified numbers of vessels may be used in a given batch.

10.2 For cavity type microwave equipment, calibration is accomplished by measuring the temperature rise in 1 kg of water exposed to microwave radiation for a fixed period of time. The analyst can relate power in watts to the partial power setting of the system. The calibration format needed for laboratory microwave systems depends on the type of electronic system used by the manufacturer to provide partial microwave power. Few systems have an accurate and precise linear relationship between percent power settings and absorbed power. Where linear circuits have been utilized, the calibration curve can be determined by a three-point calibration method (see Sec. 10.4). Otherwise, the analyst must use the multiple point calibration method (see Sec. 10.3). Assistance in calibration and software guidance of calibration are available in Ref. 3 and the document listed in Sec. 13.3.5.

10.3 The multiple point calibration involves the measurement of absorbed power over a large range of power settings. Typically, for a 600 W unit, the following power settings are measured: 100, 99, 98, 97, 95, 90, 80, 70, 60, 50, and 40% using the procedure described in Sec. 10.5. These data are clustered about the customary working power ranges. Non-linearity has been encountered at the upper end of the calibration. Non-linearity is primarily encountered when using older instrumentation, however, multi-point calibration is recommended for use with all instrumentation when accurate and precise temperature feedback control is not available. If the system's electronics are known to have nonlinear deviations in any region of proportional power control, it will be necessary to make a set of measurements that bracket the power to be used. The final calibration point should be at the partial power setting that will be used in the test. This setting should be checked periodically to evaluate the integrity of the calibration. If a significant change is detected (± 10 W), then the entire calibration should be re-evaluated.

10.4 The three-point calibration involves the measurement of absorbed power at three different power settings. Measure the power at 100% and 50% using the procedure described in Sec. 10.5. From this 2-point line, determine the partial power setting that corresponds to the power, in watts, specified in the procedure to reproduce the heating profile specified in Sec. 11.3.5. Measure the absorbed power at that partial power setting. If the measured absorbed power does not correspond to the specified power within ± 10 W, use the multiple point calibration in Sec. 10.3. This point should also be used to periodically verify the integrity of the calibration.

10.5 Equilibrate a large volume of water to room temperature (22 ± 3 EC). One kg of reagent water is weighed ($1,000.0 \pm 0.1$ g) into a fluorocarbon beaker or a beaker made of some other material that does not significantly absorb microwave energy (glass absorbs microwave energy and is not recommended). The initial temperature of the water should be 22 ± 3 EC measured to ± 0.05 EC. The covered beaker is circulated continuously (in the normal sample path) through the microwave field for 2 min at the desired partial power setting with the system's exhaust fan on maximum (as it will be during normal operation). The beaker is removed and the water vigorously stirred. Use a magnetic stirring bar inserted immediately after microwave irradiation (irradiating with the stir bar in the vessel could cause electrical arcing) and record the maximum temperature within the first 30 seconds to ± 0.05 EC. Use a new sample for each additional measurement. If the water is reused (after making adjustments for any loss of weight due to heating), both the water and the beaker must have returned to 22 ± 3 EC. Three measurements at each power setting should be made.

The absorbed power is determined by the following relationship:

$$P = \frac{(K)(C_p)(m)(\Delta T)}{t}$$

Where:

P = the apparent power absorbed by the sample in watts (W) (joule/sec)

K = the conversion factor for thermochemical calories sec^{-1} to watts ($K = 4.184$)

C_p = the heat capacity, thermal capacity, or specific heat [$\text{cal}/(\text{g EC})$] of water

m = the mass of the water sample in grams (g)

ΔT = the final temperature minus the initial temperature (EC)

t = the time in seconds (s)

Using the experimental conditions of 2 minutes (120 sec) and 1 kg (1000 g) of distilled water [heat capacity at 25 EC is $0.9997 \text{ cal}/(\text{g EC})$], the calibration equation simplifies to:

$$P = (\Delta T)(34.86)$$

NOTE: Stable line voltage is necessary for accurate and reproducible calibration and operation. The line voltage should be within manufacturer's specification, and during measurement and operation should not vary by more than ± 2 V (Ref. 3). Electronic components in most microwave units are matched to the system's function and output. When any part of the high voltage circuit, power source, or control components in the system are serviced or replaced, it will be necessary to recheck the system's

calibration. If the power output has changed significantly (± 10 W), then the entire calibration should be re-evaluated.

11.0 PROCEDURE

11.1 Temperature control of closed vessel microwave instruments provides the main feedback control performance mechanism for this method. Method control requires a temperature sensor in one or more vessels during the entire decomposition. The microwave decomposition system should sense the temperature to within ± 2.5 EC and permit adjustment of the microwave output power within 2 sec.

11.2 All digestion vessels and volumetric ware must be carefully acid washed and rinsed with reagent water. When switching between high concentration samples and low concentration samples, all digestion vessels (fluoropolymer or quartz liners) should be cleaned by leaching with hot (1:1) hydrochloric acid (greater than 80 EC, but less than boiling) for a minimum of two hours followed by hot (1:1) nitric acid (greater than 80 EC, but less than boiling) for a minimum of two hours. The vessels should then be rinsed with reagent water and dried in a clean environment. This cleaning procedure should also be used whenever the prior use of the digestion vessels is unknown or cross contamination from prior sample digestions in vessels is suspected. Polymeric or glass volumetric ware and storage containers should be cleaned by leaching with more dilute acids (approximately 10% V/V) appropriate for the specific material used and then rinsed with reagent water and dried in a clean environment.

11.3 Sample digestion

11.3.1 Weigh a well-mixed sample to the nearest 0.001 g into an appropriate vessel equipped with a controlled pressure relief mechanism. For soils, sediments, and sludges, use no more than 0.500 g. For oil or oil contaminated soils, initially use no more than 0.250 g. When large samples of oil are necessary, the use of Method 3052, which has sample scale-up options, is recommended. If the sample can not be well mixed and homogenized on an as received basis, then perform air or oven drying at 60 °C or less, crushing, sieving, grinding, and mixing as necessary to homogenize the sample until the subsampling variance is less than the data quality objectives of the analysis. While proper sample preparation generally produces great reduction in analytical variability, be aware that in certain unusual circumstances there could be loss of volatile metals (e.g., Hg, organometallics) or irreversible chemical changes (e.g., precipitation of insoluble species, change in valence state).

11.3.2 Add 10 ± 0.1 mL concentrated nitric acid or, alternatively, 9 ± 0.1 mL concentrated nitric acid and 3 ± 0.1 mL concentrated hydrochloric acid to the vessel in a fume hood (or fume exhausted enclosure). The addition of concentrated hydrochloric acid to the nitric acid is appropriate for the stabilization of certain analytes, such as Ag, Ba, and Sb and high concentrations of Fe and Al in solution. Improvements and optimal recoveries of antimony, iron, and silver from a variety of matrices upon addition of HCl are demonstrated in Sec. 17.0, in Figures 3 through 7 (these data are provided for guidance purposes only). The addition of hydrochloric acid may, however, limit the quantitation techniques or increase the difficulties of analysis for some quantitation systems.

WARNING: The addition of hydrochloric acid must be in the form of concentrated hydrochloric acid and not from a premixed combination of acids as a buildup of chlorine gas, as well as other gases, will result from a premixed acid

solution. These gases may be violently released upon heating. This is avoided by adding the acid in the described manner.

WARNING: Toxic nitrogen oxide(s) and chlorine fumes are usually produced during digestion. Therefore, all steps involving open or the opening of microwave vessels must be performed in a properly operating fume ventilation system.

WARNING: The analyst should wear protective gloves and face protection.

CAUTION: The use of microwave equipment with temperature feedback control is needed to control any unfamiliar reactions that may occur during the leaching of samples of unknown composition. The leaching of these samples may require additional vessel requirements such as increased pressure capabilities.

11.3.3 The analyst should be aware of the potential for a vigorous reaction, especially with samples containing volatile or easily oxidized organic species. When digesting a matrix of this type, do not leach this type of sample as described in this method, due to the high potential for unsafe and uncontrollable reactions. Instead, these samples may be predigested in a hood, with the vessel loosely capped to allow gases to escape, eliminating the hazard presented by rapid addition of thermal energy (MW power) to a reactive mixture. After predigestion, the samples may be digested according to the procedures described in this method.

11.3.4 Seal the vessel according to the manufacturer's directions. Properly place the vessel in the microwave system according to the manufacturer's recommended specifications and, when applicable, connect appropriate temperature and pressure sensors to vessels according to manufacturer's specifications.

11.3.5 This method is compatible with a performance-based approach, designed to achieve or approach consistent leaching of the sample through achieving specific reaction conditions. The temperature of each sample should rise to 175 ± 5 EC in approximately 5.5 ± 0.25 min and remain at 175 ± 5 EC for 4.5 min, or for the remainder of the 10-min digestion period (see Refs. 2, 3, and 4 and the document listed in Sec. 13.3.4). Figure 2 gives the time versus temperature and pressure profile for a standard sediment sample (these data are presented for guidance purposes only). When using temperature feedback control, the number of samples that may be simultaneously digested may vary, from one sample up to the maximum number of vessels that can be heated by the magnetron of the microwave unit according to the heating profile specified previously in this section. The number will depend on the power of the unit, the number of vessels, and the heat loss characteristics of the vessels (Ref. 3).

11.3.5.1 The pressure should peak between 5 and 10 min for most samples (see Refs. 1 and 2 and the document listed in Sec. 13.3.4). If the pressure exceeds the pressure limits of the vessel, the pressure should be safely and controllably reduced by the pressure relief mechanism of the vessel.

11.3.5.2 Calibration control is applicable in reproducing this method provided the power in watts versus time parameters are determined to reproduce the specifications listed in Sec. 11.3.5. The calibration settings will be specific to the quantity of reagents, the number of vessels, and the heat loss characteristics of the vessels (see Ref. 3 and the document listed in Sec. 13.3.3). If calibration control is being used, any vessels containing acids for analytical blank purposes

are counted as sample vessels. When fewer than the recommended number of samples are to be digested, the remaining vessels should be filled with the same acid mixture to achieve the full complement of vessels. This provides an energy balance, since the microwave power absorbed is proportional to the total absorbing mass in the cavity. Irradiate each group of vessels using the predetermined calibration settings. (Different vessel types should not be mixed.)

11.3.6 At the end of the microwave program, allow the vessels to cool for a minimum of 5 min before removing them from the microwave system. Cooling of the vessels may be accelerated by internal or external cooling devices. When the vessels have cooled to near room temperature, determine if the microwave vessels have maintained their seal throughout the digestion. Due to the wide variability of vessel designs, a single procedure is not appropriate. For vessels that are sealed as discrete separate entities, the vessel weight may be taken before and after digestion to evaluate seal integrity. If the weight loss of sample exceeds 1% of the weight of the sample and reagents, then the sample is considered compromised. For vessels with burst disks, a careful visual inspection of the disk, in addition to weighing, may identify compromised vessels. For vessels with resealing pressure relief mechanisms, an auditory or a physical sign that can indicate whether a vessel has vented is appropriate.

11.3.7 Complete the preparation of the sample by venting microwave containers in a fume hood before uncapping, so as to avoid a rush of acid vapor that may still be in the headspace. When sufficiently cool to handle, carefully uncap the vessels, using the procedure recommended by the vessel manufacturer. Quantitatively transfer the sample to an acid-cleaned bottle. If the digested sample contains particulates which may clog nebulizers or interfere with injection of the sample into the instrument, the sample may be centrifuged (Sec. 11.3.7.1), allowed to settle (Sec. 11.3.7.2), or filtered (Sec. 11.3.7.3).

11.3.7.1 Centrifugation -- Centrifugation at 2,000 - 3,000 rpm for 10 min is usually sufficient to clear the supernatant.

11.3.7.2 Settling -- If undissolved material, such as SiO_2 , TiO_2 , or other refractory oxides, remains, allow the sample to stand until the supernatant is clear. Allowing a sample to stand overnight will usually accomplish this. If it does not, centrifuge or filter the sample.

11.3.7.3 Filtering -- If necessary, the filtering apparatus must be thoroughly cleaned and pre-rinsed with dilute (approximately 10% V/V) nitric acid. Filter the sample through qualitative filter paper into a second acid-cleaned container.

11.3.8 The removal or reduction of the quantity of the nitric and hydrochloric acids prior to analysis may be desirable. The chemistry and volatility of the analytes of interest should be considered and evaluated when using this alternative (Ref. 3). Evaporation to near dryness in a controlled environment with controlled purge gas and neutralizing and collection of exhaust interactions is an alternative where appropriate. This manipulation may be performed in the microwave system, if the system is capable of this function, or external to the microwave system in more common apparatus(s). This option must be tested and validated to determine analyte retention and loss and should be accompanied by equipment validation possibly using the standard addition method and standard reference materials. This alternative may be used to alter either the acid concentration and/or acid composition prior to analysis. (For further information, see Ref. 3 and Method 3052).

NOTE: The final solution typically requires nitric acid to maintain appropriate sample solution acidity and stability of the elements. Commonly, a 2% (v/v) nitric acid concentration is desirable. Waste minimization techniques should be used to capture reagent fumes. This procedure should be tested and validated in the apparatus and on standards before using on unknown samples.

11.3.9 Transfer or decant the sample into volumetric ware and dilute the digest to a known volume. The digest is now ready for analysis for elements of interest using appropriate elemental analysis techniques.

12.0 DATA ANALYSIS AND CALCULATIONS

12.1 Calculations -- The concentrations determined are to be reported on the basis of the actual weight of the original sample. All dilutions must be taken into account when computing the final results.

12.2 Prior to using this method, verify that the temperature sensing equipment is properly reading temperature. A procedure for verification is given in Sec. 6.1.2. This will establish the accuracy and precision of the temperature sensing equipment, which should be carried throughout the statistical treatment of the quality assurance data.

12.3 In calibrating the microwave unit (Sec. 10.0), the power absorbed (for each power setting) by 1 kg of reagent water exposed to 120 seconds of microwave energy is determined by the expression

$$\text{Power (in watts)} = (T_1 - T_2) (34.86)$$

Where:

T_1 = Initial temperature of water (between 21 and 25 EC to nearest 0.1 EC)

T_2 = Final temperature of water (to nearest 0.1 EC)

12.4 Plot the power settings against the absorbed power (calculated in Sec. 12.3) to obtain a calibration relationship. Alternatively, use a microwave calibration program to analyze the calibration data (see Ref. 3 and the document listed in Sec. 13.3.5). Interpolate the data to obtain the instrument settings needed to provide the wattage levels specified in Sec. 12.3.

12.5 Calculate the sample dry-weight fraction as follows:

$$\text{Dry-Wt fraction} = \frac{(W_2) \& (W_3)}{(W_1) \& (W_3)}$$

Where:

W_1 = Wt for sample + vessel, before drying, g

W_2 = Wt for sample + vessel, after drying, g

W_3 = Wt for empty, dry vessel, g

12.6 Convert the extract concentration obtained from the instrument in mg/L to mg/kg dry-weight of sample by:

$$\text{Sample concentration} = \frac{(C) (V) (D)}{(W) (S)}$$

Where:

C = Concentration in extract (mg/L)

D = Dilution factor

S = Solid dry-weight fraction for sample, g/g

V = Volume of extract, mL x 0.001

W = Weight of undried sample extracted, g x 0.001

13.0 METHOD PERFORMANCE

13.1 Performance data and related information are provided in SW-846 methods only as examples and guidance. The data do not represent required performance criteria for users of the methods. Instead, performance criteria should be developed on a project-specific basis, and the laboratory should establish in-house QC performance criteria for the application of this method. These performance data are not intended to be and must not be used as absolute QC acceptance criteria for purposes of laboratory accreditation.

13.2 The fundamental chemical basis of this method with and without HCl has been compared with Method 3050 in several sources (see 13.3.4 and 13.3.6). Several papers have evaluated the leachability of NIST SRMs with this method (Ref. 1 and Sec. 13.3.5). Evaluations and optimizations of this method have been documented (Refs. 5 and 6), as well as additional leaches performed on more matrices, which may be addressed in future papers. This method has been determined to be appropriate for enhancing recoveries of certain analytes. This data is contained in Sec. 17 of this method. Matrices tested include SRM 2710 (Montana Soil - Highly Elevated Concentrations), SRM 2704 (Buffalo River Sediment), and SRM 1084a (Wear Metals in Oil). Analytes demonstrating better recoveries upon addition of HCl include antimony, iron, and silver. These data are provided for guidance purposes only.

13.3 The following documents may provide additional guidance and insight on this method and technique:

13.3.1 H. M. Kingston and L. B. Jassie, "Safety Guidelines for Microwave Systems in the Analytical Laboratory," in Introduction to Microwave Acid Decomposition: Theory and Practice, Kingston, H.M. and Jassie, L.B., eds., ACS Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.

13.3.2 1985 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.01; "Standard Specification for Reagent Water," ASTM, Philadelphia, PA, 1985, D1193-77.

13.3.3 Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice, Kingston, H. M. and Jassie, L. B., Eds., ACS Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.

13.3.4 H. M. Kingston and P. J. Walter, "Comparison of Microwave Versus Conventional Dissolution for Environmental Applications," *Spectroscopy*, Vol. 7 No. 9, 20-27, 1992.

13.3.5 P. J. Walter, Special Publication IR4718: Microwave Calibration Program, 2.0 ed., National Institutes of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 1991.

13.3.6 H. M. Kingston, P. J. Walter, S. J. Chalk, E. M. Lorentzen, D. D. Link, "Environmental Microwave Sample Preparation: Fundamentals, Methods, and Applications," in Microwave Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications, ACS Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, DC 1997.

14.0 POLLUTION PREVENTION

14.1 Pollution prevention encompasses any technique that reduces or eliminates the quantity or toxicity of waste at the point of generation. Numerous opportunities for pollution prevention exist in laboratory operations. The EPA has established a preferred hierarchy of environmental management techniques that places pollution prevention as the management option of first choice. Whenever feasible, laboratory personnel should use pollution prevention techniques to address their waste generation. When wastes cannot be feasibly reduced at the source, the Agency recommends recycling as the next best option.

14.2 For information about pollution prevention that may be applicable to laboratories and research institutions consult *Less is Better: Laboratory Chemical Management for Waste Reduction* available from the American Chemical Society's Department of Government Relations and Science Policy, 1155 16th Street, NW, Washington, DC 20036, <http://www.acs.org>.

15.0 WASTE MANAGEMENT

The Environmental Protection Agency requires that laboratory waste management practices be consistent with all applicable rules and regulations. The Agency urges laboratories to protect the air, water, and land by minimizing and controlling all releases from hoods and bench operations, complying with the letter and spirit of any sewer discharge permits and regulations, and by complying with all solid and hazardous waste regulations, particularly the hazardous waste identification rules and land disposal restrictions. For further information on waste management, consult The Waste Management Manual for Laboratory Personnel, available from the American Chemical Society's Department of Government Relations and Science Policy, 1155 16th Street, NW, Washington, DC 20036, (202) 872-4477.

16.0 REFERENCES

1. H. M. Kingston, EPA IAG #DWI-393254-01-0 January 1 - March 31, 1988, quarterly report.
2. D. A. Binstock, W. M. Yeager, P. M. Grohse and A. Gaskill, "Validation of a Method for Determining Elements in Solid Waste by Microwave Digestion," Research Triangle Institute Technical Report Draft, RTI Project Number 321U-3579-24, November, 1989, prepared for the Office of Solid Waste, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460.
3. H. M. Kingston, S. Haswell, Microwave Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications, ACS Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, DC 1997.
4. D. A. Binstock, P. M. Grohse, A. Gaskill, C. Sellers, H. M. Kingston, L. B. Jassie, "Development and Validation of a Method for Determining Elements in Solid Waste Using Microwave Digestion," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 74, 360 - 366, 1991.
5. H. M. Kingston, P. J. Walter, E. M., L. Lorentzen, G. P. Lusnak, "The Performance of Leaching Studies on Soil SRM's 2710 and 2711," Final Report to the National Institute of Standards and Technology, Duquesne University, Pittsburgh, PA, April 5, 1994.
6. D. D. Link, H. M. Kingston, P. J. Walter, "Development and Validation of the New EPA Microwave-assisted Leach Method 3051A," *Environmental Science and Technology*, Vol. 32, p. 3628-3632, 1998.
7. D. D. Link, H. M. Kingston, P. J. Walter, "Development and Validation of the EPA Microwave-assisted Methods 3015A and 3051A: Validation Studies for Updated Microwave Leach Methods," Proceedings for the Waste Testing and Quality Assurance Symposium, July 1997.
8. H. M. Kingston, P. J. Walter, "Comparison of Microwave verses Conventional Dissolution for Environmental Applications," *Spectroscopy*, Vol. 7 No. 9, 20-27, 1992.

17.0 TABLES, DIAGRAMS, FLOWCHARTS, AND VALIDATION DATA

The following pages contain the tables and figures referenced by this method.

TABLE 1
COMPARISON OF ANALYTE RECOVERIES FROM SRM 2704 (BUFFALO RIVER
SEDIMENT)
USING BOTH DIGEST OPTIONS

Element	10 mL HNO ₃ digest	9 mL HNO ₃ + 3 mL HCl digest	Total Analyte Concentration
Cd	3.40 ± 0.34	3.62 ± 0.17	3.45 ± 0.22
Cr	84.7 ± 5.6	77.1 ± 12.6	135 ± 5
Ni	45.5 ± 5.9	42.2 ± 3.2	44.1 ± 3.0
Pb	163 ± 9	161 ± 17	161 ± 17

Elemental analysis was performed using either FAAS or ICP-MS.
Results reported in µg/g analyte (mean ± 95% confidence limit).
Total concentrations are taken from NIST SRM Certificate of Analysis.
These data are provided for guidance purposes only.
Data taken from Refs. 6 and 7.

TABLE 2
COMPARISON OF ANALYTE RECOVERIES FROM SRM 4355 (PERUVIAN SOIL)
USING BOTH DIGEST OPTIONS

Element	10 mL HNO ₃ digest	9 mL HNO ₃ + 3 mL HCl digest	Total Analyte Concentration
Cd	0.86 ± 0.16	0.85 ± 0.17	(1.50)
Cr	14.6 ± 0.47	19.0 ± 0.69	28.9 ± 2.8
Ni	9.9 ± 0.33	11.2 ± 0.44	(13)
Pb	124 ± 5.3	130 ± 3.6	129 ± 26

Elemental analysis was performed using either FAAS or ICP-MS.
Results reported in µg/g analyte (mean ± 95% confidence limit).
Total concentrations are taken from NIST SRM Certificate of Analysis.
Values in parenthesis are reference concentrations.
These data are provided for guidance purposes only.
Data taken from Refs. 6 and 7.

TABLE 3

COMPARISON OF ANALYTE RECOVERIES FROM SRM 1084a (WEAR METALS IN OIL)
USING BOTH DIGEST OPTIONS

Element	10 mL HNO ₃ digest	9 mL HNO ₃ + 3 mL HCl digest	Total Analyte Concentration
Cu	91.6 ± 4.0	93.0 ± 2.6	100.0 ± 1.9
Cr	91.2 ± 3.3	94.3 ± 3.1	98.3 ± 0.8
Mg	93.2 ± 3.6	93.5 ± 2.8	99.5 ± 1.7
Ni	91.6 ± 3.9	92.9 ± 3.4	99.7 ± 1.6
Pb	104 ± 4.1	99.5 ± 5.1	101.1 ± 1.3

Elemental analysis was performed using either FAAS or ICP-MS.

Results reported in µg/g analyte (mean ± 95% confidence limit).

Total concentrations are taken from NIST SRM Certificate of Analysis.

These data are provided for guidance purposes only.

Data taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 1

PRESSURE PROFILES FOR THE HEATING OF DIFFERENT RATIOS
OF NITRIC ACID TO HYDROCHLORIC ACID

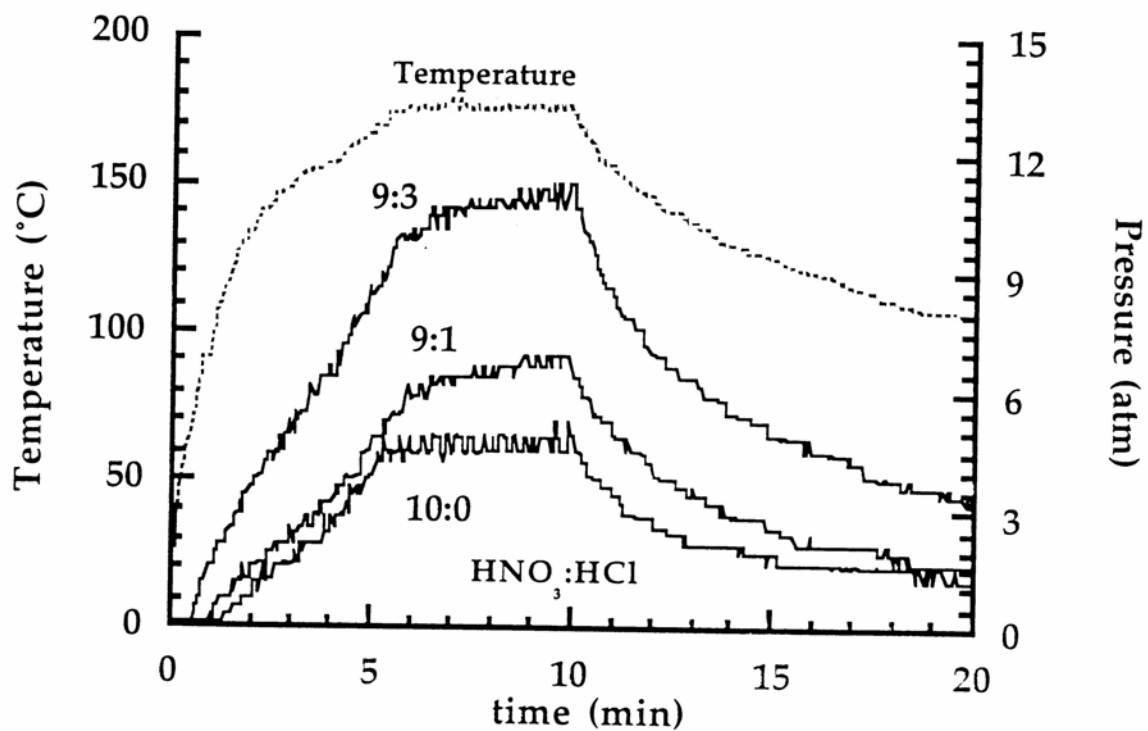


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 2

TEMPERATURE AND PRESSURE PROFILE
FOR NIST SRM 2704 (BUFFALO RIVER SEDIMENT)
USING DIFFERENT RATIOS OF NITRIC ACID TO HYDROCHLORIC ACID

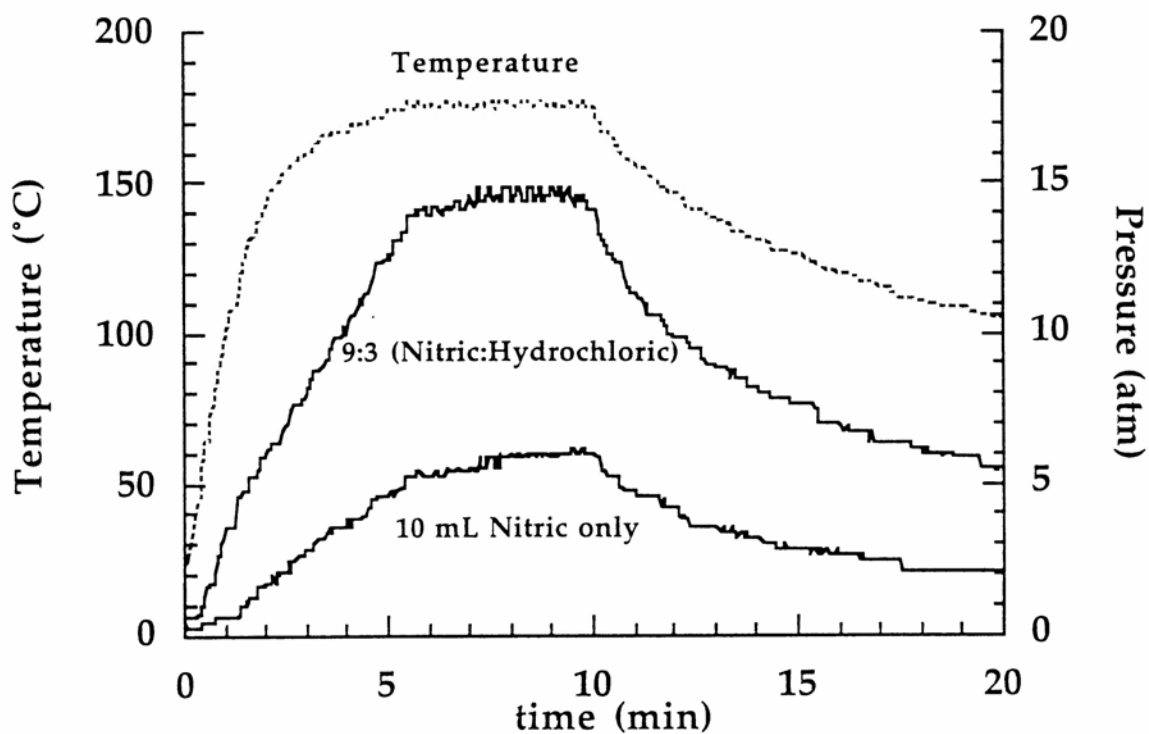


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 3

PERCENT RECOVERY OF ANTIMONY FROM NIST SRM 2710 (MONTANA SOIL) VERSUS
VARIOUS COMBINATIONS OF NITRIC AND HYDROCHLORIC ACIDS (N=6)

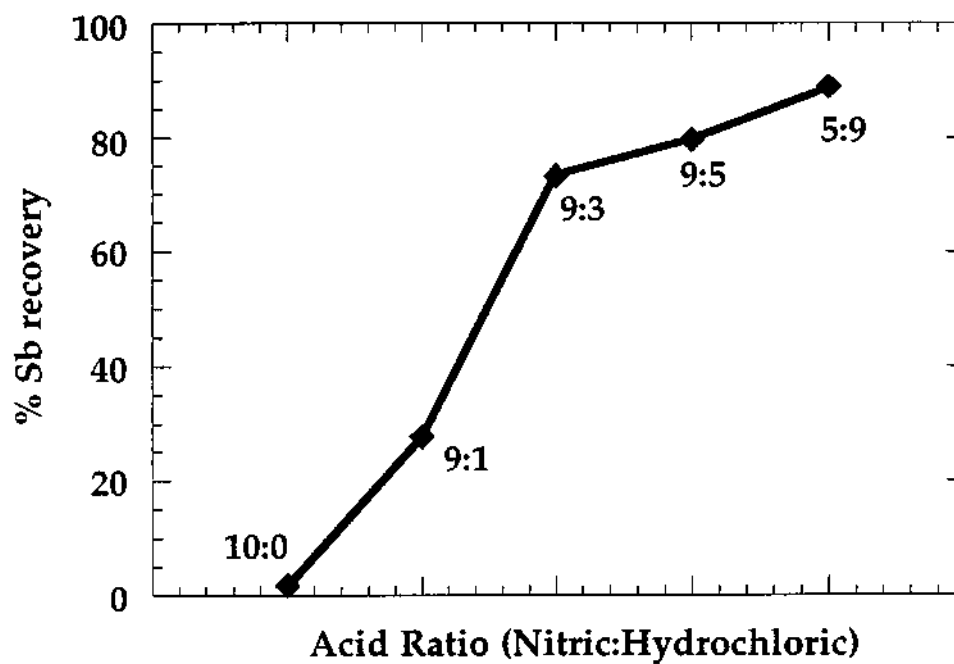


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 4

PERCENT RECOVERY OF ANTIMONY FROM NIST SRM 2704 (BUFFALO RIVER SEDIMENT)
VERSUS VARIOUS COMBINATIONS OF NITRIC AND HYDROCHLORIC ACIDS(N=6)

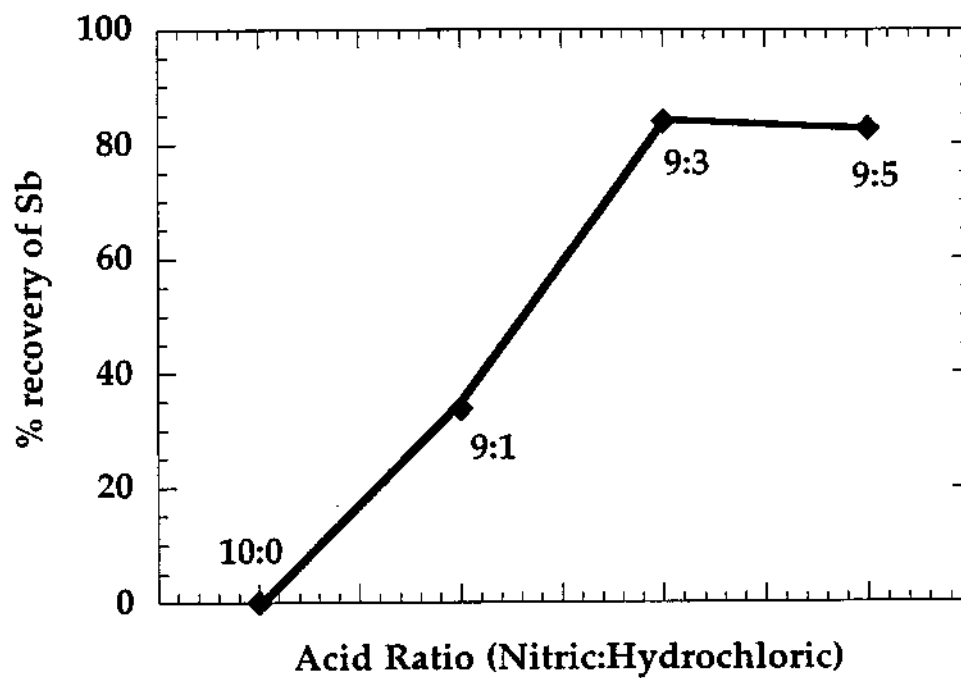


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 5

PERCENT RECOVERY OF IRON FROM NIST SRM 2704 (BUFFALO RIVER SEDIMENT)
VERSUS VARIOUS COMBINATIONS OF NITRIC AND HYDROCHLORIC ACIDS (N=6)

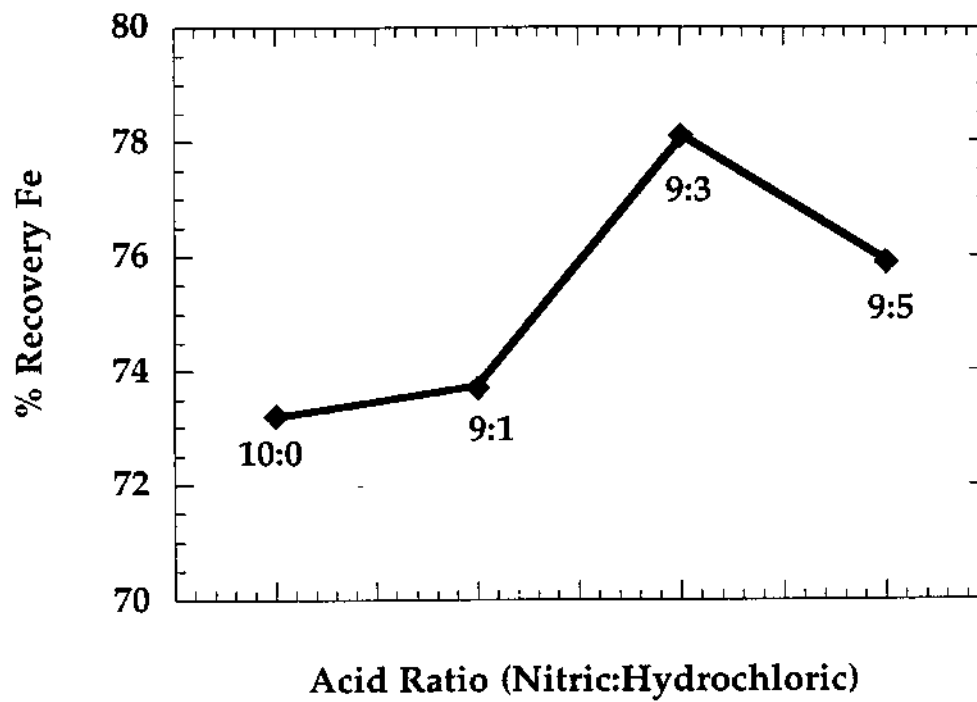


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 6

PERCENT RECOVERY OF SILVER FROM NIST SRM 2710 (MONTANA SOIL) VERSUS
VARIOUS COMBINATIONS OF NITRIC AND HYDROCHLORIC ACIDS (N=6)

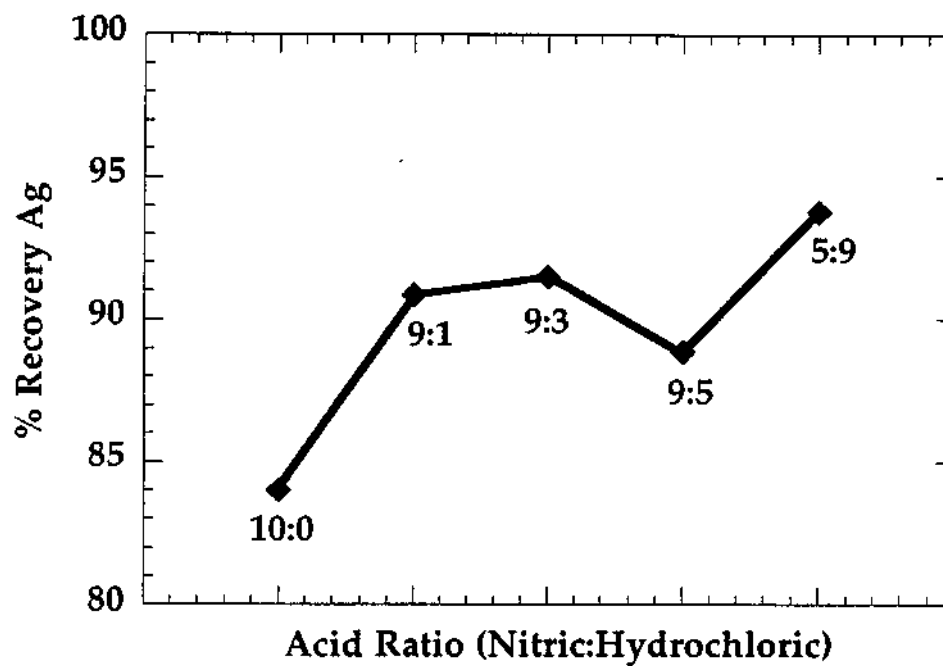


Figure taken from Refs. 6 and 7.

FIGURE 7

PERCENT RECOVERY OF ANTIMONY AND IRON, RESPECTIVELY, FROM SRM 4355
(PERUVIAN SOIL) USING BOTH DIGEST OPTIONS
(10 ML HNO_3 AND 9 ML HNO_3 + 3 ML HCL) (N=6)

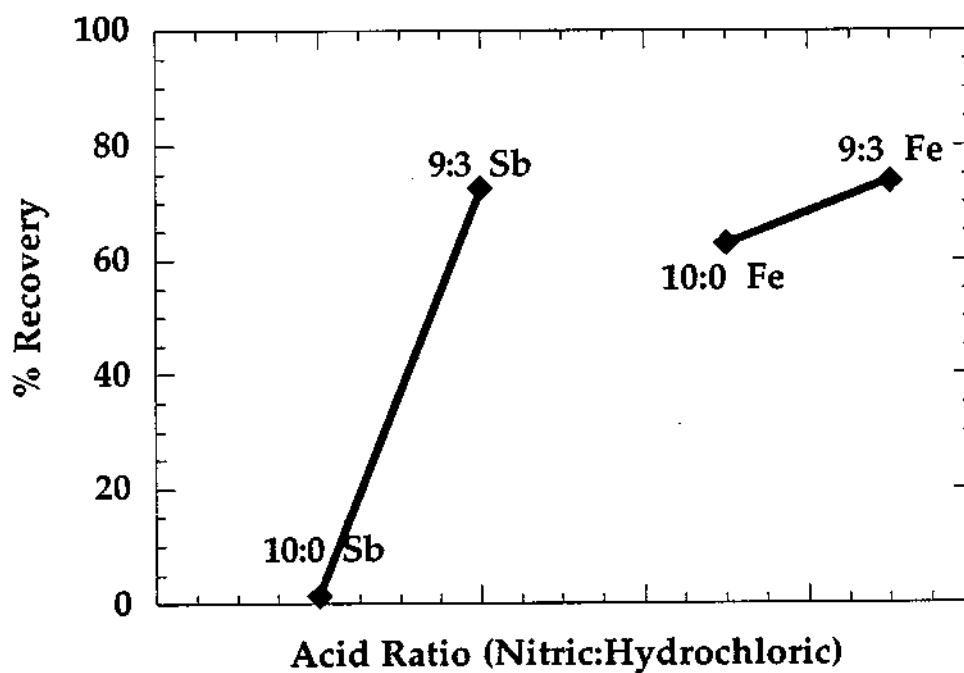
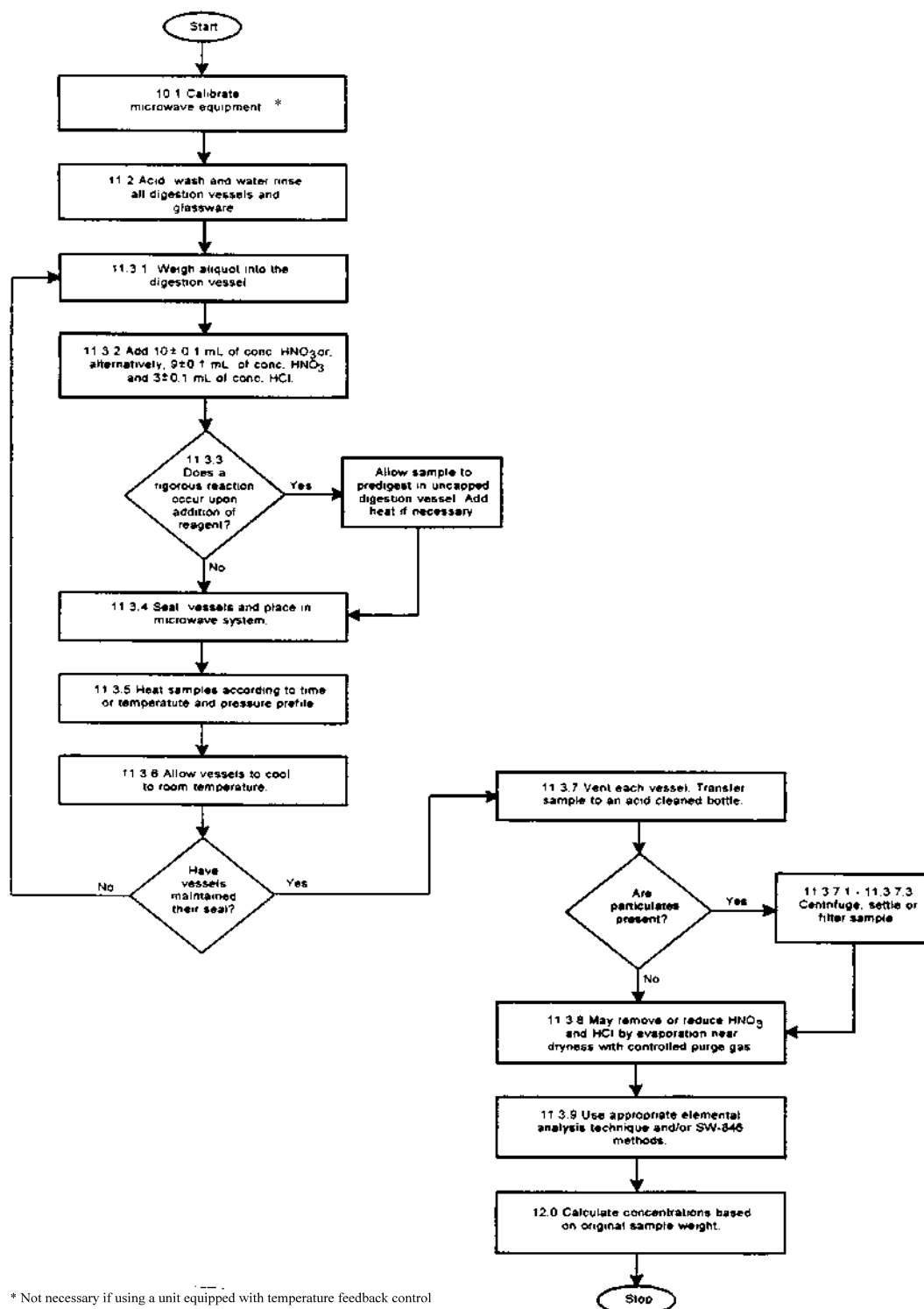


Figure taken from Refs. 6 and 7.

METHOD 3051A

MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS



METHOD 3052

MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This method is applicable to the microwave assisted acid digestion of siliceous matrices, and organic matrices and other complex matrices. If a total decomposition analysis (relative to the target analyte list) is required, the following matrices can be digested: ashes, biological tissues, oils, oil contaminated soils, sediments, sludges, and soils. This method is applicable for the following elements:

Aluminum	Cadmium	Iron	Molybdenum	Sodium
Antimony	Calcium	Lead	Nickel	Strontium
Arsenic	Chromium	Magnesium	Potassium	Thallium
Boron	Cobalt	Manganese	Selenium	Vanadium
Barium	Copper	Mercury	Silver	Zinc
Beryllium				

Other elements and matrices may be analyzed by this method if performance is demonstrated for the analyte of interest, in the matrices of interest, at the concentration levels of interest (see Sec. 8.0).

Note: This technique is not appropriate for regulatory applications that require the use of leachate preparations (i.e., Method 3050, Method 3051, Method 1311, Method 1312, Method 1310, Method 1320, Method 1330, Method 3031, Method 3040). This method is appropriate for those applications requiring a total decomposition for research purposes (i.e., geological studies, mass balances, analysis of Standard Reference Materials) or in response to a regulation that requires total sample decomposition.

1.2 This method is provided as a rapid multi-element, microwave assisted acid digestion prior to analysis protocol so that decisions can be made about the site or material. Digests and alternative procedures produced by the method are suitable for analysis by flame atomic absorption spectrometry (FLAA), cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAA), graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAA), inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and other analytical elemental analysis techniques where applicable. Due to the rapid advances in microwave technology, consult your manufacturer's recommended instructions for guidance on their microwave digestion system and refer to this manual's "Disclaimer" when conducting analyses using Method 3052.

1.3 The goal of this method is total sample decomposition and with judicious choice of acid combinations this is achievable for most matrices (see Sec. 3.2). Selection of reagents which give the highest recoveries for the target analytes is considered the optimum method condition.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 A representative sample of up to 0.5 g is digested in 9 mL of concentrated nitric acid and usually 3 mL hydrofluoric acid for 15 minutes using microwave heating with a suitable laboratory microwave system. The method has several additional alternative acid and reagent combinations including hydrochloric acid and hydrogen peroxide. The method has provisions for scaling up the sample size to a maximum of 1.0 g. The sample and acid are placed in suitably inert polymeric microwave vessels. The vessel is sealed and heated in the microwave system. The temperature profile is specified to permit specific reactions and incorporates reaching 180 ± 5 °C in approximately less than 5.5 minutes and remaining at 180 ± 5 °C for 9.5 minutes for the completion of specific reactions (Ref. 1, 2, 3, 4). After cooling, the vessel contents may be filtered, centrifuged, or allowed to settle and then decanted, diluted to volume, and analyzed by the appropriate SW-846 method.

3.0 INTERFERENCES

3.1 Gaseous digestion reaction products, very reactive, or volatile materials that may create high pressures when heated and may cause venting of the vessels with potential loss of sample and analytes. The complete decomposition of either carbonates, or carbon based samples, may cause enough pressure to vent the vessel if the sample size is greater than 0.25 g. Variations of the method due to very reactive materials are specifically addressed in sections 7.3.4 and 7.3.6.1.

3.2 Most samples will be totally dissolved by this method with judicious choice of the acid combinations. A few refractory sample matrix compounds, such as TiO_2 , alumina, and other oxides may not be totally dissolved and in some cases may sequester target analyte elements.

3.3 The use of several digestion reagents that are necessary to either completely decompose the matrix or to stabilize specific elements may limit the use of specific analytical instrumentation methods. Hydrochloric acid is known to interfere with some instrumental analysis methods such as flame atomic absorption (FLAA) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). The presence of hydrochloric acid may be problematic for graphite furnace atomic absorption (GFAA) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Hydrofluoric acid, which is capable of dissolving silicates, may require the removal of excess hydrofluoric acid or the use of specialized non-glass components during instrumental analysis. Method 3052 enables the analyst to select other decomposition reagents that may also cause problems with instrumental analyses necessitating matrix matching of standards to account for viscosity and chemical differences.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Microwave apparatus requirements.

4.1.1 The temperature performance requirements necessitate the microwave decomposition system sense the temperature to within ± 2.5 °C and automatically adjust the microwave field output power within 2 seconds of sensing. Temperature sensors should be accurate to ± 2 °C (including the final reaction temperature of 180 °C). Temperature feedback control provides the primary control performance mechanism for the method. Due to the flexibility in the reagents used to achieve total analysis, temperature feedback control is necessary for reproducible microwave heating.

Alternatively, for a specific set of reagent(s) combination(s), quantity, and specific vessel type, a calibration control mechanism can be developed similar to previous microwave methods (see Method 3051). Through calibration of the microwave power, vessel load and heat loss, the reaction temperature profile described in Section 7.3.6 can be reproduced. The calibration settings are specific for the number and type of vessel used and for the microwave system in addition to the variation in reagent combinations. Therefore no specific calibration settings are provided in this method. These settings may be developed by using temperature monitoring equipment for each specific set of equipment and reagent combination. They may only be used if not altered as previously described in other methods such as 3051 and 3015. In this circumstance, the microwave system provides programmable power which can be programmed to within ± 12 W of the required power. Typical systems provide a nominal 600 W to 1200 W of power (Ref. 1, 2, 5). Calibration control provides backward compatibility with older laboratory microwave systems without temperature monitoring or feedback control and with lower cost microwave systems for some repetitive analyses. Older lower pressure vessels may not be compatible.

4.1.2 The temperature measurement system should be periodically calibrated at an elevated temperature. Pour silicon oil (a high temperature oil into a beaker and adequately stirred to ensure a homogeneous temperature. Place the microwave temperature sensor and a calibrated external temperature measurement sensor into the beaker. Heat the beaker to a constant temperature of $180 \pm 5^\circ\text{C}$. Measure the temperature with both sensors. If the measured temperatures vary by more than $1 - 2^\circ\text{C}$, the microwave temperature measurement system needs to be calibrated. Consult the microwave manufacturer's instructions about the specific temperature sensor calibration procedure.

CAUTION: The use of microwave equipment with temperature feedback control is required to control the unfamiliar reactions of unique or untested reagent combinations of unknown samples. These tests may require additional vessel requirements such as increased pressure capabilities.

4.1.3 The microwave unit cavity is corrosion resistant and well ventilated. All electronics are protected against corrosion for safe operation.

CAUTION: There are many safety and operational recommendations specific to the model and manufacturer of the microwave equipment used in individual laboratories. A listing of these specific suggestions is beyond the scope of this method and require the analyst to consult the specific equipment manual, manufacturer, and literature for proper and safe operation of the microwave equipment and vessels.

4.1.4 The method requires essentially microwave transparent and reagent resistant suitably inert polymeric materials (examples are PFA or TFM suitably inert polymeric polymers) to contain acids and samples. For higher pressure capabilities the vessel may be contained within layers of different microwave transparent materials for strength, durability, and safety. The vessels internal volume should be at least 45 mL, capable of withstanding pressures of at least 30 atm (30 bar or 435 psi), and capable of controlled pressure relief. These specifications are to provide an appropriate, safe, and durable reaction vessel of which there are many adequate designs by many suppliers.

CAUTION: The outer layers of vessels are frequently not as acid or reagent resistant as the liner material and must not be chemically degraded or physically damaged to retain the performance and safety required. Routine examination of the vessel materials may be required to ensure their safe use.

CAUTION: The second safety concern relates to the use of sealed containers without pressure relief devices. Temperature is the important variable controlling the reaction. Pressure is needed to attain elevated temperatures, but must be safely contained. However, many digestion vessels constructed from certain suitably inert polymerics may crack, burst, or explode in the unit under certain pressures. Only suitably inert polymeric (such as PFA or TFM and others) containers with pressure relief mechanisms or containers with suitably inert polymeric liners and pressure relief mechanisms are considered acceptable.

Users are therefore advised not to use domestic (kitchen) type microwave ovens or to use inappropriate sealed containers without pressure relief for microwave acid digestions by this method. Use of laboratory-grade microwave equipment is required to prevent safety hazards. For further details, consult Reference 3 and 6.

4.1.5 A rotating turntable is employed to insure homogeneous distribution of microwave radiation within most systems (Ref. 1). The speed of the turntable should be a minimum of 3 rpm.

CAUTION: Laboratories should not use domestic (kitchen) type microwave ovens for this method. There are several significant safety issues. First, when an acid such as nitric is used to effect sample digestion in microwave units in open vessel(s), or sealed vessels equipment, there is the potential for the acid gas vapor released to corrode the safety devices that prevent the microwave magnetron from shutting off when the door is opened. This can result in operator exposure to microwave energy. Use of a system with isolated and corrosion resistant safety devices prevents this from occurring.

4.2 Volumetric ware, volumetric flasks, and graduated cylinders, 50 and 100 mL capacity or equivalent.

4.3 Filter paper, qualitative or equivalent.

4.4 Filter funnel, polypropylene, polyethylene or equivalent.

4.5 Analytical balance, of appropriate capacity, with a ± 0.0001 g or appropriate precision for the weighing of the sample. Optionally, the vessel with sample and reagents may be weighed, with an appropriate precision balance, before and after microwave processing to evaluate the seal integrity in some vessel types.

5.0 REAGENTS

5.1 All reagents should be of appropriate purity or high purity (acids for example, should be sub-boiling distilled where possible) to minimize the blank levels due to elemental contamination. All references to water in the method refer to reagent water (Ref. 7). Other reagent grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficient purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination. If the purity of a reagent is questionable, analyze the reagent to determine the level of impurities. The reagent blank must be less than the MDL in order to be used.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

6.1 All samples must have been collected using a sampling plan that addresses the considerations discussed in Chapter Nine of this manual.

6.2 All sample containers must be prewashed with detergents, acids, and water. Plastic and glass containers are both suitable. See Chapter Three, Sec. 3.1.3 of this manual, for further information.

6.3 Refer to Chapter Three for the appropriate holding times and storage conditions.

7.0 PROCEDURE

7.1 Temperature control of closed vessel microwave instruments provides the main feedback control performance mechanism for the method. Control requires a temperature sensor in one or more vessels during the entire decomposition. The microwave decomposition system should sense the temperature to within ± 2.5 °C and permit adjustment of the microwave output power within 2 seconds.

7.2 All digestion vessels and volumetric ware must be carefully acid washed and rinsed with reagent water. When switching between high concentration samples and low concentration samples, all digestion vessels (fluoropolymer liners only) should be cleaned by leaching with hot (1:1) hydrochloric acid (greater than 80°C, but less than boiling) for a minimum of two hours followed with hot (1:1) nitric acid (greater than 80°C, but less than boiling) for a minimum of two hours and rinsed with reagent water and dried in a clean environment. This cleaning procedure should also be used whenever the prior use of the digestion vessels is unknown or cross contamination from vessels is suspected. Polymeric or glass volumetric ware (not used with HF) and storage containers should be cleaned by leaching with more dilute acids (approximately 10% V/V) appropriate for the specific plastics used and then rinsed with reagent water and dried in a clean environment. To avoid precipitation of silver, ensure that all HCl has been rinsed from the vessels.

7.3 Sample Digestion

7.3.1 Weigh a well-mixed sample to the nearest 0.001 g into an appropriate vessel equipped with a pressure relief mechanism. For soils, ash, sediments, sludges, and siliceous wastes, initially use no more than 0.5 g. For oil or oil contaminated soils, initially use no more than 0.25 g.

7.3.2 Add 9 ± 0.1 mL concentrated nitric acid and 3 ± 0.1 mL concentrated hydrofluoric acid to the vessel in a fume hood. If the approximate silicon dioxide content of the sample is known, the quantity of hydrofluoric acid may be varied from 0 to 5 mL for stoichiometric reasons. Samples with higher concentrations of silicon dioxide ($> 70\%$) may require higher concentrations of hydrofluoric acid (> 3 mL HF). Alternatively samples with lower concentrations of silicon dioxide ($< 10\%$ to 0%) may require much less hydrofluoric acid (0.5 mL to 0 mL). Examples are presented in Table 1, 2, 3, and 6. Acid digestion reagent combinations used in the analysis of several matrices, listed in Table 7, provide guidance for the development of new matrix decomposition procedures.

7.3.3 The addition of other reagents with the original acids prior to digestion may permit more complete oxidation of organic sample constituents, address specific decomposition chemistry requirements, or address specific elemental stability and solubility problems.

The addition of 2 ± 2 mL concentrated hydrochloric acid to the nitric and hydrofluoric acids is appropriate for the stabilization of Ag, Ba, and Sb and high concentrations of Fe and Al in solution. The amount of HCl needed will vary depending on the matrix and the concentration of the analytes. The addition of hydrochloric acid may, however, limit the techniques or increase the difficulties of analysis. Examples are presented in Table 4.

The addition of hydrogen peroxide (30%) in small or catalytic quantities (such as 0.1 to 2 mL) may aid in the complete oxidation of organic matter.

The addition of water (double deionized) may (0 to 5 mL) improve the solubility of minerals and prevent temperature spikes due to exothermic reactions.

NOTE: Supporting documentation for the chemistry of this method has been prepared in chapters 2 and 3 of reference 3. It provides additional guidance and documentation of appropriate reagent, matrix and analyte combinations that can be employed in this method.

CAUTION: Only one acid mixture or quantity may be used in a single batch in the microwave to insure consistent reaction conditions between all vessels and monitored conditions. This limitation is due to the current practice of monitoring a representative vessel and applying a uniform microwave field to reproduce these reaction conditions within a group of vessels being simultaneously heated.

CAUTION: Toxic nitrogen oxide(s), hydrogen fluoride, and toxic chlorine (from the addition of hydrochloric acid) fumes are usually produced during digestion. Therefore, all steps involving open or the opening of microwave vessels must be performed in a properly operating fume ventilation system.

CAUTION: The analyst should wear protective gloves and face protection and must not at any time permit a solution containing hydrofluoric acid to come in contact with skin or lungs.

CAUTION: The addition of hydrochloric acid must be from concentrated hydrochloric acid and not from a premixed combination of acids as a buildup of toxic chlorine and possibly other gases will result from a premixed acid solution. This will over pressurize the vessel due to the release of these gases from solution upon heating. The gas effect is greatly lessened by following this suggestion.

CAUTION: When digesting samples containing volatile or easily oxidized organic compounds, initially weigh no more than 0.10 g and observe the reaction before capping the vessel. If a vigorous reaction occurs, allow the reaction to cease before capping the vessel. If no appreciable reaction occurs, a sample weight up to 0.25 g can be used.

CAUTION: The addition of hydrogen peroxide should only be done when the reactive components of the sample are known. Hydrogen peroxide may react rapidly and violently on easily oxidizable materials and should not be added if the sample may contain large quantities of easily oxidizable organic constituents.

7.3.4 The analyst should be aware of the potential for a vigorous reaction. If a vigorous reaction occurs upon the initial addition of reagent or the sample is suspected of containing easily oxidizable materials, allow the sample to predigest in the uncapped digestion vessel. Heat may be added in this step for safety considerations (for example the rapid release of carbon dioxide from carbonates, easily oxidized organic matter, etc.). Once the initial reaction has ceased, the sample may continue through the digestion procedure.

7.3.5 Seal the vessel according to the manufacturer's directions. Properly place the vessel in the microwave system according to the manufacturer's recommended specifications and connect appropriate temperature and pressure sensors to vessels according to manufacturer's specifications.

7.3.6 This method is a performance based method, designed to achieve or approach total decomposition of the sample through achieving specific reaction conditions. The temperature of each sample should rise to 180 ± 5 °C in approximately 5.5 minutes and remain at 180 ± 5 °C for 9.5 minutes. The temperature-time and pressure-time profile are given for a standard soil sample in Figure 1. The number of samples simultaneously digested is dependent on the analyst. The number may range from 1 to the maximum number of vessels that the microwave units magnetron can heat according to the manufacturer's or literature specifications (the number will depend on the power of the unit, the quantity and combination of reagents, and the heat loss from the vessels).

The pressure should peak between 5 and 15 minutes for most samples (Ref. 2, 3, 5). If the pressure exceeds the pressure limits of the vessel, the pressure will be reduced by the relief mechanism of the vessel.

The total decomposition of some components of a matrix may require or the reaction kinetics are dramatically improved with higher reaction temperatures. If microwave digestion systems and/or vessels are capable of achieving higher temperatures and pressures, the minimum digestion time of 9.5 minutes at a temperature of at least 180 ± 5 °C is an appropriate

alternative. This change will permit the use of pressure systems if the analysis verifies that 180°C is the minimum temperature maintained by these control systems.

7.3.6.1 For reactive substances, the heating profile may be altered for safety purposes. The decomposition is primarily controlled by maintaining the reagents at $180 \pm 5^\circ\text{C}$ for 9.5 minutes, therefore the time it takes to heat the samples to $180 \pm 5^\circ\text{C}$ is not critical. The samples may be heated at a slower rate to prevent potential uncontrollable exothermic reactions. The time to reach $180 \pm 5^\circ\text{C}$ may be increased to 10 minutes provided that $180 \pm 5^\circ\text{C}$ is subsequently maintained for 9.5 minutes. Decomposition profiles are presented in Figures 1 and 2. The extreme difference in pressure is due to the gaseous digestion products.

7.3.6.2 Calibration control is applicable in reproducing this method provided the power in watts versus time parameters are determined to reproduce the specifications listed in 7.3.6. The calibration settings will be specific to the quantity and combination of reagents, quantity of vessels, and heat loss characteristics of the vessels (Ref 1). If calibration control is being used, any vessels containing acids for analytical blank purposes are counted as sample vessels and when fewer than the recommended number of samples are to be digested, the remaining vessels should be filled with the same acid mixture to achieve the full complement of vessels. This provides an energy balance, since the microwave power absorbed is proportional to the total absorbed mass in the cavity (Ref. 1). Irradiate each group of vessels using the predetermined calibration settings. (Different vessel types should not be mixed).

7.3.6.3 Pressure control for a specific matrix is applicable if instrument conditions are established using temperature control. Because each matrix will have a different reaction profile, performance using temperature control must be developed for every specific matrix type prior to use of the pressure control system.

7.3.7 At the end of the microwave program, allow the vessels to cool for a minimum of 5 minutes before removing them from the microwave system. When the vessels have cooled to near room temperature, determine if the microwave vessels have maintained a seal throughout the digestion. Due to the wide variability of vessel designs, a single procedure is not appropriate. For vessels that are sealed as discrete separate entities, the vessel weight may be taken before and after digestion to evaluate seal integrity. If the weight loss of sample exceeds 1% of the weight of the sample and reagents, then the sample is considered compromised. For vessels with burst disks, a careful visual inspection of the disk may identify compromised vessels. For vessels with resealing pressure relief mechanisms, an auditory or sometimes a physical sign indicates a vessel has vented.

7.3.8 Complete the preparation of the sample by carefully uncapping and venting each vessel in a fume hood. Vent the vessels using the procedure recommended by the vessel manufacturer. Transfer the sample to an acid-cleaned bottle. If the digested sample contains particulates which may clog nebulizers or interfere with injection of the sample into the instrument, the sample may be centrifuged, allowed to settle, or filtered.

7.3.8.1 Centrifugation: Centrifugation at 2,000 - 3,000 rpm for 10 minutes is usually sufficient to clear the supernatant.

7.3.8.2 Settling: If undissolved material remains such as TiO_2 , or other refractory oxides, allow the sample to stand until the supernatant is clear. Allowing a sample to stand overnight will usually accomplish this. If it does not, centrifuge or filter the sample.

7.3.8.3 Filtering: If necessary, the filtering apparatus must be thoroughly cleaned and prerinsed with dilute (approximately 10% V/V) nitric acid. Filter the sample through qualitative filter paper into a second acid-cleaned container.

7.3.9 If the hydrofluoric acid concentration is a consideration in the analysis technique such as with ICP methods, boric acid may be added to permit the complexation of fluoride to protect the quartz plasma torch. The amount of acid added may be varied, depending on the equipment and the analysis procedure. If this option is used, alterations in the measurement procedure to adjust for the boric acid and any bias it may cause are necessary. This addition will prevent the measurement of boron as one of the elemental constituents in the sample. Alternatively, a hydrofluoric acid resistant ICP torch may be used and the addition of boric acid would be unnecessary for this analytical configuration. All major manufacturers have hydrofluoric resistant components available for the analysis of solutions containing hydrofluoric acid.

CAUTION: The traditional use of concentrated solutions of boric acid can cause problems by turning the digestion solution cloudy or result in a high salt content solution interfering with some analysis techniques. Dilute solutions of boric acid or other methods of neutralization or reagent elimination are appropriate to avoid problems with HF and the glass sample introduction devices of analytical instrumentation. Gentle heating often serves to clear cloudy solutions. Matrix matching of samples and standards will eliminate viscosity differences.

7.3.10 The removal or reduction of the quantity of the hydrochloric and hydrofluoric acids prior to analysis may be desirable. The chemistry and volatility of the analytes of interest should be considered and evaluated when using this alternative. Evaporation to near dryness in a controlled environment with controlled pure gas and neutralizing and collection of exhaust interactions is an alternative where appropriate. This manipulation may be performed in the microwave system, if the system is capable of this function, or external to the microwave system in more common apparatus(s). This option must be tested and validated to determine analyte retention and loss and should be accompanied by equipment validation possibly using the standard addition method and standard reference materials. This alternative may be used to alter either the acid concentration and/or acid composition. Note: The final solution typically requires nitric acid to maintain appropriate sample solution acidity and stability of the elements. Commonly, a 2% (v/v) nitric acid concentration is desirable. Examples of analysis performed with and without removal of the hydrofluoric acid are presented in Table 5. Waste minimization techniques should be used to capture reagent

fumes. This procedure should be tested and validated in the apparatus and on standards before using on unknown samples.

7.3.11 Transfer or decant the sample into volumetric ware and dilute the digest to a known volume. The digest is now ready for analysis for elements of interest using appropriate elemental analysis techniques and/or SW-846 methods.

7.3.12 Sample size may be scaled-up from 0.1, 0.25, or 0.5 g to 1.0 g through a series of 0.2g sample size increments. Scale-up can produce different reaction conditions and/or produce increasing gaseous reaction products. Increases in sample size may not require alteration of the acid quantity or combination, but other reagents may be added to permit a more complete decomposition and oxidation of organic and other sample constituents where necessary (such as increasing the HF for the complete destruction of silicates). Each step of the scale-up must demonstrate safe operation before continuing.

7.4 Calculations: The concentrations determined are to be reported on the basis of the actual weight of the original sample.

7.5 Calibration of Microwave Equipment

NOTE: If the microwave unit uses temperature feedback control to follow performance specifications of the method, then the calibration procedure will not be necessary.

7.5.1 Calibration is the normalization and reproduction of a microwave field strength to permit reagent and energy coupling in a predictable and reproducible manner. It balances reagent heating and heat loss from the vessels and is equipment dependent due to the heat retention and loss characteristics of the specific vessel. Available power is evaluated to permit the microwave field output in watts to be transferred from one microwave system to another.

Use of calibration to control this reaction requires balancing output power, coupled energy, and heat loss to reproduce the temperature heating profile in section 7.3.6. The conditions for each acid mixture and each batch containing the same specified number of vessels must be determined individually. Only identical acid mixtures and vessel models and specified numbers of vessels may be used in a given batch.

7.5.2 For cavity type microwave equipment, this is accomplished by measuring the temperature rise in 1 kg of water exposed to microwave radiation for a fixed period of time. The analyst can relate power in watts to the partial power setting of the system. The calibration format required for laboratory microwave systems depends on the type of electronic system used by the manufacturer to provide partial microwave power. Few systems have an accurate and precise linear relationship between percent power settings and absorbed power. Where linear circuits have been utilized, the calibration curve can be determined by a three-point calibration method (7.5.4), otherwise, the analyst must use the multiple point calibration method (7.5.3).

7.5.3 The multiple point calibration involves the measurement of absorbed power over a large range of power settings. Typically, for a 600 W unit, the following power settings are measured; 100, 99, 98, 97, 95, 90, 80, 70, 60, 50, and 40% using the procedure described in section 7.5.5. This data is clustered about the customary working power ranges. Nonlinearity has been encountered at the upper end of the calibration. If the system's electronics are known to have nonlinear deviations in any region of proportional power control, it will be necessary to make a set of measurements that bracket the power to be used. The final calibration point should be at the partial power setting that will be used in the test. This setting should be checked periodically to evaluate the integrity of the calibration. If a significant change is detected (± 10 W), then the entire calibration should be reevaluated.

7.5.4 The three-point calibration involves the measurement of absorbed power at three different power settings. Measure the power at 100% and 50% using the procedure described in section 7.5.5. From the 2-point line calculate the power setting corresponding to the required power in watts specified in the procedure. Measure the absorbed power at that partial power setting. If the measured absorbed power does not correspond to the specified power within ± 10 W, use the multiple point calibration in 7.5.3. This point should also be used to periodically verify the integrity of the calibration.

7.5.5 Equilibrate a large volume of water to room temperature (23 ± 2 °C). One kg of reagent water is weighed ($1,000.0 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$) into a suitably inert polymeric beaker or a beaker made of some other material that does not significantly absorb microwave energy (glass absorbs microwave energy and is not recommended). The initial temperature of the water should be 23 ± 2 °C measured to ± 0.05 °C. The covered beaker is circulated continuously (in the normal sample path) through the microwave field for 2 minutes at the desired partial power setting with the system's exhaust fan on maximum (as it will be during normal operation). The beaker is removed and the water vigorously stirred. Use a magnetic stirring bar inserted immediately after microwave irradiation and record the maximum temperature within the first 30 seconds to ± 0.05 °C. Use a new sample for each additional measurement. If the water is reused, both the water and the beaker must have returned to 23 ± 2 °C. Three measurements at each power setting should be made.

The absorbed power is determined by the following relationship:

$$\text{Equation 1} \quad P = \frac{K \text{ } C_p \text{ } m \Delta T}{t}$$

Where:

P	=	the apparent power absorbed by the sample in watts (W, W = joule sec ⁻¹)
K	=	the conversion factor for thermochemical calories_sec ⁻¹ to watts (which equals 4.184)
C _p	=	the heat capacity, thermal capacity, or specific heat (cal g ⁻¹ °C ⁻¹) of water

m	=	the mass of the water sample in grams (g)
ΔT	=	the final temperature minus the initial temperature ($^{\circ}\text{C}$)
t	=	the time in seconds (s)

Using the experimental conditions of 2 minutes and 1 kg of distilled water (heat capacity at 25°C is $0.9997 \text{ cal g}^{-1} ^{\circ}\text{C}^{-1}$) the calibration equation simplifies to:

$$P = 34.86 \Delta T$$

NOTE: Stable line voltage is necessary for accurate and reproducible calibration and operation. The line voltage should be within manufacturer's specification, and during measurement and operation should not vary by more than $\pm 5 \text{ V}$. Electronic components in most microwave units are matched to the system's function and output. When any part of the high voltage circuit, power source, or control components in the system have been serviced or replaced, it will be necessary to recheck the system's calibration. If the power output has changed significantly ($\pm 10 \text{ W}$), then the entire calibration should be reevaluated.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 All quality control data must be maintained and available for reference or inspection for a period determined by all involved parties based on program or project requirements. This method is restricted to use by, or under supervision of, experienced analysts. Refer to the appropriate section of Chapter One for additional quality control guidance.

8.2 Duplicate samples should be processed on a routine basis. A duplicate sample is a sample brought through the whole sample preparation and analytical process. A duplicate sample should be processed with each analytical batch or every 20 samples, whichever is the greater number. A duplicate sample should be prepared for each matrix type (i.e., soil, sludge, etc.).

8.3 Spiked samples and/or standard reference materials should be included with each group of samples processed or every 20 samples, whichever is the greater number. A spiked sample should also be included whenever a new sample matrix is being analyzed.

8.4 Blank samples should be prepared using the same reagents and quantities used in sample preparation, placed in vessels of the same type, and processed with the samples.

9.0 METHOD PERFORMANCE

9.1 Precision: Precision data for Method 3052 are presented in the tables of this method. Tables 1 through 6 provide a summary of total elemental analysis.

9.2 The performance criteria are provided as an example in Figure 1. The temperature profile will be within $\pm 5^{\circ}\text{C}$ of the mean of the temperature profile, but the pressure curve will vary depending on the acid mixture and gaseous digestion products and the thermal insulating properties of the vessel. Figure 2 provides criteria for the digestion of an oil sample.

10.0 REFERENCES

1. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice, Kingston, H. M. and Jassie, L. B., Eds.; ACS Professional Reference Book Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1988.
2. Kingston, H. M., Walter, P. J., Comparison of Microwave Versus Conventional Dissolution for Environmental Applications, Spectroscopy, Vol. 7 No. 9, 20-27, 1992.
3. Kingston, H. M., Haswell, S., Microwave Enhanced Chemistry, ACS Professional Reference Book Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1997.
4. Kingston, H. M.; Walter, P. J.; Lorentzen, E. M. L.; Lusnak, G. P. Report to NIST Office of Standard Reference Materials, The Performance of Leaching Studies on Soil SRMs 2710 and 2711, Duquesne University, Pittsburgh, PA, 1994.
5. Kingston, H. M. EPA IAG #DWI-393254-01-0 January 1-March 31, 1988, quarterly Report.
6. Kingston, H. M. and Jassie, L. B., "Safety Guidelines for Microwave Systems in the Analytical Laboratory". In Introduction to Microwave Acid Decomposition: Theory and Practice; Kingston, H. M. and Jassie, L. B., eds.; ACS Professional Reference Book Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1988.
7. 1985 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.01; "Standard Specification for Reagent Water"; ASTM, Philadelphia, PA, 1985, D1193-77.
8. Kingston, H. M.; Walter, P. J.; Link, D. D. Validation Study and Unpublished Data, Duquesne University, Pittsburgh, PA, 1995.

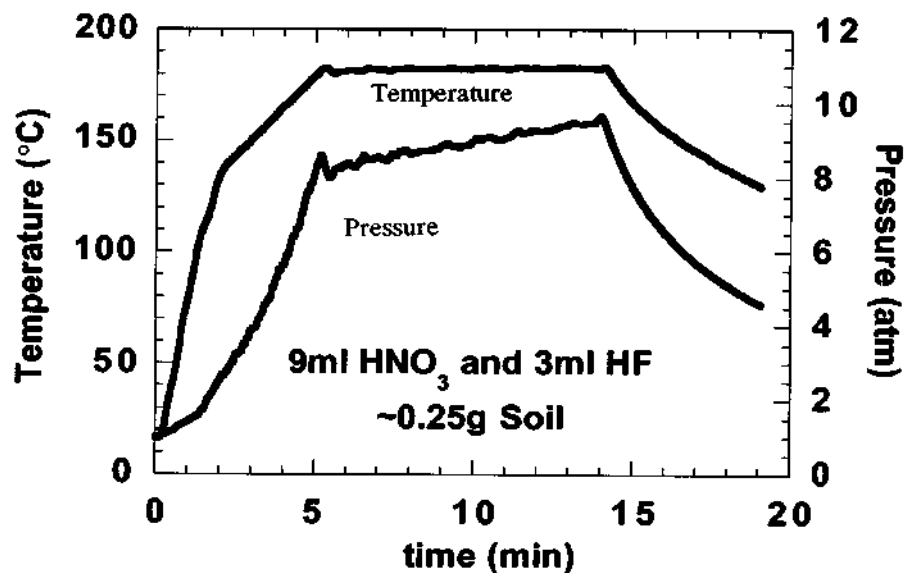


FIGURE 1. TYPICAL REACTION PROFILE FOR THE DIGESTION OF A SOIL (REF. 4 AND 8)

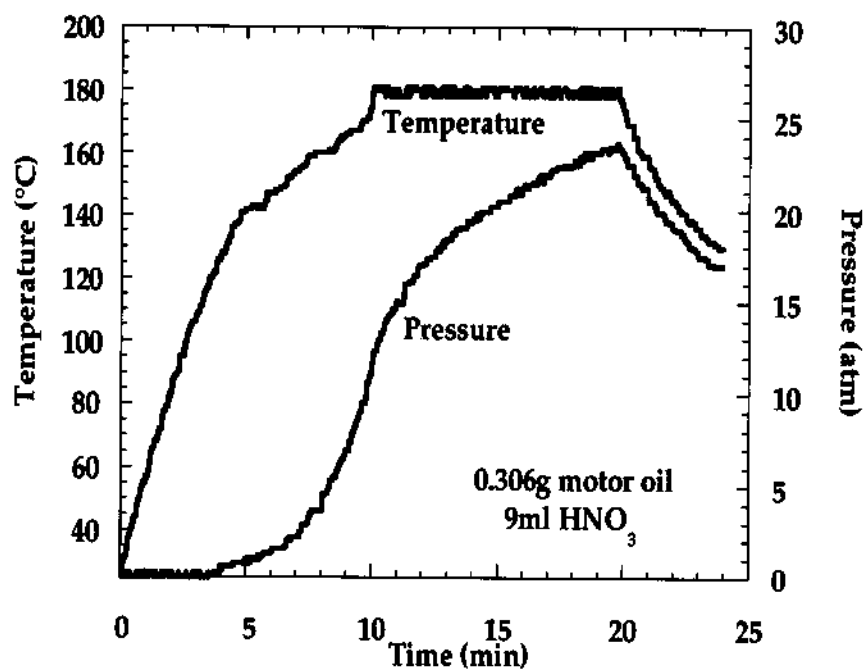


FIGURE 2. TYPICAL REACTION PROFILE FOR THE DIGESTION OF AN OIL (REF. 8)

TABLE 1
ANALYSIS OF NIST SRM 2704 (COMPILATION OF REFS. 2 AND 3)^a
BUFFALO RIVER SEDIMENT

Element	Analyzed ($\mu\text{g/g}$)	Certified ($\mu\text{g/g}$)
Arsenic (n=4)	23.4 ± 2.6	23.4 ± 0.8
Cadmium (n=6)	3.5 ± 1.2	3.45 ± 0.22
Chromium (n=6)	132.9 ± 1.3	135 ± 5
Copper (n=6)	98.0 ± 4.2	98.6 ± 5.0
Lead (n=6)	155 ± 9.2	161 ± 17
Mercury (n=4)	1.49 ± 0.14	1.44 ± 0.07
Nickel (n=6)	43.6 ± 3.9	44.1 ± 3.0
Phosphorus (n=4)	$1.016 \pm 0.016 \text{ mg/g}$	$0.998 \pm 0.028 \text{ mg/g}$
Selenium (n=4)	1.13 ± 0.9	(1.1)
Sulfur (n=4)	3.56 ± 0.16	-----
Thallium (n=4)	1.15 ± 0.22	1.2 ± 0.2
Uranium (n=4)	2.97 ± 0.04	3.13 ± 0.13
Zinc (n=6)	441.9 ± 0.8	438 ± 12

^a Digestion with 9 mL HNO_3 and 4 mL HF. Temperature and pressure conditions are as described in Section 7.3.6 of this method and similar to Figure 1. Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 2
ANALYSIS OF NIST SRM 2710 (REFS. 4 AND 3)^a
MONTANA SOIL: HIGHLY ELEVATED TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS (n=6)

Element	Analyzed ($\mu\text{g/g}$)	Certified ($\mu\text{g/g}$)
Antimony	39.3 ± 0.9^b	38.4 ± 3.0
Cadmium	21.9 ± 0.7^a	21.8 ± 0.2
Chromium	34.0 ± 3.2^b	(39)
Copper	2902 ± 83^a	2950 ± 130
Lead	5425 ± 251^a	5532 ± 80
Nickel	13.5 ± 1.0^a	14.3 ± 1.0
Silver	36.6 ± 0.5^b	35.3 ± 1.5
Zinc	7007 ± 111^a	6952 ± 91

^a Digestion with either a. 9 mL HNO₃ and 4 mL HF or b. 9 mL HNO₃, 3 mL HF, & 2 mL HCl. Temperature and pressure conditions are as described in Sec. 7.3.6 of this method and similar to Figure 1. Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 3
NIST SRM 2711 (REFS. 4 AND 3)
MONTANA SOIL: MODERATELY ELEVATED TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS (n=6)

Element	Analyzed ($\mu\text{g/g}$)	Certified ($\mu\text{g/g}$)
Cadmium	40.5 ± 1.0	41.70 ± 0.25
Chromium	45.5 ± 1.0	(47)
Copper	106.8 ± 3.4	114 ± 2
Lead	1161 ± 49	1162 ± 31
Nickel	19.6 ± 0.9	20.6 ± 1.1
Silver	4.3 ± 1.0	4.63 ± 0.39
Zinc	342 ± 9.4	350.4 ± 4.8

^a Digestion with 9 mL HNO₃ and 4 mL HF. Temperature and pressure conditions are as described in Sec. 7.3.6 of this method and similar to Figure 1. Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 4
STABILIZATION AND RECOVERY OF ELEMENTS WITH HCl (REF. 3)^a NIST SRM 2710
MONTANA SOIL: HIGHLY ELEVATED TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS (n=6)

Element	HNO ₃ & HF (µg/g)	HNO ₃ , HF & HCl (µg/g)	Certified (µg/g)
Antimony	33.1 ± 2.1	39.3 ± 0.9	38.4 ± 3.0
Silver	10.6 ± 4.5	36.6 ± 0.5	35.3 ± 1.5

^a HNO₃ and HF - Digestion used 9 mL and 3 mL, respectively.
HNO₃, HF, and HCl - Digestion used 9 mL, 3 mL, and 2 mL respectively. Temperature and pressure conditions are as described in Sec. 7.3.6 of this method and similar to Figure 1.
Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 5
FUMING OFF HYDROFLUORIC ACID WITH MICROWAVE EVAPORATION SYSTEM (REF 3)^a
MONTANA SOIL: HIGHLY ELEVATED TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS (n=4)

Element	Direct (µg/g)	Fumed (µg/g)	Certified (µg/g)
Antimony	39.3 ± 0.9	39.4 ± 0.9	38.4 ± 3.0
Cadmium	21.9 ± 0.7	23.3 ± 1.6	21.8 ± 0.2
Chromium	34.0 ± 3.2	32.4 ± 0.4	(39)
Copper	2902 ± 83	2870 ± 150	2950 ± 130
Lead	5425 ± 251	5502 ± 106	5532 ± 80
Nickel	13.5 ± 1.0	13.5 ± 0.8	14.3 ± 1.0
Silver	36.6 ± 0.5	38.9 ± 1.1	35.3 ± 1.5
Zinc	7007 ± 111	3992 ± 132	6952 ± 91

^a Direct - Digestion used 9 mL HNO₃ and 3 mL HCl or 9 mL HNO₃, 3 mL HF, and 2 mL HCl
Fumed - Digestion used 9 mL HNO₃ and 3 mL HCl followed by the removal of the HF.
Temperature and pressure conditions are as described in 7.3.6 of the method and similar to Figure 1. The digest solution was fumed in a microwave system under vacuum to ~1 mL and 3 mL HCl added. The digest solution was fumed to ~1 mL and 3 mL HNO₃ was added. The solution was fumed for a final step to ~1 mL and quantitatively transferred and diluted to final volume. Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 6
ANALYSIS OF NIST SRM 1084A (REF. 8) ^a
WEAR METALS IN OIL (100 ppm) (n=4)

Element	Analyzed ($\mu\text{g/g}$)	Certified ($\mu\text{g/g}$)
Chromium	98.1 ± 1.1	98.3 ± 0.8
Copper	$1.2.4 \pm 2.4$	100.0 ± 1.9
Lead	99.2 ± 2.3	101.1 ± 1.3
Nickel	99.2 ± 2.4	99.7 ± 1.6
Silver	102.7 ± 2.2	101.4 ± 1.5

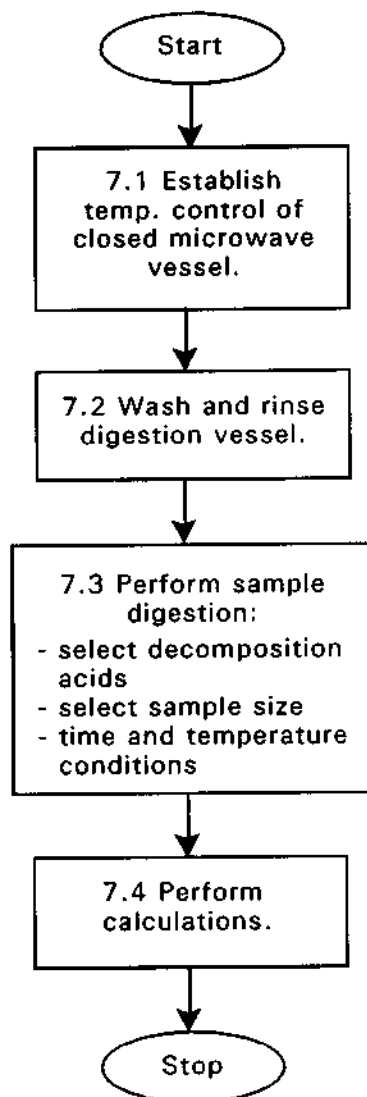
^a Digestion with 9 mL HNO₃ and 0.5 mL HF. Temperature and pressure conditions are as described in Sec. 7.3.6 of this method and similar to Figure 2. Data reported with 95% confidence intervals.

TABLE 7
DIGESTION PARAMETERS USED IN THE ANALYSIS OF SEVERAL MATRICES
BY METHOD 3052

Matrix	HNO₃	HF	HCl
Soil			
NIST SRM 2710 Highly Contaminated Montana Soil	9 mL	3 mL	0-2*mL
NIST SRM 2711 Moderately Contaminated Montana Soil	9	3	0-2*
Sediment			
NIST SRM 2704 Buffalo River Sediment	9	3	0-2*
Biological			
NIST SRM 1566a Oyster Tissue	9	0	0
NIST SRM 1577a Bovine Liver	9	0	0
Botanical			
NIST SRM 1515 Apple Leaves	9	0	0
NIST SRM 1547 Peach Leaves	9	0	0
NIST SRM 1572 Citrus Leaves	9	0.5	0
Waste Oil			
NIST SRM 1084a Wear-Metals in Lubricating Oil	9	0.5	0-2*

* HCl is added to stabilize elements such as Ag and Sb when they are analyzed.

METHOD 3052
MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED
MATRICES



INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org